

- different biotopes to residents of the Irkutsk. *Izvestiya IGU. Seriya: Biologiya. Ekologiya*. 2011; 4 (1): 14–24. (in Russian)
6. Karaev Ya.M. *Protective and immunogenic properties of intestinal toxoid*. Dis. Krasnodar; 2008. (in Russian)
  7. Mambetova E.F. *Comparative characteristics of some biological properties of monocultures and sokultiviruemih variations of bacteria of the genus Serratia, and Staphylococcus aureus*. Diss. Chelyabinsk; 2007. (in Russian)
  8. Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Yu.P., Pilueva A.I. Characteristics of pathogenicity genes populations Escherichia coli, isolated from children in Irkutsk. In: *Materialy III mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Ekologiya, zdorov'e, sport"*. 27–28 Semterber 2011. Chita: ZabGU; 2011. (in Russian)
  9. Lajman E.F., Sharkova V.A., Mazur M.E., Prosjannikova M.N. Molecular genetic characterization of pathogenicity factors E.coli, isolated from surgical wounds of various classes. *Mezhdunarodniy zhurnal Eksperimentalnogo obrazovaniya*. 2012; 5: 84-5. (in Russian)
  10. Seung-Hak Cho, Jung-Beom Kim, Yong-Bae Park, Mi-Sun Park, Hiun Suk Chae, Hae Kyung Lee. *A Case of a shiga toxin producing Escherichia coli*. *Yonsei Med. J.* 2011; 52 (6): 1039-43.
  11. Gyles C.L. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: E45–E62.
  12. Fogg P.C., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Cumulative effect of prophage burden on Shiga toxin production in Escherichia coli. *Microbiology*. 2012; 58 (2): 488-97.
  13. Melton-Celsa A., Mohawk K., Teel L., O'Brien A. Pathogenesis of Shiga-toxin producing Escherichia coli. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012; 357: 67–103.
  14. Industry Standard OST 91500.11.0004-2003. Treatment protocol. "Intestinal dysbiosis". Utverzhden 09.06.03. (in Russian)
  15. Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Rey J., Alonso J. M., Hermoso M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4): 1351-6.
  16. Zkharova E.A., Azizov I.S. Microecological characterization of the intestinal microbiota of sickly children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; 2: 63-8. (in Russian)
  17. Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Ju.P., Rakova E.B. Identification of pathogenicity genes encoding the ability to toxin, strains Escherichia coli, isolated from the intestinal habitat of children in Irkutsk. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3 (2): 132-3. (in Russian)
  18. Shabanova N.A., Bondarenko V.M. Differences over a set of genes in pathogenic strains of Escherichia coli, producing Shiga-like toxins. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; 5: 4–8. (in Russian)
  19. Muniesa M., Hammerl J.A., Hertwig S., Appel B., Brüssow H. Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78 (12): 4065-73.
  20. Beutin L., Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J. Food Prot.* 2012; 75 (2): 408-18.
  21. Moons P., Fester D., Aertsen A. Lysogenic conversion and phage resistance development in phage exposed Escherichia coli biofilms. *Viruses*. 2013; 5 (1): 150-61.
  22. Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G. Altruism of Shiga toxin-producing Escherichia coli: recent hypothesis versus experimental results. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2: 166.

Поступила 09.01.14

Received 09.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.155.191+616.155.294+616.419-004:575.08

Дунаева Е.А.<sup>1</sup>, Миронов К.О.<sup>1</sup>, Дрибноходова О.П.<sup>1</sup>, Субботина Т.Н.<sup>2,3</sup>, Башмакова Е.Е.<sup>2</sup>, Ольховский И.А.<sup>3,4</sup>, Шипулин Г.А.<sup>1</sup>

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ V617F В ГЕНЕ JAK2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

<sup>1</sup>ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва; <sup>2</sup>ФГАУ ВПО «Сибирский федеральный университет», 660041, Красноярск; <sup>3</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, Красноярск; <sup>4</sup>ФГБУН «Красноярский научный центр» СО РАН, 660036, Красноярск

*Соматическая мутация V617F в гене JAK2 является частой причиной хронических миелопролиферативных заболеваний, не обусловленных мутацией BCR/ABL. Количественное определение относительной доли мутантного аллеля может быть использовано для определения тяжести течения и прогноза заболевания, а также при назначении лекарств, ингибирующих активность JAK2. Для количественного определения мутации использован метод пиросеквенирования. Разработанная методика позволяет детектировать и количественно определять долю мутантной фракции начиная от 7%. "Серую зону" представляют образцы, имеющие долю мутантного аллеля от 4 до 7%. Зависимость ожидаемой доли мутантной фракции в анализируемом образце от наблюдаемого значения сигнала описывается уравнением прямой с коэффициентами регрессии:  $y=0,97x-1,32$ , при этом погрешность измерения составляет  $\pm 0,7$ . Разработанная методика апробирована на клиническом материале от 192 пациентов с основными формами миелопролиферативных заболеваний, не обусловленных мутацией BCR/ABL. Обнаружено 64 образца, содержащих мутантную фракцию в количестве от 13 до 91%. Разработанная методика позволяет проводить мониторинг терапии миелопролиферативных заболеваний и помогает оптимизировать тактику лечения.*

Ключевые слова: JAK2; хронические миелопролиферативные заболевания; пиросеквенирование.

Для корреспонденции:

Миронов Константин Олегович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр.

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогириевская, д. 3А.

E-mail: mironov@pcr.ru

E.A. Dunaeva<sup>1</sup>, K.O. Mironov<sup>1</sup>, O.P. Dribnohodova<sup>1</sup>, T.N. Subbotina<sup>2,3</sup>, E.E. Bashmakova<sup>2</sup>, I.A. Olhovskii<sup>3,4</sup>, G.A. Shipulin<sup>1</sup>

THE QUANTITATIVE TESTING OF V617F MUTATION IN GEN JAK2 USING PYROSEQUENCING TECHNIQUE

<sup>1</sup>The central research institute of epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123 Moscow, Russia; <sup>2</sup>The Siberian federal university, 660041 Krasnoyarsk, Russia; <sup>3</sup>The Krasnoyarsk branch of the hematological research center of Minzdrav of Russia, 660036 Krasnoyarsk, Russia; <sup>4</sup>The Krasnoyarsk research center of the Siberian branch of the Russian academy of sciences, 660036 Krasnoyarsk, Russia

*The somatic mutation V617F in gen JAK2 is a frequent cause of chronic myeloproliferative diseases not conditioned by BCR/ABL mutation. The quantitative testing of relative percentage of mutant allele can be used in establishing severity of disease and its prognosis and in prescription of remedy inhibiting activity of JAK2. To quantitatively test mutation the pyrosequencing technique was applied. The developed technique permits detecting and quantitatively testing percentage of mutation fraction since 7%. The "gray zone" is presented by samples with percentage of mutant allele from 4% to 7%. The dependence of expected percentage of mutant fraction in analyzed sample from observed value of signal is described by equation of line with regression coefficients  $y = -0.97x - 1.32$  and at that measurement uncertainty consists  $\pm 0.7$ . The developed technique is approved officially on clinical material from 192 patients with main forms of myeloproliferative diseases not conditioned by BCR/ABL mutation. It was detected 64 samples with mutant fraction percentage from 13% to 91%. The developed technique permits implementing monitoring of therapy of myeloproliferative diseases and facilitates to optimize tactics of treatment.*

**Key words:** JAK2; chronic myeloproliferative diseases; pyrosequencing.

**Введение.** Среди хронических миелолипролиферативных заболеваний (ХМПЗ), не обусловленных мутацией BCR/ABL, выделяют три наиболее часто встречающихся заболевания: истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз. Соматическая мутация V617F в гене JAK2 нарушает структуру белка, что приводит к самоактивации киназных доменов и проявляется повышенной активностью фермента. Данная мутация определяется в 90–95% случаев истинной полицитемии, 50–70% случаев эссенциальной тромбоцитемии и 40–50% случаев первичного миелофиброза [1–3].

На сегодняшний день показано, что высокий уровень аллельной нагрузки мутации V617F связан с более агрессивным течением истинной полицитемии. Количество мутантного аллеля V617F также влияет на клинико-гематологическую картину больных эссенциальной тромбоцитемией, при этом наблюдается увеличение количества нейтрофилов, большая скорость тромбообразования и более интенсивное развитие миелофиброза. Количественное определение доли мутантного аллеля V617F может использоваться для косвенного определения степени фиброза в костном мозге и селезенке при первичном миелофиброзе. С другой стороны, низкая аллельная нагрузка мутации при первичном миелофиброзе сочетается со снижением показателей выживания пациентов. Актуальность количественного определения уровня аллельной нагрузки также связана с возможностью оптимизации схем лечения, влияющих на активность этого фермента [4].

В связи с этим, количественное определение доли мутантного аллеля V617F является важной клинической задачей, направленной на постановку диагноза, оценку прогноза, выбор оптимального лечения и мониторинг эффективности терапии у пациентов с ХМПЗ, не обусловленных мутацией BCR/ABL. Удобным подходом к выявлению соматических мутаций является использование технологии пиросеквенирования, которая позволяет определять нуклеотидную последовательность и проводить определение частот аллелей заданного локуса ДНК в количественном формате [5, 6].

**Материалы и методы.** Для секвенирования фрагмента гена JAK2, включающего область мутации V617F, были использованы реагенты "ПЦР-смесь-1 АФ-4", "Полимераза (TaqF)", "2,5x ПЦР-буфер blue" и "Праймер для секвенирования АФ-4-S", входящие в форму комплектации № 8 "Тромбо-скрин" набора реагентов "АмплиСенс® Пироскрин" (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13246 от 19 марта 2012 г.). ПЦР проводилась на приборе «МахуGene Gradient» («Axugen», США). Протокол подготовки продуктов амплификации проводилась с использованием формы комплектации № 1 «Пиропреп» набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин». Пиросеквениро-

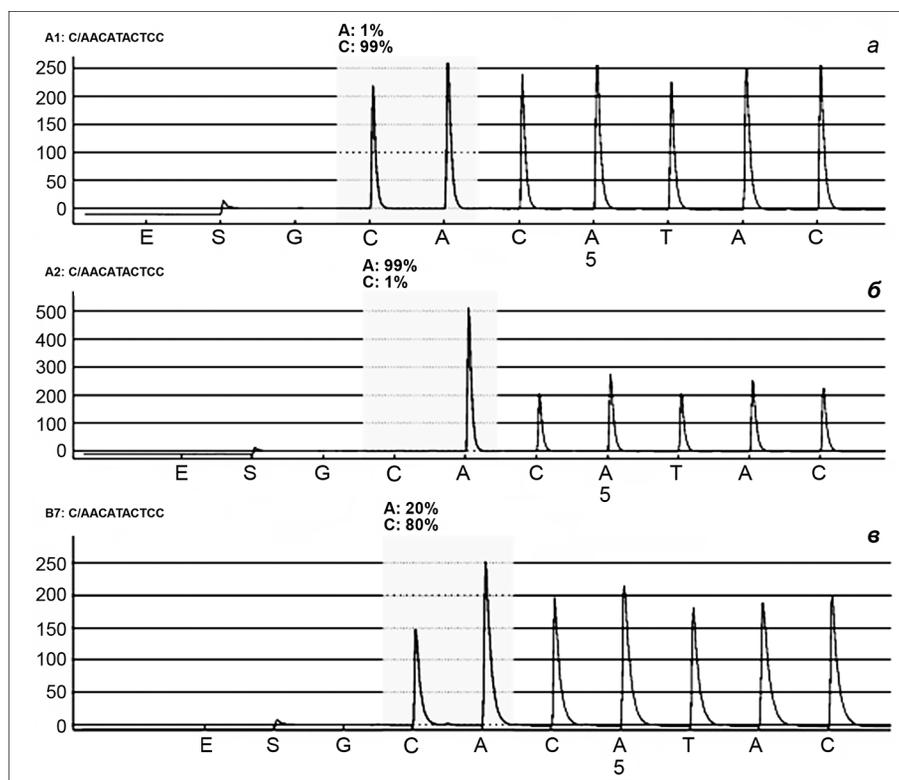
вание проводилось на приборе «PyroMark Q24» с использованием набора «PyroMark® Gold Q96 Reagents» («Qiagen», Германия), этапы проведения анализа подробно описаны в [7]. Очередность добавления нуклеотидов в реакцию пиросеквенирующего синтеза была следующей: G, C, A, C, A, T, A, C. Обработка результатов секвенирования осуществлялась с помощью программного обеспечения "PyroMark Q24 2.0.6". Постановка ПЦР и проведение пиросеквенирования проводились согласно инструкции к набору реагентов "АмплиСенс® Пироскрин".

Определение аналитических характеристик методики для количественной оценки доли мутантного аллеля проводилось с использованием клонированных контрольных образцов, содержащих фрагмент гена JAK2 без мутации и с мутацией V617F. Приготовление контрольных образцов проводилось по стандартной методике клонирования в вектор pGem-T («Promega», США) [8]. Плазмидная ДНК выделялась набором «АхуPrep Plasmid Miniprep Kit» («Axugen Biosciences», США). Концентрацию ДНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами к последовательности вектора.

Клиническая апробация проводилась на 192 образцах крови, полученных от пациентов, направленных на обследование в Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с подозрением на ХМПЗ. Все пробы были протестированы на гематологическом анализаторе «ХТ-2000i» («Sysmex Corporation», Япония). Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»). Концентрацию ДНК измеряли с использованием набора «dsDNA HS Assay Kit» на флуориметре «Qubit» («Invitrogen», США) и готовили разведения ДНК в ТЕ-буфере до концентрации 2 нг/мкл. Дальнейший анализ клинических образцов методом пиросеквенирования проводился по вышеописанной схеме.

Статистические расчеты выполнены с помощью стандартных средств «IBM SPSS Statistics 19».

**Результаты и обсуждение.** Для оценки аналитических характеристик методики определяли параметры LOB (Limit of Blank) – наибольший сигнал, который может быть получен при измерении образца, не содержащего тестируемого материала, и LOD (Limit of Detection) – наименьшая концентрация тестируемого материала, которая может быть достоверно дифференцирована от значения LOB [9]. Определение LOB проводили на 33 клонированных контрольных образцах, содержащих участок гена JAK2 дикого типа. Фоновые колебания сигнала (выражаемые в процентах) во втором положении, соответствующем нуклеотиду С секвенируемой последовательности, находились в диапазоне от 0 до 4, равнясь



Пример детекции последовательности дикого типа и мутантных аллелей гена *JAK2*.

*a* – клонированный образец дикого типа; *b* – клонированный образец, содержащий мутацию; *c* – смесь клонированных образцов дикого типа и мутаций (20%). По оси абсцисс – последовательность добавления нуклеотидов; по оси ординат – уровень сигнала. Отношение мутантной фракции – значение (в %), соответствующее нуклеотиду А в третьем положении.

$1,31 \pm 1,72$ , где 1,31 – среднее значение, 1,72 – стандартное отклонение. Уровень LOB, рассчитанный в соответствии с [9], составил 4,1%.

Предел детекции определяли на панели разведений клонированных контрольных образцов. Проанализированы смешанные контрольные образцы, содержащие и не содержащие мутацию V617F. Анализировались смеси с 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 7, 5, 3, 2 и 1% контрольного образца, содержащего мутацию. В реакцию вносили около 3000 копий ДНК (эквивалентных 10 нг геномной ДНК человека). Смеси, содержащие 10, 7, 5, 3, 2 и 1% контрольного образца с мутацией, тестировались не менее чем в 27 повторях, а разведения с большим содержанием мутантной фракции – в 9 повторях. В каждую постановку включались контрольные образцы с 100% содержанием мутантного и дикого типа. Значения предела детекции (LOD), рассчитанные в соответствии с [9], для разных смесей находятся в диапазоне от 6,5 до 8,6%. Разработанная методика не позволяет детектировать мутацию в смесях, содержащих 1, 2, 3 и 5% мутантной ДНК, поскольку рассчитанный предел детекции для этих разведений выше наблюдаемого в эксперименте среднего значения. Начиная со смеси, содержащей 7% мутантной фракции, существует возможность достоверно отличать образцы, содержащие мутацию, от образцов без мутации. Пример детекции последовательности дикого типа и мутантных аллелей представлен на рисунке.

Зависимость ожидаемого значения сигнала от значения сигнала, который наблюдался в эксперименте, была линейной, коэффициент корреляции Спирмена равнялся 0,999. Зависимость ожидаемой доли мутантной фракции в анализируемом образце от наблюдаемого детектируемого значения описывается уравнением прямой со следующими коэффициентами регрессии:  $y=0,97x-1,32$ . Таким образом, для расчета доли мутантной фракции, присутствующей в анализируемом

образце необходимо детектируемое значение умножить на 0,97 и вычесть 1,32; при этом погрешность измерения будет составлять  $\pm 0,7\%$ . Образцы, попадающие в диапазон от 4 до 7%, не могут быть однозначным образом отнесены к истинно положительным или отрицательным, для них необходимо проводить перестановку в повторях или анализ с использованием методики с большей чувствительностью (обладающей меньшим значением предела детекции).

Поскольку фоновый уровень LOB зависит от незначительных вариаций при проведении независимых постановок (качества ПЦР-продуктов, лота реагентов для проведения пиросеквенирования, потерь ДНК при пробоподготовке и других незначительных факторов), для корректной оценки уровня LOD тестирование клинических образцов необходимо проводить в присутствии контрольного образца, не содержащего мутацию.

При тестировании клинического материала от 192 пациентов с подозрением на ХМПЗ найдено 64 пробы, содержащие мутацию V617F (см. таблицу). После уточнения клинического диагноза выявлено, что среди 30 пациентов с истинной полицитемией у 26 человек (87%) выявлена мутация со значениями аллельной нагрузки от 16 до 91% (в среднем по группе – 44%). Среди 35 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией мутация была выявлена у 18 человек (51%) со значениями аллельной нагрузки от 13 до 43% (в среднем по группе – 14%). При этом значения аллельной нагрузки не зависели от количества циркулирующих форменных элементов крови. В целом, полученные результаты соответствуют данным, полученным в предыдущих исследованиях [1–3]. Два пациента из пяти с первичным миелофиброзом имели значения аллельной нагрузки 26 и 73%. Пациент с более низкой нагрузкой отличался более выраженной цитопенией периферической крови: уровень лейкоцитов был ниже в 1,5 раза, эритроцитов в 1,4 раза, а тромбоцитов в 2,1 раза, чем у паци-

### Исследованные клинические образцы и количество образцов с выявленной мутацией V617F

Заболевания	Общее количество образцов	Количество образцов с мутацией, %
ХМПЗ:		
истинная полицитемия	30	26 (87)
эссенциальная тромбоцитемия	35	18 (51)
первичный миелофиброз	5	2 (40)
неуточненные	46	16 (35)
Реактивные состояния (эритроцитоз, лейкоцитоз, тромбоцитоз)	70	0
Острый миелолейкоз	3	2
Хронический миелолейкоз	5	0
Всего...	194	64 (33)

ента с более высокой нагрузкой. Для 46 пациентов диагноз на момент подготовки публикации остался без уточнения нозологической формы ХМПЗ, в данной группе мутация была выявлена у 16 человек (35%). Ни у одного из 70 пациентов с реактивными (симптоматическими) эритроцитозами, лейкоцитозами и тромбоцитозами мутации выявлено не было. У двух из троих обследованных пациентов с острым миелонидным лейкозом была выявлена данная мутация, позволяющая предположить, что у них произошла трансформация первичного JAK2-позитивного миелолипролиферативного процесса. Ни у одного из 5 пациентов с хроническим миелолейкозом, связанным с филадельфийской хромосомой, мутации V617F обнаружено не было.

**Заключение.** Таким образом, разработана, валидирована и апробирована на клиническом материале методика, позволяющая детектировать мутацию V617F в гене *JAK2* и количественно определять долю мутантного аллеля при помощи пиросеквенирования. Клиническая значимость данного исследования определяется его диагностическими возможностями в дифференциальной диагностике и оценке прогноза развития ХМПЗ. Тест может служить полезным объективным критерием эффективности терапии.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность науч. сотр., канд. биол. наук Я.А. Войцеховской и ст. науч. сотр., канд. биол. наук М.Л. Маркелову за изготовление контрольных образцов, д-ру биол. наук, проф. А.Е. Платонову за помощь в статистической обработке результатов, заведующему гематологическим отделением Красноярской краевой клинической больницы В.И. Москову и главному внештатному гематологу Минздрава Красноярского края Е.Ю. Виноградовой за помощь в подборе пациентов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Provan D., Gribben J.G., eds. *Molecular hematology*. 3rd Ed. Wiley-Blackwell; 2010.
2. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in poly-

cythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7(4): 387-97.

3. Tutaeva V., Misurin A.V., Michiels J.J., Rozenberg J.M., Sokolova M.A., Ivanova V.L. et al. Application of PRV-1 mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. *Hematology*. 2007; 12(6): 473-9.
4. Vannucchi A.M., Pieri L., Guglielmelli P. JAK2 allele burden in the myeloproliferative neoplasms: effects on phenotype, prognosis and change with treatment. *Ther. Adv. Hematol.* 2011; 2(1): 21-32.
5. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Демидова И.А., Баринов А.А., Войцеховская Я.А. и др. Выявление активирующих соматических мутаций в гене KRAS методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 6: 49-51.
6. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998; 281(5375): 363-5.
7. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Дедков В.Г., Шипулин Г.А. Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; 4: 39-48.
8. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3-rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
9. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29: 49-52.

#### REFERENCES

1. Provan D., Gribben J.G., eds. *Molecular hematology*. 3rd Ed. Wiley-Blackwell; 2010.
2. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7(4): 387-97.
3. Tutaeva V., Misurin A.V., Michiels J.J., Rozenberg J.M., Sokolova M.A., Ivanova V.L. et al. Application of PRV-1 mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. *Hematology*. 2007; 12(6): 473-9.
4. Vannucchi A.M., Pieri L., Guglielmelli P. JAK2 allele burden in the myeloproliferative neoplasms: effects on phenotype, prognosis and change with treatment. *Ther. Adv. Hematol.* 2011; 2(1): 21-32.
5. Dribnokhodova O.P., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Demidova I.A., Barinov A.A., Voytsekhovskaya Ya.A. et al. The detection of activating somatic mutations in gene KRAS using pyrosequencing. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 6: 49-51. (in Russian)
6. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998; 281(5375): 363-5.
7. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Dedkov V.G., Shipulin G.A. Pyrosequencing based genetic polymorphism detection using PyroMark Q24 genetic analysis system. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2011; 4: 39-48. (in Russian)
8. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3-rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
9. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29: 49-52.

Поступила 21.02.14

Received 21.02.14