

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.419-006-07:575.08

Дунаева Е.А.¹, Миронов К.О.¹, Субботина Т.Н.^{2,3}, Ольховский И.А.^{3,4}, Шипулин Г.А.¹

РАЗРАБОТКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ МЕТОДИК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ V617F В ГЕНЕ JAK2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва;

²ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», 660041, Красноярск;

³Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, Красноярск;

⁴ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН, 660036, Красноярск

Чувствительность методов, используемых для обнаружения соматической мутации V617F в гене JAK2, определяет возможности раннего выявления хронических миелопролиферативных опухолей (ХМО). Мутация V617F также может быть обнаружена у лиц, не имеющих развернутой картины гематологических заболеваний, и определение мутации даже в низких концентрациях ассоциировано с повышением риска церебрального инсульта и тромбоза артериальных и венозных сосудов. Цель данной работы заключалась в разработке методик, основанных на COLD-ПЦР и аллель-специфичной ПЦР, направленных на повышение чувствительности выявления мутации V617F, определяемой с помощью пиросеквенирования. Аналитическую чувствительность методик оценивали на контрольных образцах с различными соотношениями аллелей. Для аллель-специфичной ПЦР аналитическая чувствительность составила 0,25% мутантного аллеля при концентрации анализируемого контрольного образца 10³ копий ДНК/мкл; для COLD-ПЦР — 0,5% при концентрации 10⁴ копий ДНК/мкл. Проведена сравнительная апробация методик на клиническом материале, полученном от 106 пациентов с подозрением на ХМО. При исследовании клинических образцов методом COLD-ПЦР было обнаружено 13 (14%), а методом аллель-специфичной ПЦР — 15 (16%) положительных образцов. Во всех 15 случаях обнаружения мутации было получено клиническое подтверждение диагноза ХМО. Предложенные методики позволяют увеличить эффективность амплификации мутантной ДНК в исследуемых образцах и тем самым повысить чувствительность последующего анализа продуктов амплификации методом пиросеквенирования, что позволяет рекомендовать использование методик для подтверждения диагноза ХМО и раннего выявления лиц с повышенным риском развития венозных и артериальных тромбозов.

Ключевые слова: JAK2; COLD-ПЦР; аллель-специфичная ПЦР; хронические миелопролиферативные заболевания; пиросеквенирование.

Для цитирования: Дунаева Е.А., Миронов К.О., Субботина Т.Н., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Разработка и сравнительная апробация методик для повышения чувствительности определения мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(2): 125-128.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-125-128>.

Dunaeva E.A.¹, Mironov K.O.¹, Subbotina T.N.^{2,3}, Olkhovsky I.A.^{3,4}, Shipulin G.A.¹

THE DEVELOPMENT AND COMPARATIVE APPROBATION OF METHODS OF INCREASING SENSITIVITY OF DETECTION OF MUTATION V617F IN GENE JAK2 BY PYRO-SEQUENCING

¹The central research institute of epidemiology of the Rospotrebnadzor, 111123 Moscow, Russia

²The Sibirskii federal university, 660041 Krasnoyarsk, Russia

³The Krasnoyarskii branch of the hematological research center of Minzdrav of Russia, 660036 Krasnoyarsk, Russia

⁴The Krasnoyarskii research center of the Siberian branch of the Russian academy of sciences, Krasnoyarsk, Russia

The possibilities of early detection of chronic myelo-proliferative tumors (MPT) are determined by sensitivity of techniques implemented for finding somatic mutation V617F in gene JAK2. The mutation V617F can also be found in individuals without unfolded picture of hematological diseases. The detection of mutation even in low concentrations is associated with increasing of risk of cerebral stroke and thrombosis of arterial and venous vessels. The study was carried out to develop techniques based on COLD polymerase chain reaction and allele-specific polymerase chain reaction targeted to increasing of sensitivity of finding mutation V617F detected using pyro-sequencing. The analytical sensitivity of techniques was evaluated by control samples with different ratio of alleles. For allele-specific polymerase chain reaction analytical sensitivity amounted to 0.25% of mutant allele at concentration of analyzed control sample 10³ copies of DNA per mkl. For COLD polymerase chain reaction sensitivity amounted to 0.5% at concentration 10⁴ copies of DNA per mkl. The comparative approbation of techniques was implemented using clinical material obtained from 106 patients with suspicion on MPT. The analysis of clinical samples using COLD polymerase chain reaction revealed 13 (14%) and using technique of allele-specific polymerase chain reaction - 15 (16%) positive samples. In all 15 cases of detection of mutation clinical confirmations of diagnosis of MPT was received. The proposed techniques permit increasing efficiency of amplification of mutant DNA in analyzed samples and hence to increase sensitivity of subsequent analysis of products of amplification using technique of pyro-sequencing. Therefore, the mentioned techniques can be recommended to be applied for confirmation of diagnosis of MPT and early identification of individuals with increased risk of development of venous and arterial thromboses.

Key words: JAK2; COLD polymerase chain reaction; allele-specific polymerase chain reaction; chronic myelo-proliferative diseases; pyro-sequencing.

Для корреспонденции: Дунаева Елена Алексеевна, мл. науч. сотр. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора; e-mail: ead82@mail.ru

For citation: Dunaeva E.A., Mironov K.O., Subbotina T.N., Olkhovsky I.A., Shipulin G.A. The development and comparative approbation of methods of increasing sensitivity of detection of mutation V617F in gene JAK2 by pyro-sequencing. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (2): 125-128. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-125-128>*

For correspondence: Dunaeva E.A., junior researcher of the research group of development of new methods of detection of genetic polymorphisms. e-mail: ead82@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study was supported by the Foundation of innovations RPO «The Krasnoyarsk regional association MedLabDiagnost»

Received 15.07.2016
Accepted 01.08.2016

Введение. Наиболее часто при истинной полицитемии (ИП), эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе, которые охватывают 98% Rh-негативных хронических миелопролиферативных опухолей (ХМО), выявляют соматическую мутацию V617F в гене JAK2 (COSM12600) [1]. Выявление мутации V617F ассоциировано с изменением гематологических параметров (увеличенное количество эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов) и повышением риска развития инфаркта миокарда и венозных тромбозов, который возрастает с увеличением доли мутантного аллеля [2]. В настоящее время доля мутантной ДНК более 1—2% служит однозначным положительным диагностическим критерием для ХМО, при показателях ниже этого значения гистологические изменения, как правило, не выражены и недостаточны для морфологического подтверждения диагноза миелопролиферативного заболевания [3]. Однако это не означает, что выявление мутации в нагрузках меньших, чем 1%, не актуально. Опубликованы работы, в которых описывается обнаружение мутации V617F с низкой нагрузкой у лиц без характерной клинической симптоматики. По мнению авторов, факт выявления мутации предшествует последующему развитию симптомов ХМО и может расцениваться в качестве раннего предвестника заболевания. Кроме того, наличие даже небольшого процента клональных клеток с мутацией V617F может играть патогенетическую роль при ряде негематологических заболеваний [4, 5]. Описано значительное увеличение агрегационной активности тромбоцитов в пробах цельной крови у пациентов с мутацией V617F, не зависящее от аллельной нагрузки, количества циркулирующих форменных элементов и добавления в пробу аспирина [6]. В связи с этим наличие чувствительных методов для обнаружения мутации V617F крайне актуально для ранней диагностики и профилактики осложнений ХМО, а также при проведении скрининговых исследований для выявления лиц с повышенным риском тромбоза артериальных и венозных сосудов.

На данный момент разработан ряд методов, позволяющих выявлять в образцах соматические мутации с низкой мутантной нагрузкой. Простыми и удобными способами при исследовании подобных образцов служат COLD-ПЦР [7] и аллель-специфичная ПЦР (AS-ПЦР) [8], которые повышают чувствительность используемых методик. COLD-ПЦР и AS-ПЦР могут быть применены в качестве основы, повышающей чувствительность, при комплексных исследованиях с использованием других технологий, например таких, как секвенирование по Сэнгеру [9] и пиросеквенирование [10, 11].

Ранее нами был разработан качественный тест для определения мутации V617F в гене JAK2 с помощью методики пиросеквенирования, входящий в форму комплектации № 8 «ТРОМБО-скрин» набора реагентов «АмплиСенс Пироскрин» (Центральный НИИ эпидемиологии, регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13246 от 19 марта 2012 г.) [12]. В последующих разработках методика была переведена в количественный формат со следующими аналитическими характеристиками: фоновые колебания, которые могут быть

получены при анализе образца, не содержащего мутацию (составляют 0—4%), и количественное определение доли мутантного аллеля (возможно начиная от 7%) [13]. По оценке [2], в скрининговых исследованиях, проведенных среди лиц с выявленной мутацией V617F, доля мутантного аллеля в диапазоне от 1 до 5% встречается достаточно часто — до 32%. Таким образом, данная методика может быть использована для диагностики Rh-негативных ХМО и мониторинга эффективности терапии, но в то же время ее чувствительность недостаточна для определения клинически значимой доли мутантного аллеля менее 4%, что может иметь значение для ранней диагностики и профилактики ХМО.

Цель исследования заключалась в разработке методик для повышения чувствительности определения мутации V617F в гене JAK2 за счет обогащения образцов мутантной ДНК с помощью COLD-ПЦР и AS-ПЦР с последующей детекцией результатов амплификации методом пиросеквенирования, а также в сравнительной апробации разработанных методик.

Материал и методы. Для определения мутантного аллеля использовали реактивы, входящие в формы комплектации № 1 («ПИРО-преп») и № 8 («ТРОМБО-скрин») набора реагентов «АмплиСенс Пироскрин» (Центральный НИИ эпидемиологии), и набор реагентов PyroMark Q96 Gold Reagents (Qiagen, Германия). Амплификацию проводили на приборе MaXyGene Gradient (Axugen, США). Анализ продуктов амплификации проводили на приборе PyroMark Q24 (версия программного обеспечения 2.0.6) согласно инструкциям к наборам с использованием «Праймера для секвенирования АФ-4-S».

Определение чувствительности методик COLD-ПЦР и AS-ПЦР проводили с использованием клонированных контрольных образцов, содержащих фрагмент гена JAK2 без мутации и с мутацией V617F, приготовленных согласно [13]. Концентрацию ДНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами к последовательности вектора. После измерения концентраций контрольных образцов готовили смеси ДНК, содержащие 10; 5; 1; 0,5; 0,25 и 0,1% мутантного образца, в концентрациях 50 000, 5000 и 500 копий/мкл. Для оценки распределений фоновых значений сигнала при отсутствии мутации — параметра Limit of blank (LoB) [13, 14] — параллельно со смесями, содержащими мутантные аллели, проводили тестирование контрольных образцов, не содержащих мутацию.

Клиническую апробацию методик проводили на 106 образцах, выделенных от пациентов, направленных на обследование в Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с подозрением на хронические миелопролиферативные заболевания. Все пробы были протестированы на гематологическом анализаторе XT-2000i (Sysmex Corporation, Япония). Выделение ДНК проводили из цельной крови с использованием набора «ДНК-сорб-В» (Центральный НИИ эпидемиологии) согласно инструкции. Все клинические образцы были исследованы ранее с помощью формы комплектации № 8 набора реагентов «Ампли-

Таблица 1

Определение чувствительности COLD-ПЦР и AS-ПЦР на контрольных образцах

Процент мутантного аллеля	Детектируемая доля мутантного аллеля, %			
	COLD-ПЦР		AS-ПЦР	
	Разброс значений	Среднее	Разброс значений	Среднее
10	60—93	78	70—81	76
5	45—84	63	62—87	70
1	15—40	27	29—60	41
0,5	10—30	20	13—56	26
0,25	1—19	10	11—49	22
0,1	2—10	7	4—28	13
0	0—6	2 (LoB = 5)	0—9	3 (LoB = 7)

Сенс Пироскрин» в количественном формате [13] и охарактеризованы как отрицательные и сомнительные.

Результаты. Оптимизированы условия амплификации для двух методик, позволяющих повысить долю мутантного аллеля в анализируемых образцах, определены их аналитические характеристики с использованием контрольных образцов и проведена сравнительная апробация методик на клинических образцах.

COLD-ПЦР. При оптимизации условий и постановке COLD-ПЦР использовали «ПЦР-смесь-1 АФ-4» и другие реагенты для амплификации из формы комплектации № 8 набора реагентов «АмплиСенс Пироскрин» согласно инструкции к набору (объемы реакционной смеси и добавляемой ДНК-пробы составляли 25 и 10 мкл). Ключевым параметром проведения COLD-ПЦР служит минимальная температура денатурации (Тд), при которой может образовываться продукт амплификации. Руководствуясь данными о том, что разница в температуре плавления гомо- и гетеродуплексов длиной до 200 пар оснований может находиться в диапазоне от 0,2 до 3,8°C [15], проводили серию ПЦР с пошаговым понижением температуры денатурации, начиная от 81°C. ПЦР проводили по программе: 95°C — 15 мин; 5 циклов: 95°C — 15 с; 60°C — 15 с; 72°C — 20 с; 40 циклов: Тд — 15 с; 60°C — 15 с; 72°C — 20 с. Контроль образования ПЦР-продукта проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Минимальная температура денатурации образца, не содержащего мутацию, составила 76,5°C; с этой температурой проводили дальнейшее исследование контрольных и клинических образцов.

AS-ПЦР. Для амплификации фрагмента, содержащего анализируемую область, использовали прямой (F) и обратный (R) праймеры, входящие в состав «ПЦР-смеси-1 АФ-4», и праймер, специфичный к мутантному варианту ДНК, — AS (5' TAG-TTT-TAC-TTA-CTC-TCg-TCT-CCA-CAg-AA 3'). При оптимизации условий проведения AS-ПЦР эмпирически подбирали следующие параметры: значения температуры отжига, которые варьировались в диапазоне от 60 до 64°C, и соотношения концентраций праймеров F, R и AS. Оптимальный вариант смеси для амплификации включал 5 пмоль праймера F, 2,5 пмоль праймера R и 2,5 пмоль праймера AS. Остальные компоненты реакционной смеси не отличались от компонентов для COLD-ПЦР. AS-ПЦР проводили по программе: 95°C — 15 мин; 95°C — 15 с; 64°C — 15 с; 72°C — 20 с (45 циклов).

Аналитические характеристики методик. Колебания значений LoB, выражаемые в процентах, и значения сигналов, соответствующие мутантным аллелям в смесях контрольных образцов, представлены в табл. 1.

Как видно из полученных данных, для концентрации 10⁴ копий ДНК/мкл аналитическая чувствительность метода AS-ПЦР составила 0,25% мутантного аллеля. При анализе меньших концентраций метод AS-ПЦР также позволяет обнаружить 0,25% мутантного аллеля при концентрации 10³, но не при 10² копий ДНК/мкл. При определении аналитических характеристик метода COLD-ПЦР чувствительность составила 0,5% мутантного аллеля при концентрации образца не менее 10⁴ копий ДНК/мкл. Следует обратить внимание, что любое значение сигнала, находящееся в диапазоне от 0 до 5% для COLD-ПЦР и от 0 до 7% для AS-ПЦР, следует рассматривать как фоновое и соответствующее образцу, содержащему не более 0,5% мутации, измеренному методикой COLD-ПЦР, и 0,25% — измеренному методикой AS-ПЦР.

Клиническая апробация методик. С использованием всех методик (COLD-ПЦР, AS-ПЦР и формы комплектации № 8 набора реагентов «АмплиСенс Пироскрин») 90 образцов были определены как отрицательные. Результаты исследования остальных 16 образцов приведены в табл. 2.

Методика COLD-ПЦР позволила выявить 13, а методика AS-ПЦР — 15 образцов, в которых были детектированы значения сигнала, соответствующие мутантному аллелю, отличные от LoB. Значения сигналов для образцов, полученные в ходе обогащения мутантной фракцией методом COLD-ПЦР, составили 16—63%, а в ходе обогащения AS-ПЦР — 47—99%. При сравнении двух методик во время тестирования клинического материала получено два дискордантных образца (см. табл. 2).

Обсуждение. Ранее сообщалось, что методика пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 для определения мутации V617F с помощью формы комплектации № 8 набора «АмплиСенс Пироскрин» имеет чувствительность 4% [13], что может быть недостаточно для первичной диагностики ХМО. Изменив условия реакции амплификации, мы разработали две методики, позволяющие проводить обогащение образцов мутантной ДНК и тем самым повышать чувствительность анализа, проводимого с помощью пиросеквенирования. В результате полученных данных AS-ПЦР оказалась более чувствительной по сравнению с COLD-ПЦР (0,25% мутантного аллеля при концентрации 10³ копий ДНК/мкл и 0,5% при концентрации 10⁴ копий ДНК/мкл соответственно). При анализе клинических образцов 15 интерпретированы как положительные после амплификации по методике AS-ПЦР, в то время как после амплификации по методике COLD-ПЦР только 13 образцов определены как положительные.

Поскольку концентрация анализируемого образца служит важным фактором для получения достоверных результатов, особенно при анализе образцов с низкой нагрузкой мутантной ДНК, рекомендуют использование методов выделения, с помо-

Таблица 2

Результаты апробации методик COLD-ПЦР и AS-ПЦР на клинических образцах

Стандартная ПЦР [13]	COLD-ПЦР	AS-ПЦР	Количество образцов
Сомнительный (5—6)	Положительный (24—52)	Положительный (47—99)	4
Отрицательный (0—4)	Положительный (16—63)	Положительный (51—96)	9
Сомнительный (6)	Отрицательный (5)	Положительный (84)	1
Сомнительный (6)	Отрицательный (0)	Отрицательный (4)	1
Отрицательный (0)	Отрицательный (1)	Положительный (55)	1

В скобках указаны значения детектируемой доли мутантного аллеля, %.

щью которых можно получить не менее 10^3 — 10^4 копий ДНК в 1 мкл. Стандартные методы выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием таких наборов, как, например, «РИБО-преп» (Центральный НИИ Эпидемиологии), при объеме элюции 50—100 мкл позволяют получать необходимую для проведения AS-ПЦР и COLD-ПЦР концентрацию образца.

Практическое применение разработанных методик позволило из 106 сомнительных и отрицательных образцов 13 обозначить как истинно положительные, а из 3 образцов, определившихся неоднозначным образом, 2 образца обозначить как положительные (руководствуясь данными о чувствительности AS-ПЦР, полученной на контрольных образцах — см. табл. 1) и 1 образец — как отрицательный. Результаты выявления мутации в положительных образцах подтверждены развитием у пациентов клинической картины ХМО.

Таким образом, выявление мутации позволяет до получения результатов морфологического анализа трепанобиоптатов подтвердить клональный характер заболевания и оценить вероятный прогноз его развития [16]. Отрицательный результат данного молекулярно-генетического теста, хотя не исключает полностью диагноз ХМО, но дает повод для дополнительного обследования с целью исключения вторичного характера патологии (уровень циркулирующего эритропоэтина, мутации в 12 экзоне гена *JAK2*, а также мутаций в генах *CALR* и *MPL*).

Заключение. Предложенные методики AS-ПЦР и COLD-ПЦР позволяют увеличить эффективность амплификации мутантной ДНК в образцах и тем самым повысить чувствительность последующего анализа продуктов амплификации с помощью пиросеквенирования. Методики могут быть рекомендованы в качестве основы для проведения как первичной диагностики ХМО, так и в перспективе скрининговых исследований для выявления тромбогенного риска при сердечно-сосудистых и других соматических заболеваниях. Методики также могут быть использованы в диагностической практике для верификации сомнительных образцов, полученных с применением методик, обладающих чувствительностью более 1%. Использование подобных методов позволит проводить раннюю диагностику и профилактику таких заболеваний, как инсульты головного мозга, венозные тромбозы, в том числе тромбозы висцеральных вен и синдром Бада—Киари, а также определять эффективность элиминации трансформированного клона клеток при терапии ХМО.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Я.А. Войцеховской и М.Л. Маркелову за изготовление контрольных образцов, а также врачам-гематологам Е.В. Васильеву, В.И. Москову и М.А. Михалеву за подбор и клиническую характеристику пациентов.

Финансирование. Клинические исследования осуществлялись при поддержке фонда инноваций РОО «Красноярская краевая ассоциация МедЛабДиагност».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—5, 7—11, 14—15
см. REFERENCES)

6. Ольховский И.А., Столяр М.А. Особенности агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с мутацией в гене *JAK2*: гендерные отличия и эффект аспирина. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(1): 11—4.
12. 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

РугоMark Q24. *Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией*. 2011; 4: 39—48.
13. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Субботина Т.Н., Башмакова Е.Е., Ольховский И.А. и др. Количественное определение мутации V617F в гене *JAK2* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(11): 60—3.
16. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Субботина Т.Н., Столяр М.А. Современные возможности молекулярно-генетического анализа в диагностике хронических миелоидных опухолей. *Медицинский алфавит*. 2015; 4(18): 44—6.

REFERENCES

1. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1): 14—22.
2. Nielsen C., Birgens H.S., Nordestgaard B.G., Bojesen S.E. Diagnostic value of *JAK2* V617F somatic mutation for myeloproliferative cancer in 49 488 individuals from the general population. *Br. J. Haematol.* 2013; 160(1): 70—9.
3. Lippert E., Mansier O., Migeon M., Denys B., Nilsson A., Rosmond C. et al. Clinical and biological characterization of patients with low (0.1—2%) *JAK2*V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. 2014; 99(7): e98—101.
4. Sidon P., Housni E.H., Dessars B., Heimann P. The *JAK2*V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1622.
5. Zhao A.H., Gao R., Zhao Z.J. Development of a highly sensitive method for detection of *JAK2*V617F. *J. Hematol. Oncol.* 2011; 4: 40.
6. Ol'khovskiy I.A., Stolyar M.A. Features of platelet aggregation in patients with *JAK2* gene mutation: gender differences and aspirin effect. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 59(1): 11—4. (in Russian)
7. Milbury C.A., Li J., Liu P., Makrigiorgos G.M. COLD-PCR: improving the sensitivity of molecular diagnostics assays. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011; 11(2): 159—69.
8. Kannim S., Thongnoppakhun W., Auewarakul C.U. Two-round allele specific-polymerase chain reaction: a simple and highly sensitive method for *JAK2*V617F mutation detection. *Clin. Chim. Acta*. 2009; 401(1-2): 148—51.
9. Liu C., Lin J., Chen H., Shang H., Jiang L., Chen J. et al. Detection of Hepatitis B Virus genotypic Resistance Mutations by Coamplification at Lower Denaturation Temperature-PCR Coupled with Sanger Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(8): 2933—9.
10. Chen Q., Lu P., Jones A.V., Cross N.C., Silver R.T., Wang Y.L. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of *JAK2* V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J. Mol. Diagn.* 2007; 9(2): 272—6.
11. Seekhundo S., Thavarungkul P., Chaichanawongsaroj N. Validation of a Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *KRAS* gene Mutations in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues from Colorectal Cancer Patients. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0147672.
12. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Dedkov V.G., Shipulin G.A. Detection of genetic polymorphisms using genetic analysis system based on pyrosequencing method PyroMark Q24. *Spravochnik zaveduyushchego kliniko-diagnosticheskoy laboratorii*. 2011; 4: 39—48. (in Russian)
13. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Subbotina T.N., Bashmakova E.E., Ol'khovskiy I.A. et al. Quantitative detection V617F *JAK2* mutation by pyrosequencing. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(11): 60—3. (in Russian)
14. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29 Suppl 1: S49—52.
15. Lipsky R.H., Mazzanti C.M., Rudolph J.G., Xu K., Vyas G., Bozak D. et al. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clin. Chem.* 2001; 47(4): 635—44.
16. Ol'khovskiy I.A., Gorbenko A.S., Subbotina T.N., Stolyar M.A. Modern possibilities of molecular genetic analysis in diagnostics of chronic myeloid neoplasm. *Meditsinskiy alfavit*. 2015; 4(18): 44—6. (in Russian)

Поступила 15.07.16

Принята к печати 01.08.16