

# Validace a verifikace vyšetření v molekulární genetice

**Alexandra Štambergová**

**Fakultní nemocnice v Motole**

**Laboratoře ÚBLG, Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol, Praha**

10.4.2012, Praha





# Téma přednášky

Základní pojmy s odkazy na normu ČSN EN 15 189.2007

Analytická validace molekulárně genetických metod

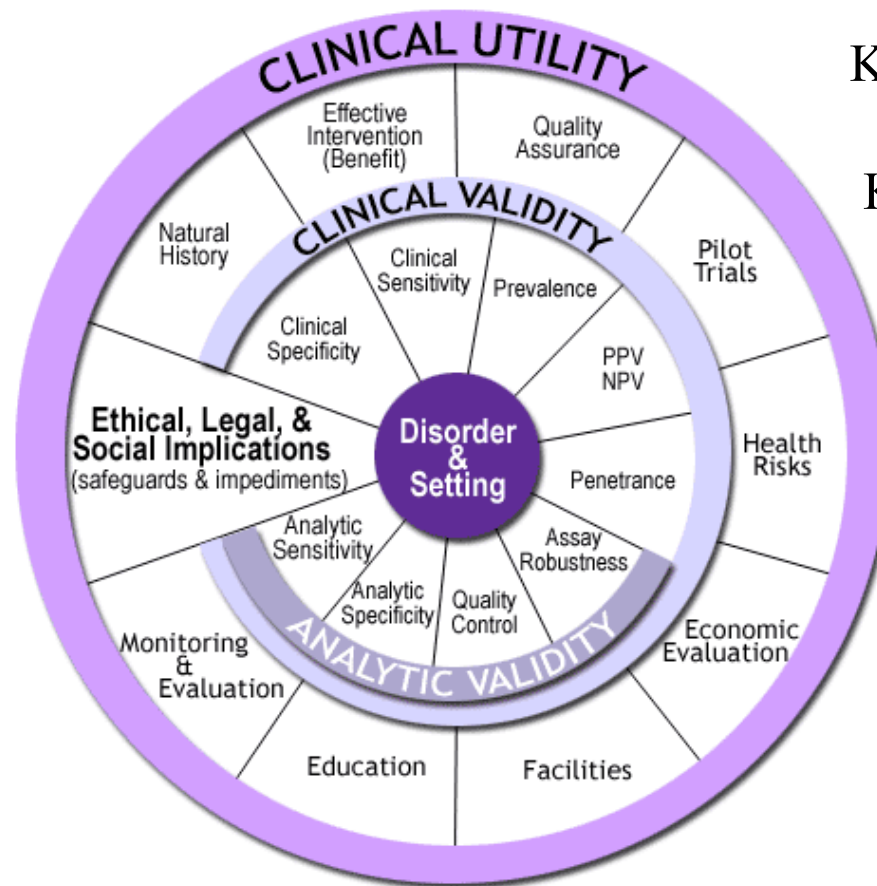
Proč? Kdo? Kdy? Jak?

Validační parametry

Praktické ukázky validací metod z naší laboratoře

# Hodnocení kvality genetického testování model ACCE

Etický,  
legální a  
sociální  
význam



Klinická užitečnost

Klinická validace

Analytická validace



## Legislativní požadavek

**Zákon č. 373/2011 Sb.,  
o specifických zdravotních službách (od 1.4.2012)**  
genetická laboratorní vyšetření lze provádět pouze v laboratořích,  
jejichž odborná způsobilost byla posouzena podle  
harmonizované normy ČSN EN ISO 15 189:2007 akreditující  
osobou (ČIA o.p.s.)

## Mezinárodní normy řízení kvality

Validace metod **je vyžadována** normami řízení kvality

### **ČSN EN ISO/IEC 17025**

Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří

### **ČSN EN ISO 15189:2007**

Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost



## Validace a verifikace

ČSN EN ISO/IEC 17025, 5.4.5.1

**Validace** je potvrzení přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny

**potvrzení zkoumáním**

**Verifikace** je potvrzení, že data o analytických znacích poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři dosažena

**potvrzení ověřováním**



**Validace metod**  
**ČSN EN ISO 15189.2007**

5.5.1

Laboratoř musí používat takové postupy vyšetření... které jsou **vhodné** pro dané použití.

5.5.2

K potvrzení toho, že postupy vyšetření jsou **vhodné** pro daný účel, **musí** laboratoř používat **pouze validované postupy**.

**Normy říkají co je třeba udělat,  
ale ne jak se to má udělat a v jakém rozsahu**

**????????**

# Směrnice a dokumenty týkající se analytické validaci metod

**Eurogentest:** A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Ch.J. Mattocks a kol. *European Journal of Human Genetics* (2010) 18, 1276-1288

Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu. R. Brdička a kol. **Klinická biochemie a metabolismus 1/2007**

Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýze extrahumánního genomu. ([www.cskb.cz](http://www.cskb.cz))

B. Friedecký a kol. **Klinická biochemie a metabolismus 2/2006**

**ICH Guideline:** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2(R1) (1995, 1996, revised 2005)

**Eurachem:** Vhodnost analytických metod pro daný účel. Laboratorní příručka pro validaci metod a související činnosti ([www.eurachem.cz](http://www.eurachem.cz)), (1999)



## Proč validujeme ?

- jeden ze základních prvků zajišťování kvality
- musíme se ujistit, že metoda je vhodná pro daný účel
  - dát určité garance za naše výsledky
- zaručit vzájemnou kompatibilitu výsledků vyšetření provedených na různých pracovištích a to i na mezinárodní úrovni
- u akreditovaných subjektů je validace metod požadována normou řízení kvality





## Kdo validuje ?

### **výrobci diagnostik - vývojová validace**

Ustanovení dle direktivy IVD 98/79 EC musí výrobce uvádět na trh EU pouze validované měřicí systémy. Rozsah validace je dán normou (EN 13612:2002)

### **laboratoře - interní validace**

Konečná odpovědnost za validaci metody je na laboratoři



## Kdy validujeme ?

- před tím, než je metoda uvedena do rutinního používání
  - pokud se změní metoda  
(přístroj s jinými parametry, jiný typ biologického vzorku atd.)
- pokud výsledky interních nebo externích kontrol kvality nevyhovují
- naplnění požadavku normy – validace již používaných metod v laboratoři (retrospektivní validace)



## V jakém rozsahu validujeme?

**Laboratoř sama zhodnotí**, jak konkrétní metodu bude validovat/verifikovat a v jakém rozsahu. Citované směrnice mají charakter **doporučení**.

**Cílem je získat dostatek údajů k rozhodnutí, že metoda poskytuje správné výsledky a že je vhodná pro zamýšlený účel.**

Při rozhodování o rozsahu validace by měly být zohledněny i **náklady a technické možnosti**.



## Plná validace

**Místní postupy** - metody vyvinuté v laboratoři  
(„in-house“)

**Metody převzaté** (např. publikované v literatuře)

**Metody využívající komerční kity** (CE/IVD) s  
upraveným postupem



## Verifikace - zkrácený postup validace

### **Metody využívající komerční kity (CE/IVD)**

- přesně dle návodu výrobce – druh materiálu (vzorku), proces izolace DNA, objem pipetovaných komponent
- v souladu se zamýšleným použitím, které je výrobcem jasně deklarováno
  - dodržení doporučený systém interních kontrol kvality

### **Metody již používané a validované v laboratoři**

(např. sekvenace) rozšíření o nové geny

### **Standardizované metody**

u diagnóz, pro které existují doporučení v rámci směrnic pro správnou laboratorní praxi je doporučena metoda považována za normalizovanou.



## Jak postupujeme ?

Vypracujeme validační/verifikační **plán**

Provedeme **experimenty**

**Vyhodnotíme výsledky** a zdokumentujeme vypracováním  
**validačního reportu**

Součástí jsou primární data měření a laboratorní  
protokoly.



## Plán validace

- rozhodneme, zda půjde o **validaci** nebo **verifikaci**
- určíme, k jakému účelu bude metoda používána
- definujeme **pracovní postup** ( dostatečně přesný – princip metody, rozsah použití, přístroje – režim údržby, reagentie atd.) včetně izolační metody DNA
- zvolíme **validační parametry** dle charakteru metody
- **kontrolní vzorky** a jejich počet, s kterými provedeme experimenty

## Provedení, vyhodnocení a dokumentování

- **experimentální činnost**, provedená v laboratoři na kvalifikovaných přístrojích (pipety), proškolenými pracovníky.
- **limity metody** – např. délka fragmentu, obsah GC, množství vstupní DNA, použitý izolační postup, selektivita – rozlišení F508del a I507del atd.
- **validační report – zpráva**: laboratorní protokoly, kdo provedl měření a kdy, doložit primární data. Definujeme i **režim interních a externích kontrol** kvality.

Z validace musí být zřejmé, zda metoda, **použitá v podmínkách laboratoře**, je vhodná pro daný účel.

**Po validaci metody následuje vypracování SOP.**





## Validační parametry

**Accuracy = přesnost**

**Precision = preciznost**

**Trueness = pravdivost**

**Bias – vychýlení, strannost**

**Specificity = specifičnost**

**Senzitivity = citlivost**

ČSN ISO 3534-2:2010 Statistika - slovník a značky. Část 2 aplikovaná statistika

Mezinárodní metrologický slovník (International Vocabulary of Metrology VIM3:2008)



## Přesnost Accuracy

"Těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny."

V tradiční analytické literatuře se "accuracy" překládalo jako "správnost"

Přesnost se dá vyjádřit jako **preciznost a pravdivost**, tj. zhodnocením vlivů **náhodných** a **systematických** faktorů.

# Preciznost      Precision

Těsnost shody mezi naměřenými hodnotami získanými opakovaným měřením

Např. v jedné sérii, v jednom dni, jedním pracovníkem

**opakovatelnost (repeatability)**

intra –run, within – run, intra- batch, intra-assay

Např. vzájemné porovnání mezi sériemi v různých dnech

**reprodukovatelnost (reproducibility)**

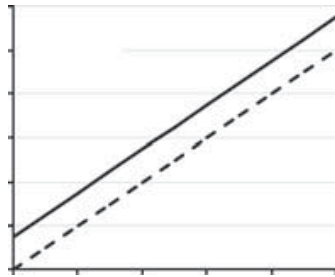
inter – run, between – run, inter – batch, inter-assay

Vyjadřuje se u kvantitativních metod nejčastěji **směrodatnou odchylkou, rozptylem nebo variačním koeficientem.**

V tradiční analytické literatuře se "precision" překládalo jako "přesnost"

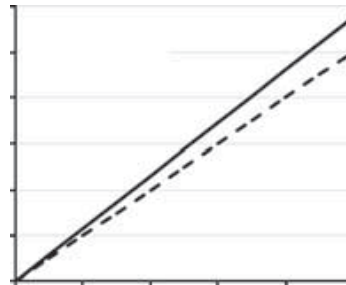
# Pravdivost    Trueness

Těsnost shody mezi aritmetickým průměrem měření a referenční hodnotou



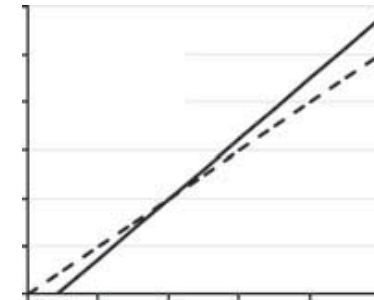
Referenční hodnota

**Konstantní vychýlení**



Referenční hodnota

**Proporcionální vychýlení**



Referenční hodnota

**Proporcionální a konstantní vychýlení**

Mírou pravdivosti je obvykle vychýlení (bias)  
Vychýlení představuje kvantifikaci systematické chyby měření  
(korekční faktor)



## Specifičnost - specificity

pravděpodobnost **negativního výsledku** testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku.

Je vyjadřována jako poměr mezi správnou negativitou (TN) a součtem správné negativity a falešné positivity (FP)

$$\text{TN}/(\text{TN}+\text{FP})$$

## Citlivost - sensitivity

pravděpodobnost **pozitivního výsledku** testu v případě přítomnosti hledané varianty testovaného znaku.

Je vyjadřována jako poměr mezi správnou pozitivitou (TP) a součtem správné positivity a falešné negativity (FN)

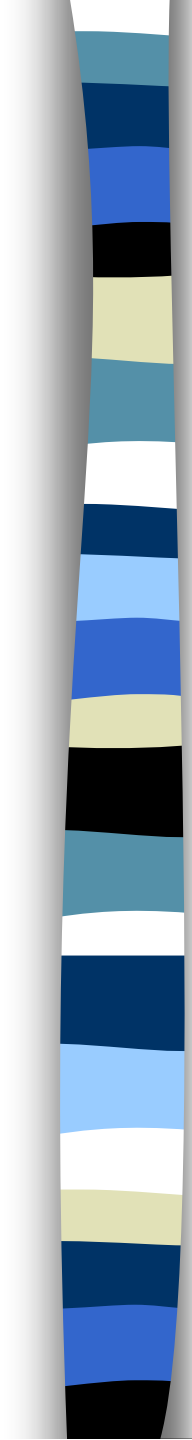
$$\text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$$



## Robustnost

Ověřujeme vnímavost metody na případné odchylky od optimálních nebo běžných podmínek jejího provádění

operátor  
termocykler  
DNA koncentraci  
PCR master mix



## Validaci je třeba vhodně a efektivně naplánovat

Vzorky analyzované v rámci robustnosti a reprodukovatelnosti metody lze využít i pro vyhodnocení citlivosti a specifčnosti metody.

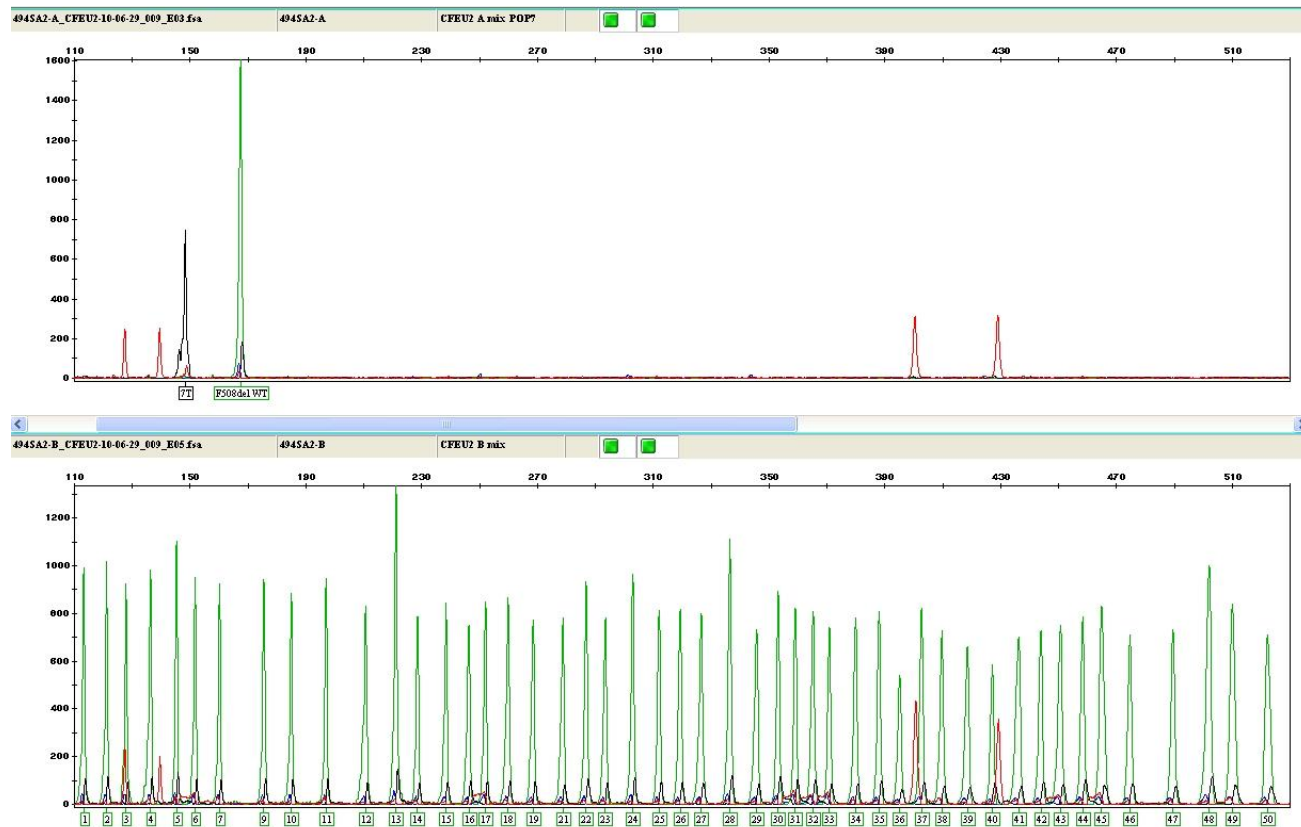
Metodu, která je již používána laboratoří a je zahrnuta do EQA, je možné **validovat retrospektivě** vyhodnocením výsledků EQA  
(specifčnost, citlivost, reprodukovatelnost, robustnost)

**Sníží se tím výrazně počet analyzovaných vzorků.**

# Vyšetření 50 nejčastějších mutací a Tn polymorfismů genu *CFTR* pomocí kitu ELUCIGENE CF – EU2 CE IVD kit – zavedení metody v laboratoři

Kit ELUCIGENE CF-EU2 je určen pro simultánní *in vitro* detekci a identifikaci 50 nejčastějších lidských mutací v *CFTR* genu a *CFTR* polymorfismu Tn, a jejich wild type sekvencí v Evropské populaci.

Specifická hybridizace primerů metodu fluorescenční ARMS – amplifikační refrakční mutační systém. Fragmentační analýza na genetickém analyzátoru.





# Vyšetření 50 nejčastějších mutací a Tn polymorfismů genu *CFTR* pomocí kitu ELUCIGENE CF – EU2 CE IVD

Metoda **CE IVD** – validace provedená výrobcem kitu – výsledky uvedeny v návodu pro použití (Performance characteristics).

Metoda bude použita přesně **dle návodu výrobce**

**Verifikace metody** – zkrácená validace

Ve své podstatě je to metoda kvantitativní – separace fluorescenčně značených fragmentů dle velikosti kapilární elektroforézou. Vyhodnocení pomocí software pro fragmentační analýzu za použití velikostních standardů.

Výsledkem analýzy je **určení genotypu na základě zhodnocení přítomnosti píků v mixu A a mixu B**. Přítomnost mutantních a normálních alel je odlišena také barevně (zelené píky wt, modré mutované)

**Vzorky DNA** izolované z periferní krve, Guthrieho kartiček, kultivované buňky plodové vody a choriových klků – izolační postup

Vzorky **známého genotypu** – pozitivní/negativní

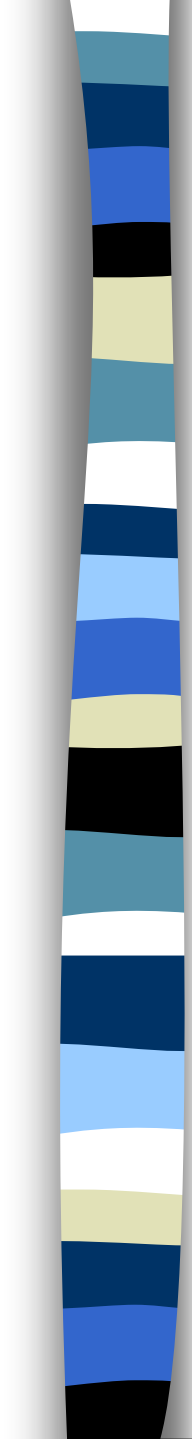
Kit obsahuje kontrolní DNA – normální (wt pro vyšetřované mutace)

Cena a časová náročnost vyšetření

**Validační parametry - citlivost, specifčnost, reprodukovatelnost, opakovatelnost a robustnost**

Analyzované vzorky byly zaslepené

| Vzorek        | Genotyp                | Tn poly-morfismus | Typ vzorku          | Matrice vzorku                    | Metoda izolace vzorku      | Ověření genotypu - metoda analýzy | Datum analýzy                         | Datum analýzy validačního parametru | Validační parametr                          |
|---------------|------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|
| 494SA2        | wt/wt                  | 7T/7T             | W-type homozygot    | Krevní skvrny                     | InnuPrepForensic kit*****  | x                                 | x                                     | 29.6.2010, 28.7.2010                | Opakovatelnost                              |
| 210SA1        | wt/wt                  | 7T/9T             | W-type homozygot    | Krevní skvrny                     | QIAamp DNA mini kit Qiagen | CF EU 1                           | 15.12.2010                            | 21.7.2010                           | Specifická                                  |
| 2325C         | wt/wt                  | 7T/7T             | W-type homozygot    | Krev                              | Gentra*                    | CF Roche strips                   | 2.12.2008                             | 22.7.2010                           | Specifická                                  |
| 751SA-A       | wt/wt                  | 7T/7T             | W-type homozygot    | Krevní skvrny                     | InnuPrepForensic kit*****  | CF EU 1                           | 12.7.2010                             | 9.8.2010                            | Specifická                                  |
| 2577X         | wt/wt                  | 7T/7T             | W-type homozygot    | Nativní buňky plodové vody        | Guanidin HCl***            | x                                 | x                                     | 1.9.2010                            | Matrice vzorku                              |
| 2565X         | wt/wt                  |                   | W-type homozygot    | Kultivované buňky plodové vody    | Gentra*                    | x                                 | x                                     | 27.7.2010                           | Matrice vzorku                              |
| 2563X         | wt/wt                  | 7T/9T             | W-type homozygot    | Kultivované buňky plodové vody    | Gentra*                    | x                                 | x                                     | 19.7.2010                           | Matrice vzorku                              |
| 1898C         | R117H                  | 7T/7T             | M-type, heterozygot | Krev                              | Gentra*                    | CF EU 1, sekvenace, digesce       | 2.9.2009                              | 13.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 1783D         | CFTR dele 2,3          | 7T/9T             | mut/wt heterozygous | Krev                              | Gentra*                    | CF EU 1                           | 2.9.2009                              | 22.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 1783A         | F508del/ CFTR dele 2,3 | 7T/9T             | složený heterozygot | Krev                              | x                          | F508del, CFTRdele2,3              | 1.9.2005,13.9.2005,6.9.2005,13.9.2005 | 22.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 785SA = 2559A | F508del/ CFTR dele 2,3 | 7T/9T             | složený heterozygot | Krevní skvrny                     | InnuPrepForensic kit*****  | F508del, CFTRdele2,3              | 20.7.2010                             | 28.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 2559A= 785SA  | F508del/ CFTR dele 2,3 | 7T/9T             | složený heterozygot | Krev                              | Gentra*                    | F508del, CFTRdele                 | 20.7.2010                             | 20.7.2010                           | Citlivost a k ověření genotypu vzorku 785SA |
| 236SA1        | F508del/1717-1G>A      | 7T/9T             | složený heterozygot | Krevní skvrny                     | InnuPrepForensic kit*****  |                                   |                                       | 21.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 2569A         | F508del/ CFTR dele 2,3 | 7T/9T             | složený heterozygot | Krev                              | Gentra*                    | F508del, CFTRdele                 | 2.8.2010, 3.8.2010                    | 2.8.2010                            | Citlivost                                   |
| 0100A         | F508del/2184delA       | 7T/9T             | složený heterozygot | Krev                              | x                          |                                   |                                       | 22.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 723SA         | F508del                | 9T/9T             | M-type homozygot    | Krevní skvrny                     | InnuPrepForensic kit*****  | F508del                           | 8.7.2010                              | 29.6.2010                           | Citlivost                                   |
| 2095A         | F508del                | 7T/9T             | M-type, heterozygot | Krev                              | není izolační protokol     | sekvenace                         |                                       | 22.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 2450A         | G551D                  | 7T/7T             | M-type, heterozygot | Krev                              | Autogenflex****            | sekvenace                         |                                       | 13.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 1647X         | F508del, N1303K        | 9T/9T             | složený heterozygot | Nativní buňky choriových klků     | Guanidine HCl ***          | CF EU 1                           | 26.8.2009                             | 22.7.2010                           | Citlivost a matrice vzorku                  |
| 499SA1        | F508del, G542X         | 5T/9T             | složený heterozygot | Krev                              | Gentra*                    | F508del, digesce,                 | 26.4.2010, 10.5.2010                  | 21.7.2010                           | Citlivost                                   |
| 2549X1        | F508del                | 7T/9T             | M-type, heterozygot | Kultivované buňky choriových klků | Gentra*                    | F508del                           | 8.7.2010                              | 13.7.2010                           | Citlivost a matrice vzorku                  |
| 1855X1        | F508del                | 7T/9T             | M-type, heterozygot | Kultivované buňky choriových klků | Gentra*                    | F508del                           | 23.8.2010                             | 1.9.2010                            | Matrice vzorku                              |



# Molekulárně genetické vyšetření trombofilních mutací souvrou RHA thrombo fy. LBP (reverzní hybridizace na stripech)

Metoda využívající komerční kit **CE/IVD**

Metoda používaná v laboratoři přesně **dle instrukcí výrobce**

**Retrospektivní způsob validace**

Metoda založena na principu reverzní hybridizace – vyhodnocujeme vizuálně přítomnost jasně viditelné linie na proužku (stripu) dle předlohy

Kontrolní vzorky EQA – pozitivní/negativní

Vzorky DNA izolované z periferní krve – izolační postup

**Validační parametry** - citlivost, specifita, reprodukovatelnost a robustnost vyhodnocením výsledků EQA

**Validační zpráva** obsahuje mimo jiné laboratorní protokoly s výsledky EQA a osvědčení o účasti v EQA.

# Vzorky EQA

Molekulárně genetické vyšetření trombofilních mutací  
soupravou RHA trombo fy. LBP

EQA 2004 - 2007

| Genotype                  | N of samples |
|---------------------------|--------------|
| FV Leiden negative        | 13           |
| FV Leiden heterozygote    | 10           |
| FV Leiden homozygote      | 9            |
| FII 20210G>A negative     | 16           |
| FII 20210G>A heterozygote | 12           |
| FII 20210G>A homozygote   | 4            |
| MTHFR 677C>T negative     | 5            |
| MTHFR 677C>T heterozygote | 5            |
| MTHFR 677C>T homozygote   | 4            |
| Total                     | 78           |

## Přehled hodnocení validačních parametrů pro retrospektivní verifikaci

| <b>Validation Parameter</b>            | <b>Sample</b> | <b>Repetition</b> | <b>N of Analysis</b> |
|--|---------------|-------------------|----------------------|
| <b>Specificity (EQA results)</b>       | 34            | 1                 | 34                   |
| <b>Sensitivity (EQA results)</b>       | 44            | 1                 | 44                   |
| <b>Reproducibility</b>                 |               |                   |                      |
| 1st day                                | 5             | 1                 | 5                    |
| 2nd day                                | 5             | 1                 | 5                    |
| 3rd day                                | 5             | 1                 | 5                    |
| <b>Robustness, different operators</b> |               |                   |                      |
| VN                                     | 5             | 1                 | 5                    |
| IA                                     | 5             | 1                 | 5                    |
| HK                                     | 5             | 1                 | 5                    |
| <b>Total N of Analysis</b>             |               |                   | <b>108</b>           |

# HRM analýza variant MTHFR genu genotypizace malých ampliconů (45 a 50 bp)

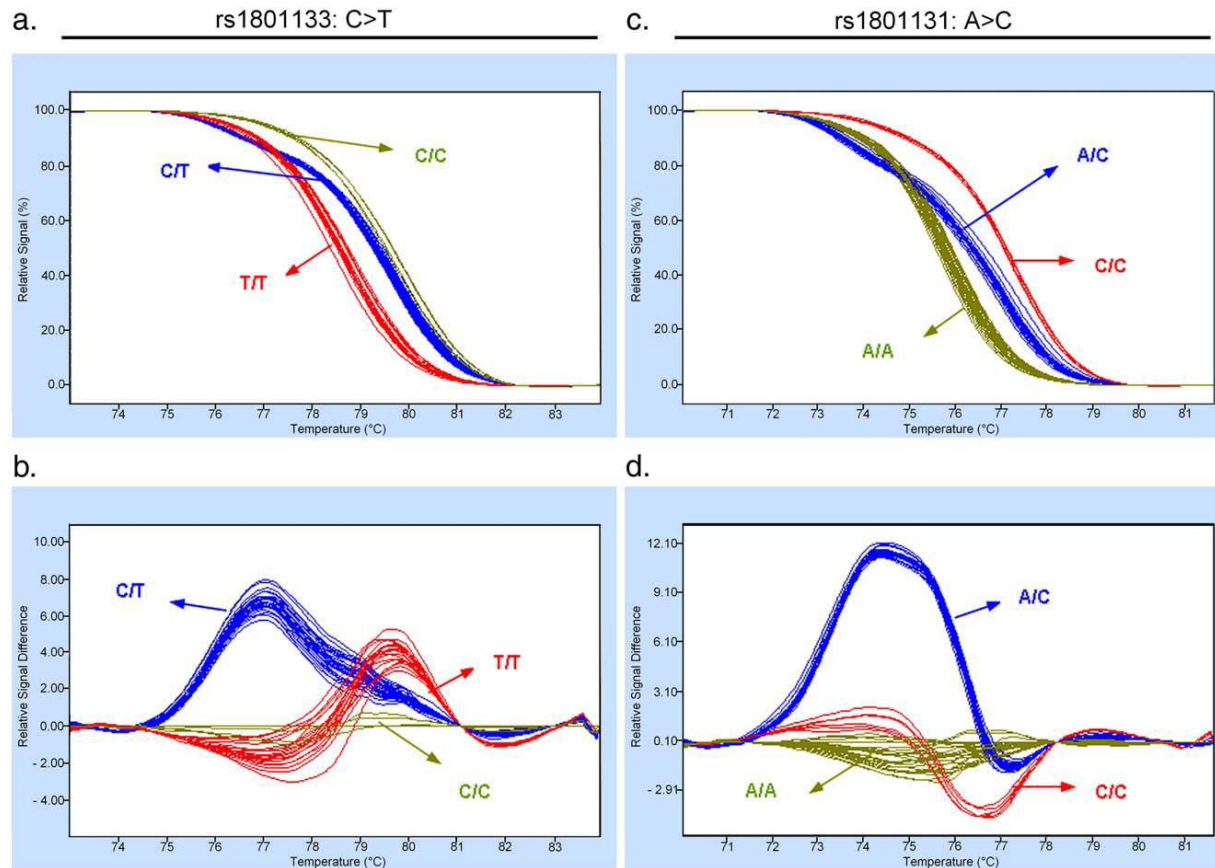


Fig. 1. Normalized plots, and normalized and temperature shifted difference plots

P.Norambuena; J. A. Copeland; P.Krenková; A. Stambergová; M. Macek. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. **Clinical Biochemistry**, volume 42, Issue 12, August 2009, Pages 1308-1316

# Validace HRM analýzy variant MTHFR genu

Metoda vyvinutá v laboratoři – „in-house“ metoda

Interní **plná validace** provedená v laboratoři

Ve své podstatě je to metoda kvantitativní – měříme množství fluorescence v závislosti na zvyšující se teplotě (heteroduplexní analýza).

Výsledkem analýzy je určení genotypu na základě porovnáním tvarů křivek tání (wt/mut).

Metoda HRM – v rámci konsorcia Eurogentest byla provedena **technická validace metody HRM**.

Vzorky DNA izolované z periferní krve – izolační postup

Dostupnost DNA vzorků – pozitivní/negativní

Metoda PCR s interkalačním činidlem prováděná v jedné zkumavce. PCR i analýza HRM na jednom přístroji.

Cena a časová náročnost vyšetření

**Hodnocené parametry:**

**Citlivost, specifčnost, reprodukovatelnost, opakovatelnost a robustnost**

Analyzované vzorky byly zaslepené

# Validace HRM analýzy variant MTHFR genu

**Specifičnost:** 178 negativních vzorků (rs1801133:C>T)

46 negativních vzorků (rs1801131:A>C)

**Citlivost:** 203 pozitivních vzorků (rs1801133:C>T)

58 pozitivních vzorků (rs1801131:A>C)

**Opakovatelnost:** 10 x každý genotyp

**Reprodukovatelnost:** 3x každý genotyp v průběhu 3 dnů

**Robustnost:** různé množství DNA (3x každý vzorek), anelační teplota (+-1°C), počet cyklů PCR, různí pracovníci, objem master mixu a DNA.

**Závěr:** U všech vzorků správně určen softwarem genotyp. Všechna opakovaná měření u obou variant a třech genotypů poskytla správné tvary křivek tání, které umožnily jejich jednoznačnou diferenciaci a to jak při provedení opakování v jednom dni za stejných podmínek, tak i v průběhu více dnů. Metoda poskytuje správné výsledky při DNA koncentraci 10 ng – 50ng DNA. Změna v anelační teplotě ani v počtu cyklů v PCR reakci neovlivnila správnost výsledků. Avšak změna v množství přidaného master mixu (ul) a objemu přidané DNA způsobila změnu tvaru křivky. Přesná příprava master mixu dle laboratorního protokolu a používání kalibrovaných pipet je nutná.

Metoda je v podmínkách laboratoře použitelná pro diagnostické účely, poskytuje správné a spolehlivé výsledky.



# Přímá sekvenace dle Sanger

„gold standard“ – referenční metoda pro identifikaci a charakterizaci DNA variant.

Metoda - **genotypizace** – cílená analýza známé mutace  
- **mutační skenování**

**Metoda již zavedená v laboratoři**

**Účast EQA: EMQN, DGKL**

**Odkaz na referenční sekvenci vyšetřovaného genu**

**Kvalita sekvenační analýzy**

- design vhodných primerů (BLAST)
- přítomnost známých SNP v místě nasedání primerů
- odhad pravděpodobnost chyby „base call“ (PHRED score 20 – 1% pravděpodobnost chyby, PHRED score 30 – 0,1%).

**Practice guidelines for Sanger sequencing Analysis and Interpretation.  
CMGS – Clinical Molecular Genetic Society.**



# EuroGentest

<http://www.eurogentest.org/>

## Laboratories

### Quality Management and Accreditation/Certification of Genetic Testing (Unit 1).

#### Diagnostic validation

**Standardised framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests.** Ch.J. Mattocks a kol. European Journal of Human Genetics (2010) 18, 1276-1288

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664632>

#### Validation report

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

**The MLPA validation of NoE by EuroGentest**

**Automated DNA extraction** – Chemagenic method – technology and validation report.

## High resolution melting – HRM

### **Evaluation of High-Resolution Melting (HRM) for Mutation Scanning of Selected Exons of the *CFTR* Gene**

(*CFTR* / high-resolution melting / HRM / mutation detection)

Petra Křenková, Patricia A. Norambuena, Alexandra Štambergová, Milan Macek Jr.

Folia Biologica (Praha) 55, 238-242 (2009)

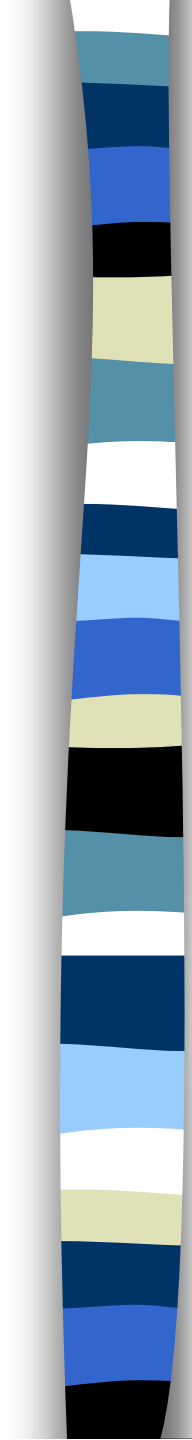
### **Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the *MTHFR* gene**

Patricia A. Norambuena, Joshua A. Copeland, Petra Křenková, Alexandra Štambergová, Milan Macek Jr.

Hum Mutat. 2009 Jun;30(6):899-909.

### **Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of *BRCA1* mutation scanning using the 96-well LightScanner.**

[van der Stoep N](#), [van Paridon CD](#), [Janssens T](#), [Krenkova P](#), [Stambergova A](#), [Macek M](#), [Matthijs G](#), [Bakker E](#).



Děkuji za pozornost