

**REFERENCIA MÉRÉSI RENDSZEREK A GENETIKAI
DIAGNOSZTIKÁBAN: DNS-ALAPÚ REFERENCIA ANYAGOK
FEJLESZTÉSE**

PhD tézis rövid összefoglaló

Márki-Zay János

Reference Materials Unit, Institute for Reference Materials and Measurements
European Commission, Joint Research Centre, Geel, Belgium

és

Biokémia Intézet, Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem, Szeged

2011

A tudomány és a technológia fejlődése – mint például a polimeráz láncreakció (PCR) felfedezése és a humán genom megismerése – megvilágította a betegségek genetikai hátterét és óriási mértékben bővítette ismereteinket egyes szekvencia variánsok és bizonyos kórképek közötti kóroki kapcsolatokról. Ezzel párhuzamosan számos molekuláris biológiai eljárás, melyet eredetileg tudományos célokra fejlesztettek ki és használtak, elérte a robosztusságnak és teljesítmény jellemzőknek azt a szintjét, mely a rutin diagnosztikai alkalmazáshoz szükséges. E DNS tesztek segítségével kimutathatóak az örökletes betegségek kialakulásáért, a bizonyos betegségekre való fokozott hajlamért, vagy gyógyszerek eltérő hatásáért felelős genetikai eltérések. A molekuláris diagnosztikai vizsgálatok szerepe egyre fontosabb a diagnózis felállításában, a kockázatbecslésben és egyre szélesebb körben a páciensek egyéni érzékenységének megfelelő kezelés megválasztásában is. A genetikai vizsgálatok igen specifikusak, s több ezer különböző tesztet alkalmaznak már a klinikai gyakorlatban. A DNS tesztek eredményei még a tünetek megjelenését megelőzően előre jelezhetik betegségek jövőbeni kialakulását, ezért komoly következményekkel bírnak az adott páciens és hozzátartozói számára is.

Bár a közvélekedés szerint a molekuláris genetikai vizsgálatok nagyon megbízhatóak és a legkorszerűbb technológiát képviselik, a molekuláris diagnosztikai módszerek és szolgáltatások minőségét biztosító rendszerek kifejlesztése nem tartott lépést a DNS-alapú tesztek rohamos elterjedésével. A genetikai vizsgálatok eredményeinek megbízhatóságával kapcsolatos aggodalmakat számos közlemény és nemzetközi szervezetek tanulmányai is alátámasztották. Ezek a klinikai genetikai vizsgálatok területén a téves eredmények magas arányáról, valamint a standardizáció és a tanúsított referencia anyagok (certified reference material, CRM) hiányáról számoltak be. A minőségi problémákat súlyosbítja, hogy a genetikai vizsgálatok a páciens életében rendszerint csak egy alkalommal kerülnek elvégzésre, így egy téves eredmény évekig rejtve maradhat és súlyos konzekvenciákkal járhat. E tények együttese rendkívül fontossá teszi a molekuláris genetikai vizsgálatok standardizációját és minőségének javítását.

A laboratóriumi medicinában a pontosság legmagasabb szintjének biztosításához referencia mérési rendszereket (reference measurement system, RMS) kell létrehozni. A hasznos és megbízható mérési eredmények biztosításához, melyek a laboratóriumok között összehasonlíthatóak és végső soron a legmagasabb metrológiai szintű mérési standardokra visszavezethetőek, referencia mérési rendszerekre van szükség a rutin diagnosztikai szolgáltatásoknál éppúgy, mint a tudomány és a technológia területén.

A referencia mérési rendszerek három eleme a nemzetközileg elfogadott és részletesen karakterizált referencia mérési eljárások (reference measurement procedure, RMP), a tanúsított referencia anyagok (CRM) és a referencia laboratóriumok, melyek együttműködve egy hálózatot alkothatnak. A referencia mérési rendszerek létrehozásának előfeltétele az analit pontos definíciója, míg sikeres

működtetését támogathatják és kiterjeszthetik a külső minőségellenőrző (external quality assurance, EQA) programok. A referencia mérési rendszerek jelenlegi hiánya a molekuláris genetikai vizsgálatok esetében azt eredményezi, hogy az *in vitro* diagnosztikai gyártók és laboratóriumok nem tudják tesztjeik teljesítményét egy általánosan elfogadott standarddal összevetve értékelni.

A referencia anyagok (RM), illetve tanúsított referencia anyagok (CRM) a referencia mérési rendszerek kulcs elemei, és elismerten kiváló eszközei az analitikai pontosság ellenőrzésének. (Tanúsított) Referencia anyagokat használnak a módszerek fejlesztése és validálása, kalibrálása, laboratóriumon belüli statisztikai minőség-ellenőrzése, továbbá a laboratóriumok teljesítményének körvizsgálatok keretében végzett értékelése céljára. Bár minden analitikai rendszer fontos része a megfelelő referencia anyagok használata a mérőeszközök és -módszerek minőségbiztosítására, jelenleg alig néhány klinikai genetikai referencia anyag létezik. Emiatt az Európai Bizottság, Közös Kutatóközpont, Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM) több projektet is elindított, melyek célja molekuláris genetikai (tanúsított) referencia anyagok kifejlesztése, illetve azoknak az eljárásoknak a kidolgozása volt, melyek segítségével *bármely* molekuláris genetikai teszthez előállíthatóak a megfelelő (tanúsított) referencia anyagok.

Az első jelentős együttműködés, a „Certified Reference Materials for Molecular Genetic Testing” (CRMGEN) projekt legfontosabb célja molekuláris genetikai referencia anyag jelöltek kifejlesztése volt különböző örökletes betegségekre és genetikai rizikófaktorokra, mint pl. az örökletes haemochromatosis, a fragilis X szindróma, a cisztás fibrózis és az V-ös alvadási faktor Leiden (G1691A) mutációja. Nemzetközi kooperációban a klinikai genetikai referencia anyagok négy alapvető típusa került különböző formákban kifejlesztésre és előállításra, hogy azután vizsgálni lehessen referencia anyagok céljára való alkalmasságukat és a tisztított DNS stabilizálásának lehetőségeit: tenyésztett sejtvonalak, rekombináns DNS (plazmidok), enzimatikusan amplifikált DNS szakaszok (PCR termékek) és genomiális DNS. A kifejlesztett prototípus referencia anyagok részletes jellemzése mellett klinikai genetikai laboratóriumokban végzett kiterjedt körvizsgálatokban is kipróbálásra kerültek.

A CRMGEN projekttel párhuzamosan, az IFCC Scientific Committee of Molecular Biology Techniques in Clinical Chemistry (C-MBT) bizottsága egy együttműködést kezdeményezett az IRMM-mel plazmid-alapú CRM-ok kifejlesztésére és előállítására a humán koagulációs faktor II (FII, prothrombin) gén G20210A variánsának vizsgálatára.

Ez utóbbi projekthez kapcsolódóan, az IRMM és a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémia Intézet 3 európai EQA szervezet bevonásával egy körvizsgálatot szervezett. E körvizsgálat keretében a vad-típusú FII referencia plazmidba új mutációk kerültek bevitelre és a módosított, illetve a referencia plazmidok felhasználásával gyártott minőségi kontroll anyagok (quality control material, QCM) klinikai laboratóriumoknak kerültek kiküldésre, hogy

segítségükkel felmérhető legyen azok kompetenciája az atípusos genotipizálási eredményeket okozó ritka szekvencia variánsok felismerésére és megfelelő közlésére. A vizsgálat további célja volt a genetikai diagnosztikai szolgáltatások terén a jellemző hibalehetőségek azonosítása és a DNS-alapú referencia anyagokkal szembeni elvárásokra vonatkozó adatgyűjtés.

A tézis keretében végzett tanulmányok fontosabb tudományos eredményei:

- 1) Számos különböző típusú és kiszerezésű DNA-alapú referencia anyagot állítottunk elő és értékeltünk klinikai genetikai (tanúsított) referencia anyagként való alkalmasságuk szempontjából.
- 2) Vizsgáltuk és optimalizáltuk a tisztított DNS alapú referencia anyagok stabilizálásának lehetőségeit, hogy biztosítható legyen megfelelő eltarthatóságuk.
- 3) A genetikai referencia anyagok homogenitásának és stabilitásának vizsgálatának céljára új analitikai eljárások kerültek kifejlesztésre, illetve ismert módszerek továbbfejlesztésre.
- 4) A DNS-alapú referencia anyagok tanúsítására egy modell rendszer került kialakításra, és a valós idejű (ún. isochronous) stabilitási és homogenitási vizsgálatok protokollját optimalizáltuk és az ISO Guide 34 és a BCR irányelvek szerint dokumentáltuk.
- 5) Ezek a protokollok és a genetikai (tanúsított) referencia anyagok fejlesztésére és gyártására kidolgozott eljárások minden típusú DNS-alapú teszt esetében hasznosítható és segítheti további nukleinsav alapú (tanúsított) referencia anyagok kifejlesztését.
- 6) Három plazmid alapú CRM-t (név szerint: IRMM/IFCC-490, -491 and -492) fejlesztettünk ki, gyártottunk le és tanúsítottunk az ISO Guide 30–35 szerint a humán koagulációs faktor II (prothrombin) G20210A variánsának vizsgálatára.
- 7) Átvihetőségi (commutability) vizsgálatokat terveztünk, szerveztünk meg és végeztünk, hogy demonstráljuk a FII CRM-ek alkalmasságát.
- 8) Ezek a tanúsított referencia anyagok beszerezhetőek az IRMM-től a PCR-alapú módszerek minőségbiztosítására, és a világon az elsőként bevezetett klinikai genetikai CRM-ek.
- 9) Felhasználva a FII referencia plazmidokat és az ún. site-directed mutagenézis technikát, minőségi kontroll anyagokat fejlesztettünk ki a FII G20210A variáns és közeli ritka mutációk vizsgálatára. Ezeket a QCM-kat azután sikeresen alkalmaztunk egy európai körvizsgálatban, hogy felmérjük a molekuláris genetikai laboratóriumokban jellemzően előforduló hibaforrásokat és a laborok kompetenciáját az atípusos genotipizálási eredményeket okozó ritka szekvencia variánsok jelenlétének felismerésére és megfelelő közlésére.

A TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. Klein CL, *Márki-Zay J*, Corbisier P, Gancberg D, Cooper S, Gemmati D, Halbmayer WM, Kitchen S, Melegh B, Neumaier M, Oldenburg J, Oppliger Leibundgut E, Reitsma PH, Rieger S, Schimmel HG, Spannagl HG, Tordai A, Tosetto A, Visvikis S, Zadro R, Mannhalter C. Reference Materials (RMs) for the analysis of the human factor II (prothrombin) gene G20210A mutation. *Clin Chem Lab Med* 43:862-68. (2005)
- II. Gancberg D, *Márki-Zay J*, Corbisier P, Klein C, Schimmel H, Emons H. Certification of a Reference Material consisting of purified plasmid DNA containing a fragment from the human prothrombin gene (wildtype) – Certified Reference Material IRMM/IFCC-490. Report EUR 22169 EN (2006)
- III. Gancberg D, *Márki-Zay J*, Corbisier P, Klein C, Schimmel H, Emons H. Certification of a Reference Material consisting of purified plasmid DNA containing a fragment from the human prothrombin gene (G20210A mutant) – Certified Reference Material IRMM/IFCC-491. Report EUR 22170 EN (2006)
- IV. Gancberg D, *Márki-Zay J*, Corbisier P, Klein C, Schimmel H, Emons H. Certification of a Reference Material consisting of purified plasmid DNA containing a fragment from the human prothrombin gene (heterozygous G20210 wildtype/G20210A mutant) – Certified Reference Material IRMM/IFCC-492. Report EUR 22167 EN (2006)
- V. Gancberg D, Corbisier P, Meeus N, *Márki-Zay J*, Mannhalter C, Schimmel H. Certification of reference materials for detection of the human prothrombin gene G20210A sequence variant. *Clin Chem Lab Med* 46:463-9. (2008)
- VI. *Márki-Zay J*, Klein CL, Gancberg D, Schimmel HG, Dux L. European External Quality Control Study on the Competence of Laboratories to Recognize Rare Sequence Variants Resulting in Unusual Genotyping Results. *Clin Chem* 55:739-47. (2009)