

Ivana Horvat*
Ana Boban**
Margareta Radić Antolic***
Pavle Rončević****
Renata Zadro*****

DVIJE KVANTITATIVNE METODE ZA MJERENJE OPTEREĆENJA MUTIRANIM ALELOM V617F U GENU ZA JAK2: USPOREDBA REZULTATA

Sažetak

Mutacija V617F u genu *JAK2* glavna je oznaka Philadelphia negativnih mijeloproliferacijskih zloćudnih tumora (MPN). Zbog brojnih različitih kvantitativnih metoda koje nisu davale usporedive rezultate, organizacije European LeukemiaNet i MPN&MPNr-Euronet pokrenule su standardizaciju osiguravši komercijalno dostupne standarde Svjetske zdravstvene organizacije za kvantifikaciju opterećenja mutiranim alelom V617F. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti rezultate dobivene s dvjema najčešće korištenim kvantitativnim metodama, QIAGEN Mutaquant kit i interno razvijenom metodom koju su objavili Larsen et al. 2007. Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom provedena je u uzorcima DNK 101 *JAK2* V617F pozitivnog bolesnika pomoću *JAK2* MutaQuant i interno razvijene RQ-PCR metode. Usporedba metoda pokazala je da nema statistički značajne razlike između rezultata u svakoj podskupini MPN bolesnika kao ni kad su se rezultati podijelili u četiri različita raspona opterećenja mutiranim alelom V617F. Statistička analiza je pokazala da ne postoji stalna i proporcionalna sustavna pogreška između dviju uspoređenih metoda te da se obje metode mogu koristiti naizmjenično u rutinskoj praksi.

* Ivana Horvat, specijalist med. biokemije i laboratorijske medicine, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

** doc. dr. sc. Ana Boban, doktor medicine, specijalist hematolog, Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb i Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet

*** Margareta Radić Antolic, specijalist med. biokemije i laboratorijske medicine, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

**** Pavle Rončević, dr. medicine, specijalist hematolog, Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

***** prof. dr. sc. Renata Zadro, specijalist med. biokemije i laboratorijske medicine, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb i Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ključne riječi: kvantifikacija mutacije V617F, PCR u stvarnom vremenu, usporedba metoda, MutaQuant kit, interno razvijena metoda

1. Uvod

Četiri različite skupine istraživača otkrile su 2005. istu točkastu mutaciju u pseudo-kinaznoj domeni gena Janus kinaza 2 (*JAK2*), tj. NM_004972.3(*JAK2*):c.1849 G>T(p. Val617Phe), u većini bolesnika s Philadelphia (Ph) negativnim mijeloproliferativnim zloćudnim tumorima (engl. *myeloproliferative neoplasms*, MPN) (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005). Do tada za bolesnike s MPN-om nije bio dostupan molekularni biljeg koji bi potvrdio njihovu dijagnozu, pa je ta mutacija postala glavnom oznakom te bolesti. Mutacija *JAK2* V617F ustanovljena je u 97 % bolesnika s policitemijom verom (PV), 57 % bolesnika s esencijalnom trombocitemijom (ET) i u 50 % bolesnika s primarnom mijelofibrozo (PMF) (Baxter et al., 2005). Zbog velike zainteresiranosti istraživača razvijene su metode za što jednostavnije dokazivanje spomenute mutacije (Steensma et al., 2006), a uskoro su nakon uvođenja interno razvijenih kvalitativnih metoda postale dostupne i komercijalne metode. Pretpostavljalo se da će ne samo prisutnost te mutacije nego i hipoteza „gen – doziranje” ili opterećenje mutiranim alelom pružiti nove informacije o bolesti te moći objasniti kako ista mutacija može doprinijeti razvoju triju različitih podskupina bolesti MPN-a (Passamonti et al., 2009; Vannucchi et al., 2011). Zbog toga su istraživači počeli razvijati metode za određivanje opterećenja mutiranim alelom V617F (Larsen et al., 2007; Tanaka et al., 2008; Morishita et al., 2011; Zapparoli et al., 2013). To su bile interno razvijene analize za koje su optimizacija i standardizacija bile nužne. Na tržištu su se također pojavile komercijalne kvantitativne metode za određivanje opterećenja mutiranim alelom V617F (Shammaa et al., 2010). Zbog brojnih različitih kvantitativnih metoda koje nisu davale usporedive rezultate (Lippert et al., 2009) istraživači u organizacijama European LeukemiaNet i MPN&MPNr-Euronet uložili su napore da bi proizveli standarde i uputili ih na provjeru u nekoliko laboratorija. Kao posljedica toga Nacionalni zavod za biološke standarde i kontrolu (engl. *National Institute for Biological Standards and Control*, NIBSC) uveo je 2016. godine u uporabu komercijalno dostupan prvi međunarodni referentni set standarda Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) za genomsku mutaciju *JAK2* V617F. Iako je set standarda SZO-a dostupan na tržištu, usporedba kvantitativnih rezultata za V617F dobivenih različitim kvantitativnim metodama još uvijek je u središtu pažnje istraživača, kao što je 2019. pokazano u jednom međunarodnom istraživanju (Asp et al., 2019). Cilj je ovoga istraživanja na velikom broju uzoraka usporediti rezultate dobivene najčešće korištenim metodama za kvantifikaciju opterećenja mutiranim alelom *JAK2* V617F, komercijalno

dostupnim kompletom Qiagen MutaQuant te interno razvijenom metodom Larsena et al. (Larsen et al., 2007).

2. Materijali i metode

Studija je provedena u Kliničkome bolničkom centru Zagreb između svibnja 2013. i kolovoza 2017., a uporabljen je 101 uzorak MPN-a pozitivan na *JAK2* V617F od bolesnika dijagnosticiranih prema klasifikaciji SZO-a iz 2008. Bolesnici su bili podijeljeni prema vrsti dijagnoze na 48 bolesnika s ET (38 ženskih i 10 muških, medijan dobi 54 godine, raspon 23 – 82 godine); 35 bolesnika s PV (17 ženskih i 18 muških, medijan dobi 65 godina, raspon 31 – 84 godine) i 18 bolesnika s PMF (9 ženskih i 9 muških, medijan dobi 63 godine, raspon 38 – 80 godina). Studiju je odobrio Etički odbor KBC-a Zagreb. Pristanak bolesnika dobiven je za uzimanje 10 ml krvi s EDTA. Uzorak krvi podijeljen je u dva dijela: prvi je dio bio korišten za ekstrakciju genomske DNK-a i kvalitativni PCR prema Baxteru i dr. (Baxter et al., 2005), a drugi za izdvajanje granulocita centrifugiranjem u gradijentu gustoće s Polymorphprep, Alere Technologies AS (Norveška) te zatim za ekstrakciju DNK-a i mjerenje opterećenja mutiranim alelom V617F primjenom dviju kvantitativnih metoda. Ekstrakcija DNK-a iz pune krvi i granulocita provedena je uporabom standardne metode izoliranja (Miller et al., 1988).

2.1. Komercijalna metoda

Mjerenje opterećenja mutiranim alelom provedeno je pomoću komercijalno dostupnog IVD kompleta Ipsogen *JAK2* MutaQuant, Qiagen (Njemačka), na uređaju Light Cycler 2.0 tvrtke Roche (Švicarska), a temelji se na načelu kvantitativne metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RQ-PCR) primjenom hidrolizirajućih sonde. Mjerenje je obavljeno prema opisu u protokolu proizvođača uporabom smjese LightCycler FastStartDNA MasterPLUS HybProbe Mix, Roche, te 25 ng DNK-a po uzorku; to je uključivalo dvije odvojene reakcijske smjese, tj. za divlji tip i alel V617F. Komplet uključuje i četiri standarda za divlji tip i četiri za V617F (oba s 50, 500, 5000 i 50 000 kopija). Nakon što su izrađene standardne krivulje, broj ciklusa u kojem je količina otpuštene fluorescencije veća od pozadinske fluorescencije (engl. *cycle threshold*, CT) rabljen je za apsolutno mjerenje broja kopija divljeg tipa i alela V617F. Svi su standardi i uzorci analizirani u duplikatu, a medijan rezultata u duplikatu korišten je za usporedbu. Rezultati su izraženi kao postotak *JAK2* V617F primjenom formule: $JAK2\ V617F\ \% = \text{broj kopija } JAK2\ V617F / (\text{broj kopija divljeg tipa } JAK2 + \text{broj kopija } JAK2\ V617F) \times 100$. Svaka je serija uključivala pozitivnu i negativnu kontrolu koje su također dio kompleta MutaQuant.

2.2. Interno razvijena metoda

Metoda koja se koristila za usporedbu bila je metoda RQ-PCR temeljena na Taqmanu koju su razvili Larsen i suradnici (Larsen et al., 2007), a koja uključuje dvije odvojene reakcije za divlji tip i alel V617F sa zajedničkom početnicom i zajedničkom sondom FAM te uporabom dviju početnica od kojih je jedna specifična za divlji tip, a druga za alel V617F. Analiza se provodi na uređaju tvrtke Applied Biosystems 7500, Foster City, CA (SAD), primjenom kompatibilne PCR reakcijske smjese TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, Applied Biosystems. Za pripremu standardne krivulje rabljeno je pet standarda koje je distribuirao MPN&MPNr-Euronet, a koji sadržavaju 21 500 kopija divljeg tipa i 64 500, 6450, 645, 64,5 i 0 kopija alela V617F, kako bi se izračunao postotak *JAK2* V617F (tj. 75 %, 23 %, 3 %, 0,3 % i 0 %, slijedom). Standardna krivulja dobivena je iz CT vrijednosti standarda, a nakon mjerenja postotak *JAK2* V617F izračunat je prema istoj formuli kao za opisanu komercijalnu metodu. Svi su standardi i uzorci analizirani u duplikatu, a medijan rezultata u duplikatu koristio se za usporedbu.

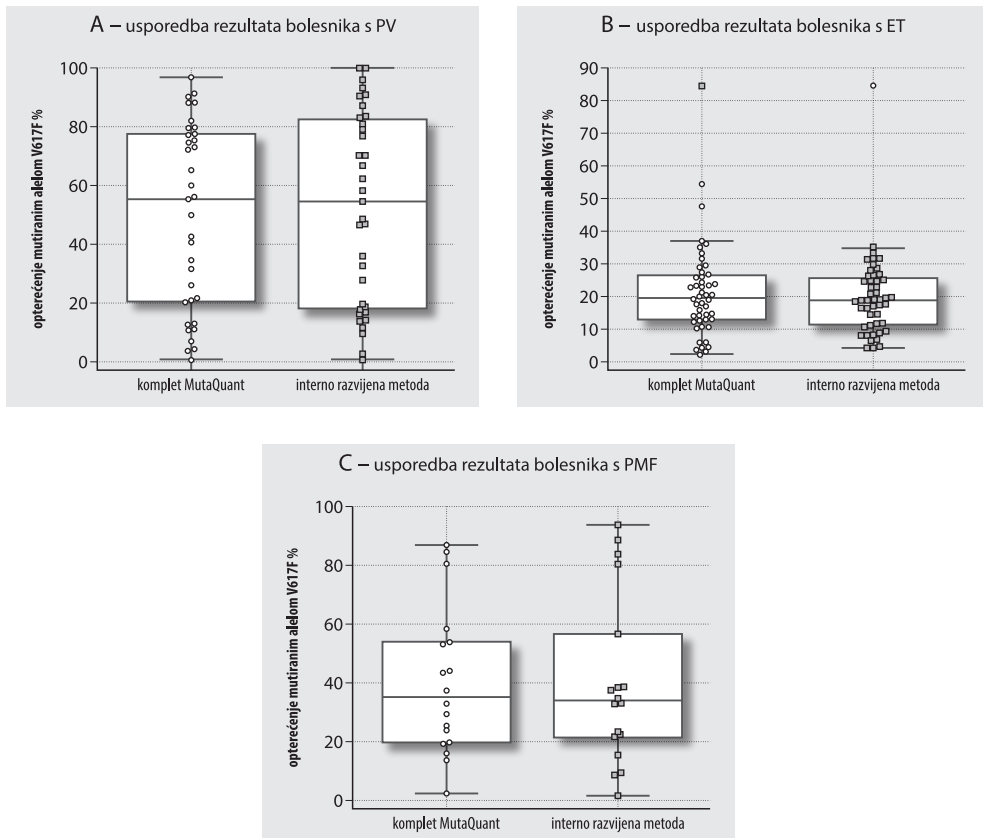
Usporedba metoda provedena je prema dokumentu CLSI EPO9-A3 (https://clsi.org/media/1435/ep09a3_sample.pdf). S obzirom na to da je validiran od proizvođača, komplet MutaQuant poslužio je kao referentna metoda. Statistička analiza provedena je primjenom programa MedCalc Version 17.2., a vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Raspodjela podataka u rezultatima analizirana je s pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Budući da podaci nisu bili normalno raspodijeljeni, primijenjen je Wilcoxonov test za parne uzorke te su podaci iz rezultata prikazani kao raspon medijana i interkvartila (IQR). Usporedba metoda provedena je Passing-Bablokovom analizom stalnih i proporcionalnih sustavnih pogrešaka, dok je Bland-Altmanov dijagram rabljen za procjenu sukladnosti između dviju metoda. Učinkovitost PCR metoda izračunata je formulom $E = 10^{-(1/\text{slope})} - 1$.

3. Rezultati

Rezultati usporedbe metoda svih triju podskupina bolesnika prikazane su na slici 1. U skupini bolesnika s PV, kompletom MutaQuant dobiven je medijan za opterećenje mutiranim alelom od 55,3 %, IQR 20,4 – 77,3 %, dok je medijan dobiven interno razvijenom metodom iznosio 54,5 %, a IQR 18,0 – 82,4 % (slika 1A). Nije bilo statistički značajne razlike između rezultata ($p = 0,269$). Vrlo nisko opterećenje mutiranim alelom, tj. vrijednosti 0,61 % te 0,50 %, dobivene su za jednog bolesnika s PV primjenom kompleta MutaQuant te interno razvijenom metodom. Za bolesnike s ET medijan rezultata dobiven s kompletom MutaQuant bio je 19,2 %, IQR 13,0 – 25,3 %, a s interno razvijenom metodom 18,9 %, IQR 11,4 – 25,6 % (slika 1B). Rezultati nisu bili statistič-

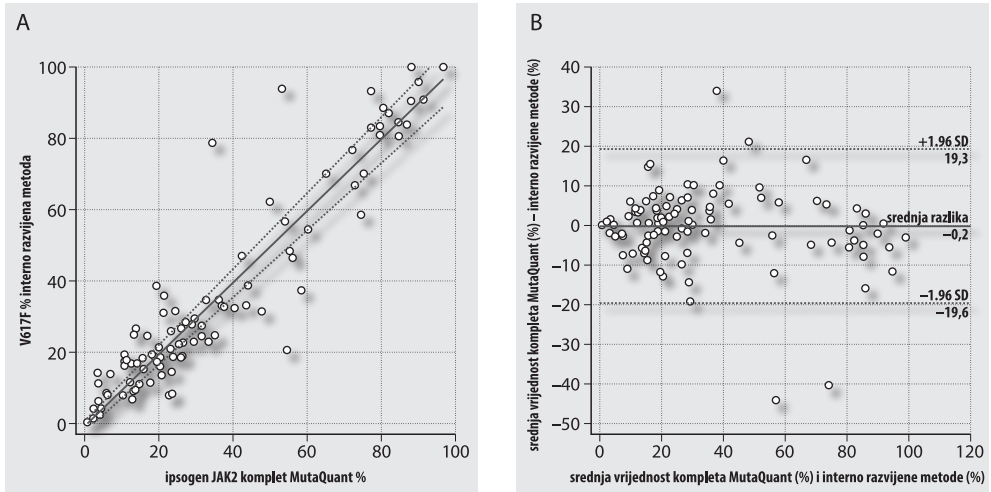
ki značajno različiti ($p = 0,495$). U skupini bolesnika s PMF za opterećenje mutiranim alelom je s kompletom MutaQuant dobiven medijan rezultata 35,2 %, IQR 19,9 – 54,0 %, a s interno razvijenom metodom 34,1 %, IQR 21,5 – 56,7 %, tj. bez statistički značajne razlike između rezultata ($p = 0,265$) (slika 1C).

Slika 1. Box-Whiskerov dijagram za usporedbu A – rezultata za PV, B – rezultata za ET, C – rezultata za PMF.



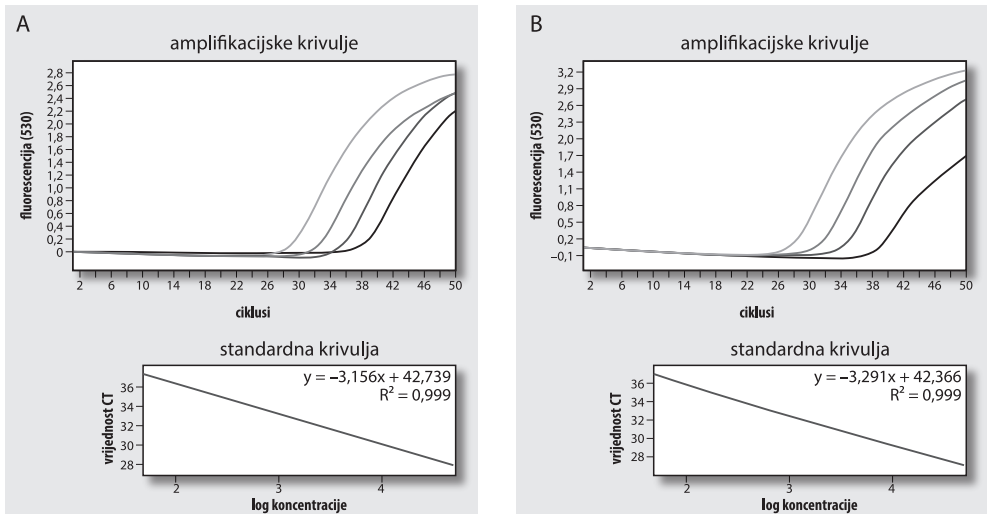
Nadalje, ispitano je slaganje rezultata između dviju metoda u različitim kvartilima opterećenja mutiranim alelom V617F. U tu su svrhu rezultati dobiveni objema metodama podijeljeni u četiri različita raspona (0 – 25%, 25 – 50%, 50 – 75% i 75 – 100%) te uspoređeni pri čemu je MutaQuant komplet smatran referentnom metodom. Rezultati su prikazani u tablici 1 (na kraju rada) te pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike ni u jednom od ispitivanih raspona. Passing-Bablokova regresijska analiza svih rezultata dokazala je da ne postoji stalna i proporcionalna sustavna pogreška između dviju uspoređenih metoda (odsječak na osi Y $-0,4522$, 95 % CI = $-1,88 - 0,67$; nagib 1,00, 95 CI% = $0,95 - 1,07$) (slika 2A). Bland-Altmanov dijagram nije pokazao razlike u rezultatima (slika 2B).

Slika 2. A – Passing-Bablokov regresijski pravac; puna crta predstavlja pravac regresije, a interval pouzdanosti prikazan je isprekidanom crtom; **B** – Bland-Altmanov dijagram raspršenja



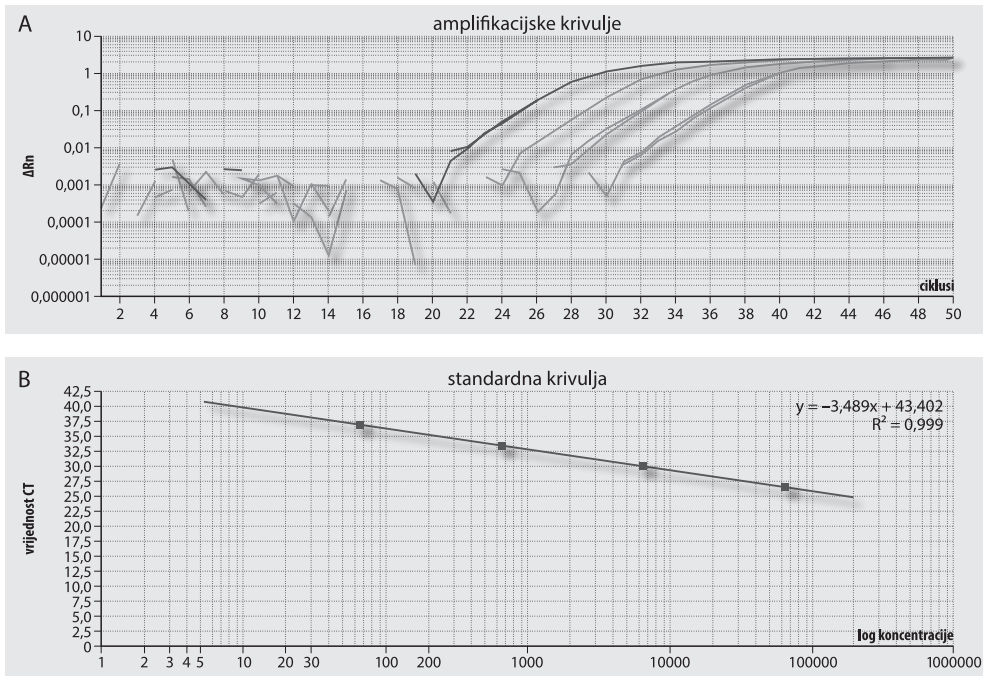
Za komplet MutaQuant, krivulje umnažanja standarda razrijeđenih deset puta i standardna krivulja za divlji tip i alel V617F prikazane su na slici 3.

Slika 3. A – Amplifikacijske krivulje za deset puta razrijeđene standarde te standardna krivulja s nagibom i odsječkom na osi Y, iscrtane na temelju vrijednosti CT za divlji tip *JAK2* primjenom kompleta MutaQuant; **B** – amplifikacijske krivulje za deseterostruke razrijeđene standarde i standardna krivulja s nagibom i odsječkom na osi Y, iscrtane na temelju vrijednosti CT za alel V617F primjenom kompleta MutaQuant



Učinkovitost PCR-a za divlji tip te alel V617F iznosila je 107 % i 101 %. Za interno razvijenu metodu krivulje umnažanja standarda razrijeđenih deset puta i standardna krivulja za alel V617F prikazane su na slici 4.

Slika 4. A – Amplifikacijske krivulje deseterostruko razrijeđenih standarda; **B** – standardna krivulja s nagibom i odsječkom na osi Y, iscrtane na temelju vrijednosti CT za *JAK2* V617F primjenom interno razvijene metode.



Učinkovitost reakcije PCR za opterećenje mutiranim alelom V617F određena interno razvijenom metodom iznosila je 93 %.

4. Rasprava

Otkriće mutacije V617F u genu *JAK2* 2005. bilo je od velike važnosti jer je ta mutacija glavno obilježje Ph-negativnih MPN i ubrzo je uključena u klasifikaciju SZO-a i dijagnozu mijeloproliferacijskih zloćudnih tumora kao jedan od glavnih kriterija za bolesnike s PV, ET i PMF (Tefferi et al., 2008). Otad su otkrivene i različite mutacije u podskupinama tih bolesnika, no mutacija V617F u genu *JAK2* ostala je najčešće analizirani molekularni biljeg u MPN (Gángó et al., 2018; Ferreira Sergio et al., 2018). To je ujedno otvorilo nova pitanja o kliničkome i prognostičkom značenju opterećenja mutiranim alelom V617F u svakoj podskupini bolesnika s MPN-om te je posljednično dovelo do razvoja kvantitativnih metoda za praćenje tog opterećenja u genu *JAK2*. Budući da te metode rabe različite standarde, početnice, sonde i uređaje, zapažena je nesukladnost rezultata među laboratorijima (Lippert et al., 2009). Zbog toga su organizacije European LeukemiaNet i MPN&MPNr-Euronet započeli standardizaciju metoda da bi osigurali standarde koji će biti komercijalno dostupni svim laboratorijima

zainteresiranima za mjerenje opterećenja mutiranim alelom, a ujedno su započeli s predlaganjem najbolje analitičke metode za mjerenje.

Poduzimanjem tih aktivnosti ostvarena je prilika za mjerenje ne samo dijagnostičkih uzoraka nego i uzoraka uzimanih tijekom praćenja bolesti u kojima se opterećenje mutiranim alelom moglo smanjiti zbog terapije (Larsen et al., 2013) ili povećati zbog napredovanja bolesti (Latagliata et al., 2018) ili se moglo koristiti kao biljeg minimalne ostatne bolesti nakon presađivanja matičnih stanica (Shah et al., 2018). Za tu su svrhu razvijeni komercijalni kompleti reagencija kao najlakši način za dobivanje rezultata za opterećenje mutiranim alelom V617F. U studiji koju je podržala tvrtka Qiagen, a koja je uključivala 19 talijanskih laboratorija, ispitivala se učinkovitost kompleta MutaQuant u usporedbi s nekoliko različitih kvalitativnih ili kvantitativnih metoda (Perricone et al., 2017). Zaključak studije bio je da je komplet MutaQuant, zajedno s drugim dvjema kvalitativnim metodama, dovoljno osjetljiv da bi odredio nisko opterećenje alelom V617F od 1 %. To je pouzdana analiza koja ima usporedive rezultate na različitim uređajima te omogućuje učinkovito i osjetljivo mjerenje različitih postotaka opterećenja mutiranim alelom.

Zbog financijskih troškova za komercijalno dostupne komplete reagencija nekoliko je istraživača započelo razvijati svoje vlastite metode za mjerenje opterećenja mutiranim alelom. Međunarodna studija koja je obuhvatila 12 laboratorija ispitala je 2013. devet različitih kvantitativnih metoda za mjerenje opterećenja mutiranim alelom (Jovanovic et al., 2013). Zaključak te studije bio je da je interno razvijena metoda Larsena i suradnika (Larsen et al., 2007) najpouzdanija metoda čiji su rezultati bili usporedivi među različitim uređajima i s različitim postotkom opterećenja mutiranim alelom. Ta se metoda također pokazala optimalnom za praćenje minimalne ostatne bolesti. Na temelju tih dviju velikih studija koje su potvrdile pouzdanost dviju različitih metoda, naš je cilj bio usporediti rezultate dobivene komercijalno dostupnim kompletom MutaQuant proizvođača Qiagen s interno razvijenom metodom (Larsen et al., 2007) na različitim uređajima. Rezultati za opterećenje mutiranim alelom V617F dobiveni objema kvantitativnim metodama za svaku podskupinu bolesnika s MPN slični su onima koje su zapazili ostali istraživači (Carobbio et al., 2009; Takahashi et al., 2013; Barosi et al., 2017). Rezultati usporedbe metoda pokazali su da je u svakoj podskupini bolesnika s MPN-om dobiven usporediv rezultat za medijan bez statistički značajne razlike. Kad su rezultati podijeljeni prema kvartilima opterećenja mutiranim alelom, također nije utvrđena statistički značajna razlika između rezultata. Ta je činjenica potkrijepljena Passing-Bablokovom regresijskom analizom koja nije pokazala stalnu i proporcionalnu sustavnu pogrešku, a Bland-Altmanovom analizom nije ustanovljena razlika u rezultatima između metoda. Amplifikacijske i standardne krivulje pokazale su odličnu povezanost između broja kopija gena i CT vrijednosti za razrijeđene standarde za alel V617F i za divlji tip *JAK2*, s time da su točke standardne kri-

vulje bile u liniji pravca, a učinkovitost PCR-a bila je 100 % i vrijednosti odsječka na osi Y bile su slične za komplet MutaQuant i interno razvijenu metodu. Iako se osjetljivost metoda nije procjenjivala, dobiveni rezultat za opterećenje mutiranim alelom za jednog bolesnika s PV bio je ispod 1 % primjenom obiju metoda, što je u skladu s već objavljenom osjetljivošću za komplet MutaQuant (Perricone et al., 2017) i osjetljivost metode Larsena i suradnika (Jovanovic et al., 2013). U skladu s našim rezultatima Asp i suradnici (Asp et al., 2019) nedavno su pokazali rezultate studije s ukupno 16 uzoraka koji su bili poslani laboratorijima koji rabe različite metode i instrumente i koji su potvrdili da su rezultati dobiveni metodom Larsena i suradnika (Larsen et al., 2007) te primjenom kompleta MutaQuant usporedivi.

Prema našim informacijama ovo je prva studija s više od 100 različitih uzoraka bolesnika koja je usporedila rezultate dobivene dvjema najčešće korištenima kvantitativnim metodama.

5. Zaključak

Rezultati ove studije potvrdili su na širokom nizu različitih postotaka opterećenja mutiranim alelom u 101 uzorku bolesnika pozitivnih na *JAK2* V617F da nije bilo statistički značajne razlike između rezultata dobivenih primjenom dviju kvantitativnih metoda na različitim uređajima. Stoga se može zaključiti da se i jedna i druga metoda mogu koristiti u rutinskom radu. Takva je spoznaja važna za sve laboratorije koji planiraju uvesti kvantitativne metode za mjerenje opterećenja mutiranim alelom V617F u svoju ponudu laboratorijskih pretraga, kao i za one koji već primjenjuju bilo koju od ovdje istraživanih metoda.

Tablica 1. Usporedba rezultata podijeljenih u četiri različita raspona opterećenja mutiranim alelom V617F dvjema ispitivanim metodama

Opterećenja alelom V617F	Komplet Mutaquant		Interno razvijena metoda		Vrijednost p
	Medijan (%)	IQR* (%)	Medijan (%)	IQR (%)	
0 – 25 %	14,3	10,6 – 20,5	16,0	9,0 – 19,6	0,493
25 – 50 %	33,2	27,3 – 42,5	30,6	24,9 – 34,8	0,115
50 – 75 %	62,7	55,3 – 74,7	62,4	48,4 – 76,7	0,173
75 – 100 %	85,8	81,4 – 89,2	89,5	84,2 – 94,6	0,064

Zahvala

Autori zahvaljuju prof. dr. sc. Rajku Kušecu za dio reagensa upotrebljenih za interno razvijenu metodu.

* IQR – interkvartilni raspon

Literatura

1. Asp, J. et al. 2019. International external quality assurance of JAK2 V617F quantification. *Ann Hematol.*, 98 (5): 1111–1118.
2. Barosi, G. et al. 2017. Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2 V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease. *Leuk Res.*, 60: 18–23.
3. Baxter, E. J. et al. 2005. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365 (9464): 1054–1061.
4. Carobbio, A. et al. 2009. JAK2V617F allele burden and thrombosis: A direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*, 37 (9): 1016–1021.
5. Ferreira Sergio, C. et al. 2018. Somatic Mutations in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Semin Hematol*, 55 (4): 215–222.
6. Gángó, A. et al. 2018. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res.*, 65: 42–48.
7. James, C. et al. 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 434: 1144–1148.
8. Jovanovic, J. et al. 2013. Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-r-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia*, 27: 2032–2039.
9. Kralovics, R. et al. 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.*, 352: 1779–1790.
10. Larsen, T. S. et al. 2007. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*, 136 (5): 745–751.
11. Larsen, T. S. et al. 2013. Long term molecular responses in a cohort of Danish patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis treated with recombinant interferon alpha. *Leuk Res.*, 37 (9): 1041–1045.
12. Latagliata, R. et al. 2018. Comparison of JAK2 V617F -positive essential thrombocythaemia and early primary myelofibrosis: The impact of mutation burden and histology. *Hematol Oncol.*, 36 (1): 269–275.
13. Levine, R. R. et al. 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7 (4): 387–397.
14. Lippert, E. et al. 2009. Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: A multicenter study. *Haematologica*, 94: 38–45.
15. Miller, S. A. et al. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16 (3): 1215.
16. Morishita, S. et al. 2011. Alternately binding probe competitive PCR as a simple, cost-effective, and accurate quantification method for JAK2V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res.*, 35 (12): 1632–1636.
17. Passamonti, F. i Rumi, E. 2009. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica*, 94: 7–10.
18. Perricone, M. et al. 2017. Assessment of the interlaboratory variability and robustness of JAK2V617F mutation assays: A study involving a consortium of 19 Italian laboratories. *Oncotarget*, 8: 32608–32617.

19. Shah, M. V. et al. 2018. Sensitive PCR-based monitoring and early detection of relapsed JAK2 V617F myelofibrosis following transplantation. *Br J Haematol.*, 183 (5): 831–835.
20. Shammaa, D. et al. 2010. JAK2 V617F mutation detection: laboratory comparison of two kits using RFLP and qPCR. *Genet Test Mol Biomarkers.*, 14 (1): 13–15.
21. Steensma, P. D. 2006. JAK2 V617F in myeloid disorders: Molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *J Mol Diagnostics*, 8 (4): 397–411.
22. Takahashi, K. et al. 2013. JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 122: 3784–3786.
23. Tanaka, R. et al. 2008. Fully automated and super-rapid system for the detection of JAK2V617F mutation. *Leuk Res.*, 32 (9): 1462–1467.
24. Tefferi, A. i Vardiman, J. W. 2008. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, 22: 14–22.
25. Vannucchi, M. A. et al. 2011. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. *Ther Adv Hematol.*, 2 (1): 21–32.
26. Zapparoli, V. G. et al. 2013. Quantitative threefold allele-specific PCR (QuanTAS-PCR) for highly sensitive JAK2 V617F mutant allele detection. *BMC Cancer*, 13: 206.

Internetski izvori

27. CLSI document EP09-A3 (2013): measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline, 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. https://clsi.org/media/1435/ep09a3_sample.pdf



Two quantitative methods for measurement of V617F allele burden in *JAK2* gene: comparison of results

Abstract

Mutation V617F in the *JAK2* gene is the hallmark of Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPN). Due to numerous different V617F allele burden quantitative methods giving discrepant results, European LeukemiaNet and MPN&MPNr-Euronet initiated standardization, providing commercially available WHO-standards for V617F allele burden quantification. The aim of this study was to compare the results obtained by the most frequently used quantitative methods, QIAGEN Mutaquant kit and an in-house method by Larsen et al (2007). Quantification of allele burden was performed on DNA samples from 101 *JAK2* V617F positive patients with *JAK2* MutaQuant and with in-house RQ-PCR method. The comparison of methods showed results without statistically significant difference in each subgroup of MPN patients. When the results were divided according to quartiles of V617F allele burden, there was no statistically significant difference between MutaQuant and the in-house method. Statistical analysis showed no constant and proportional bias and no difference in method results. Efficiency of both methods was 100%. This study revealed that both methods can be used interchangeably in routine practice.

Keywords: V617F mutation quantification; real time quantitative PCR; comparison of methods; MutaQuant kit; in-house method