

DÜŞÜK VE YÜKSEK JAK2V617F ALLEL YÜKÜ OLAN MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİ ÖN TANILI HASTALARIN KLİNİK VE HEMATOLOJİK PARAMETRELER AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF PATIENTS WITH PRE-DIAGNOSIS OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM PATIENTS WITH LOW AND HIGH JAK2V617F ALLELE BURDEN IN TERMS OF CLINICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS

Özgür ERKAL¹, Barış PAKSOY¹, Püsem PATİR²

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Bölümü

ÖZET

AMAÇ: JAK2^{V617F} mutasyonu pozitifliği kronik miyeloproliferatif neoplazilerin (KMPN) tanısı için ana kriterdir. Mutasyon yükünün belirlenmesi çoğu moleküler laboratuvarında standart bir tanı prosedürü haline gelmiştir, ancak KMPN tanısı için bir sınır değer belirtilmemektedir. Burada, JAK2^{V617F} mutasyon yükü düşük ve yüksek olan miyeloproliferatif neoplazi ön tanılı hastaların klinik ve hematolojik parametreler açısından karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi tıbbi genetik kliniğinde 2019 - 2021 yılları arasında JAK2^{V617F} mutasyonu pozitif olan 95 hasta retrospektif olarak analiz edildi.

BULGULAR: Allel yükü düşük ($\leq 3\%$) olan 46 hastanın %64'ü KMPN fenotipine sahipken, yüksek allel yükü ($> 3\%$) olan 49 hastanın %100'ü KMPN fenotipine sahipti. Her iki grup arasında eritrosit sayısı, hemoglobin düzeyi, ortalama eritrosit hacimleri arasında istatistiksel bir fark bulunmazken; lökosit, nötrofil ve trombosit yüksekliği JAK2^{V617F} allel yükü $> 3\%$ olan grup lehine istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.007$; $p<0.001$; $p<0.001$).

SONUÇ: Düşük allel yüklü JAK2^{V617F} mutasyonunun günlük klinik uygulamada yorumlanması zor olmakla birlikte tüm pozitif hastalara hematolojik tanı konmamıştır. Allel yükü $> 3\%$ olan tüm hastalara KMPN tanısı konulmuştur; bu nedenle, bu sınırın üzerindeki bir mutasyon yükü, miyeloproliferatif bir hastalığın varlığın göstergesi olarak kabul edilebilir. Düşük allel yüklü JAK2^{V617F} mutasyonuna yaklaşımı tanımlamak için standardize edilmiş moleküler yöntemlerle prospektif olarak incelenen daha büyük hasta gruplarına sahip çalışmalara ihtiyaç vardır.

ANAHTAR KELİMELELER: Miyeloproliferatif bozukluklar, JAK2 protein, Alleller.

ABSTRACT

OBJECTIVE: JAK2^{V617F} mutation positivity is the main criterion for the diagnosis of chronic myeloproliferative neoplasms (CMPN). Determination of allele burden has become a standard diagnostic procedure in most molecular laboratories, but no cutoff value is specified for the diagnosis of CMPN. Herein, comparison of myeloproliferative neoplasia prediagnosed patients with low and high JAK2^{V617F} allele burden in terms of clinical and hematological parameters were aimed.

MATERIAL AND METHODS: Ninety-five patients with positive JAK2^{V617F} mutation in the Medical Genetics Clinic of Health Sciences University Antalya Training and Research Hospital between 2019-2021 were analyzed retrospectively.

RESULTS: Sixty four percent of 46 patients with low allele burden ($\leq 3\%$) had the CMPN phenotype, while 100% of 49 patients with high allele burden ($> 3\%$) had the CMPN phenotype. There was no statistically significant difference between the two groups in terms of erythrocyte count, hemoglobin level, and mean erythrocyte volumes, however leukocyte, neutrophil and platelet elevations were found to be statistically significant in favor of the group with JAK2^{V617F} allele burden $> 3\%$ ($p=0.007$; $p<0.001$; $p<0.001$).

CONCLUSIONS: Although the low allele burden JAK2^{V617F} mutation is difficult to interpret in daily clinical practice, not all positive patients have a hematological diagnosis. All patients with an allele burden $> 3\%$ were diagnosed with CMPN; therefore, an allele burden above this limit can be considered as an indicator of the presence of a myeloproliferative disease. Studies with larger patient cohorts prospectively examined using standardized molecular methods are needed to define the approach to the low allele burden JAK2^{V617F} mutation.

KEYWORDS: Myeloproliferative disorders, JAK2 protein, Alleles.

Geliş Tarihi / Received: 21.02.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 10.05.2023

Yazışma Adresi / Correspondence: Uzm. Dr. Püsem PATİR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Bölümü

E-mail: pusemp@yahoo.com

Orcid No (Sirasıyla): 0000-0003-1059-8774, 0000-0002-5101-2939, 0000-0001-5201-4680

Etik Kurul / Ethical Committee: Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (26.01.2023/2-15).

GİRİŞ

2008 yılında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırması, JAK2^{V617F} mutasyonunun pozitifliğini kronik miyeloproliferatif neoplazilerin (KMPN), özellikle Esansiyel Trombositemi (ET), Polisitemi Vera (PV) ve Miyelofibrozun (MF) tanısı için ana kriter olarak göstermiştir (1 - 7). JAK2^{V617F} mutasyonu, ET ve MF hastalarının yaklaşık %50-60'ında ve PV'li hastaların çoğunda (%95) saptanır (8, 9). Ayrıca JAK2^{V617F} mutasyonu diğer hematolojik malignitelerde de bulunabilir. Bu benzersiz JAK2^{V617F} mutasyonunun varlığı nadiren de olsa kronik miyelomonositik lösemide, atipik veya sınıflandırılmamış miyeloproliferatif hastalıklarda, miyelodisplastik sendromda, sistemik mastositozda ve kronik nötrofilik lösemide bildirilmiştir (10 - 15). JAK2^{V617F} allel yükünün %50'nin üzerinde olması hem ET'de hem de PV'de daha yüksek trombotik riske sahip hastaları tanımlamaktadır (16 - 21). Aksine, düşük bir allel yük, MF'de önemli ölçüde kısalmış sağkalım ve lösemiden bağımsız sağkalım ile ilişkili görünmektedir (22 - 24). Sonuç olarak, mutasyon yükünün belirlenmesi çoğu moleküler laboratuvar standart bir tanı prosedürü haline gelmiştir, ancak DSÖ kriterleri KMPN tanısı için bir sınır değer belirtmemektedir. Son yıllarda, yüksek duyarlılığa sahip moleküler tekniklerin [özellikle allele özgü "Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu" (RT-qPCR)] yaygın kullanımı, allel yükü %1'in altında olan mutasyona uğramış küçük klonları saptama yeteneğini önemli ölçüde arttırmıştır (25 - 31). Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, küçük bir klonal hematopoezin, sağlıklı bireylerde de düşük seviyede (%0.03-1) mevcut olabileceğini göstermiştir (32 - 37). Buna göre, JAK2^{V617F} mutasyonlu küçük bir klonun saptanmasının, malign miyeloproliferasyon oluşturmak için yeterli bir kanıt teşkil edemeyeceği ileri sürülmüştür (38). Sonuç olarak, JAK2^{V617F} mutasyonunun düşük allel yükünün klinik yorumu zor olabilmektedir. Burada, JAK2^{V617F} mutasyonları pozitif olan KMPN ön tanılı hastalar, düşük ($\leq 3\%$) ve yüksek allel yük olarak gruplandırılarak, klinik ve laboratuvar verileri incelendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar: Bu tek merkez retrospektif klinik çalışmaya 2019 - 2021 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştır-

ma Hastanesi Tıbbi Genetik Kliniği'ne KMPN ön tanısı ile JAK2^{V617F} mutasyon analizi yapılması için gönderilen kan örneklerinden allel yük tespit edilen 95 hasta dahil edildi. Tüm mutasyon çalışmaları uluslararası önerilere göre yapıldı ve hastalar tek bir merkezde takip edildi.

JAK2^{V617F} Allel Yükünün Belirlenmesi: Laboratuvarımıza gelen EDTA'lı tam kan numunelerinden spin kolon DNA ekstraksiyon yöntemiyle DNA izole edildi. İzole edilen DNA örneğinden allel, spesifik RT-(qPCR) (Applied Biosystems™) StepOnePlus™ RT-PCR cihazı ile kantitatif olarak çalışıldı. Daha önceki literatür bilgileri doğrultusunda ve kullanılan ticari kit eşik değeri %0.1 olarak alındığından, biz de çalışmamızda %0.1 değerini eşik değer olarak kabul ettik (26 - 28).

Etik Kurul

Çalışmanın etik izni T.C. Sağlık Bakanlığı Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26/01/2023 tarihinde onaylandı ve 2/15 sayı numarası verildi.

İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenler frekans (n) ve yüzde (%), sürekli değişkenler normal dağılım varsayımı sağlandığında ortalama \pm standart sapma (SS) ve sağlanmadığında medyan (IQR: 25-75. Persentil) değerleri ile sunulmuştur. Normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin analizinde Pearson ki-kare ve Fisher's Exact testi kullanılmıştır. İki grubun sürekli değişkenlerinin parametrik olmayan karşılaştırmasında Mann-Whitney U test, parametrik karşılaştırılmasında Independent t-test kullanılmıştır. Tüm analizler IBM SPSS 23.0 paket programı (IBM Corp., Armonk, NY) ile yapıldı. 0.05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Toplam 95 hastanın 57'si erkek 38'i kadın olup ortalama yaş 54,41 \pm 15,8 idi. JAK2^{V617F} allel yükü $\leq 3\%$ olan hastalardan 32'si erkek 14'ü kadın olup ortalama yaş 49,28 \pm 15,78 iken JAK2^{V617F} allel yükü $> 3\%$ olan hastaların 25'i erkek 24'ü kadın olup ortalama yaş 59,22 \pm 14,37'yd. KMPN ön tanılı hastalardan JAK2^{V617F} allel yükü $\leq 3\%$ olan 46 hastanın 12'sinde PV, 11'inde ET, 10'ununda idiyopatik eritrositoz (İE), 6'sında MF, 2'sinde akut myeloid lösemi, 1'inde hi-

reozinofilik sendrom, 2'sinde trombositopeni, 1'inde nötropeni, 1'inde lökositöz tespit edildi. JAK2^{V617F} allel yükü >%3 olan 49 hastanın 24'üne PV, 18'ine ET, 7'sine MF tanısı konuldu. İki grup hastalık tanılarına göre kıyaslandığında PV görülme sıklığı JAK2^{V617F} allel yükü >%3 olan grupta daha fazla tespit edildi ve bu durum istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (p=0.022). İE ise JAK2^{V617F} allel yükü ≤%3 olan grupta, diğer gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak fazla tespit edildi (p<0.001). **Tablo 1**'de hastaların çalışma gruplarına göre demografik ve klinik özellikleri gösterilmiştir. Her iki grup arasında eritrosit sayısı, hemogloblin düzeyi, ortalama eritrosit hacimleri (MCV) arasında istatistiksel bir fark bulunmazken; lökosit, nötrofil ve trombosit yüksekliği JAK2^{V617F} allel yükü >%3 olan grup lehine istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.007; p<0.001; p<0.001) (**Tablo 2**).

Tablo 1: Hastaların çalışma gruplarına göre demografik ve klinik özellikleri

JAK2 ^{V617F}	≥%0.1 (n:95)	≤%3 (n:46)	>%3 (n:49)	P
Yaş (yıl), ort±SS	54.41±15.8	49.28±15.78	59.22±14.37	0.002
Cinsiyet, n (%)				
Erkek	57(60)	32(69.6)	25(51)	0.065
Kadın	38(40)	14(30.4)	24(49)	
Tanı, n (%)				
Polistemia vera	36(37.9)	12(26.1)	24(49)	0.022
Esansiyel trombositöz	29(30.5)	11(23.9)	18(36.7)	0.175
Myelofibrozu	13(13.7)	6(13)	7(14.3)	0.860
İdiopatik eritrositöz	10(10.5)	10(21.7)	0(0)	<0.001
Akut myeloid lösemi	2(2.1)	2(4.3)	0(0)	0.232
Hipereozinofilik sendrom	1(1.1)	1(2.2)	0(0)	0.484
Trombositopeni	2(2.1)	2(4.3)	0(0)	0.232
Nötropeni	1(1.1)	1(2.2)	0(0)	0.484
Lökositöz	1(1.1)	1(2.2)	0(0)	0.484

Independent t-test, Pearson ki-kare test, Fisher's Exact test.

Tablo 2: Hastaların çalışma gruplarına göre laboratuvar bulguları

JAK2 ^{V617F}	≥%0.1 (n:95)	≤%3 (n:46)	>%3 (n:49)	P
	Medyan (IQR)	Medyan (IQR)	Medyan (IQR)	
Eritrosit (x10 ⁶ /mm ³)	5.5 (4.8-6.0)	5.3 (4.7-5.8)	5.8 (4.9-6.5)	0.074
Hemoglobin (g/dL)	15.5 (12.6-16.9)	15.9 (12.8-17)	15.3 (12.2-16.8)	0.430
MCV (um ³)	84 (80-89)	85 (83-89)	83 (75-89)	0.069
Lökosit (/mm ³)	9600 (7400-12400)	8700 (6400-11900)	11000 (9000-12900)	0.007
Nötrofil (/mm ³)	6040 (4260-8590)	4685 (3410-6310)	7650 (5740-9790)	<0.001
Nötrofil yüzdesi (%)	63±13	55±12	70±8	<0.001
Trombosit (x10 ³ /mm ³)	518 (266-747)	272 (202-471)	726 (544-936)	<0.001

Ort±SS ile verildi. Independent t-test, Mann-Whitney U test.

TARTIŞMA

KMPN, hematopoietik kök hücrelerden kaynaklanan heterojen bir hastalık grubudur.

Aynı zamanda, nispeten olgun kemik iliği hücrelerinin klonal proliferasyonu ile karakterize edilen bir grup neoplastik hastalık için ortak bir terimdir. KMPN vakalarının >%95'inde, bir KMPN fenotipinin gelişimini sağlayan 3 somatik gen mutasyonu mevcuttur: JAK2^{V617F}, CALR veya MPL (8). JAK2^{V617F}, belirsiz potansiyele sahip klonal hematopoez gelişimi ile ilişkili en yaygın mutasyonlardan biridir (39).

Bu kesitsel çalışmada KMPN ön tanısı ile moleküler test uygulanan hastalarda düşük ve yüksek JAK2^{V617F} allel yükünün klinik ve hematolojik parametreler açısından rolünü araştırdık. Hastanemizde JAK2^{V617F} mutasyonu pozitif KMPN'lerin ortalama görülme yaşı 54 ve erkeklerde görülme oranı kadınların 1.5 katı olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda, düşük allel yükü olan hastalarda hematolojik tanı alma olasılığının yüksek olduğu görülürken, allel yükü >%3 olan hastaların tümünün bir KMPN fenotipe karşılık geldiği görülmüştür. JAK2^{V617F} mutasyonu; atipik veya sınıflandırılmayan miyeloproliferatif hastalıklarda "non-driver" ve alt klonal bir durumu temsil eder ve sıklıkla düşük mutasyon yükü oluşturur (7). Çalışmamızda tek başına düşük JAK2^{V617F} allel yük saptanmasının KMPN tanısını belirlemek için yeterli olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte zaman içinde moleküler izlem yapılması bunun geçici (sağlıklı deneklerde ortaya çıkması muhtemel) bir durum mu yoksa genişleyip hastalığa neden olabilecek bir klon olup olmayacağını bilmeye izin verebilir.

Miyeloproliferatif neoplazileri olan hastalar tipik olarak başlangıçta periferik kanda tek seride veya çoklu seride kan hücresi artışı ile fark edilir. Yapılan çalışmalarda, JAK2^{V617F} mutasyonlu PV'de daha yüksek lökosit ve trombosit değerleri (40); JAK2^{V617F} mutasyonlu ET'de daha yüksek lökosit ve hemogloblin ve daha düşük trombosit değerleri; JAK2^{V617F} mutasyonlu primer MF'de daha yüksek lökosit ve daha düşük trombosit değerleri (41, 42) gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışmamız düşük ve yüksek allel yüke sahip hastalarda hemogloblin seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığını, yüksek allel yüke sahip grupta ise lökosit, nötrofil ve trombosit değerlerinin düşük allel yüke sahip gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir. Nötrofillerin yüzdesi gibi ayrıntılı indekslerin ilk tanıya rehberlik edecek önemli bilgiler sağlayabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, düşük allel yüklü JAK2^{V617F} mutasyonunun günlük klinik uygulamada yorumlanması zor olmakla birlikte tüm pozitif hastalara hematolojik tanı konmamıştır. Allel yükü >%3 olan tüm hastalara KMPN tanısı konulmuştur; bu nedenle, bu sınırın üzerindeki bir mutasyon yükü, miyeloproliferatif bir hastalığın varlığın göstergesi olarak kabul edilebilir. Düşük allel yüklü JAK2^{V617F} mutasyonuna yaklaşımı tanımlamak için standardize edilmiş moleküler yöntemlerle prospektif olarak incelenen daha büyük hasta gruplarına sahip çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22:14–22.
2. Wang YL, Vandris K, Jones A, et al. JAK2 Mutations are present in all cases of polycythemia vera. *Leukemia*. 2008;22:1289.
3. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108:1865–7.
4. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111:3931–40.
5. Levine RL. JAK2V617F: you can't have too much. *Blood*. 2008;111(8):3913.
6. Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2920–1.
7. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005;106:1207–9.
8. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369:2391–405.
9. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369:2379–90.
10. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, et al. JAK2 mutation 1849G > T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:3370–3.
11. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162–8.
12. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, et al. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood*. 2006;108:1781–2.
13. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, et al. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia*. 2005;19:2359–60.
14. Boissinot M, Lippert E, Girodon F, et al. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood*. 2006;108:3223–4.
15. Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia*. 2006;20:1641–4.
16. Zhao S, Zhang X, Xu Y, et al. Impact of JAK2V617F Mutation Burden on Disease Phenotype in Chinese Patients with JAK2V617F-positive Polycythemia Vera (PV) and Essential thrombocythemia (ET) *Int J Med Sci*. 2016;13:85–91.
17. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110:840–6.
18. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, et al. Myeloproliferative Disorders Research Consortium (MPD-RC). Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93:41–8.
19. Lussana F, Caberlon S, Pagani C, et al. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thrombosis research*. 2009;124:409–17.
20. De Stefano V, Za T, Rossi E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008;93:372–80.
21. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis) *Blood*. 2012;120:5128–33.

- 22.** Tefferi A, Lasho TL, Huang J, et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia*. 2008;22:756–61.
- 23.** Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood*. 2009;114:1477–83.
- 24.** Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108:3548–55.
- 25.** Bench AJ, White HE, Foroni L, et al. British Committee for Standards in Haematology. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol*. 2013;160:25–34.
- 26.** Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, et al. 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&MP-Nr-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia*. 2013;27:2032–9.
- 27.** Lippert E, Girodon F, Hammond E, et al. Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: a multicenter study. *Haematologica*. 2009;94:38–45.
- 28.** Mason J, Akiki S, Griffiths MJ. Pitfalls in molecular diagnosis in haemato-oncology. *J Clin Pathol*. 2011;64:275–8.
- 29.** McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006;20:168–71.
- 30.** Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, et al. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. *Methods Mol Med*. 2006;125:253–64.
- 31.** Cankovic M, Whiteley L, Hawley RC, et al. Clinical performance of JAK2 V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory: evaluation of screening and quantitation methods. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:713–21.
- 32.** Martinaud C, Brisou P, Mozziconacci MJ. Is the JAK2(V617F) mutation detectable in healthy volunteers?. *Am J Hematol*. 2010;85:287–8.
- 33.** Sidon P, Housni H El, Dessars B, et al. The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia*. 2006;20:1622.
- 34.** Xu X, Zhang Q, Luo J, et al. Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood*. 2007;109:339–42.
- 35.** Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, et al. 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.
- 36.** Rapado I, Albizua E, Ayala R, et al. Validity test study of JAK2 V617F and allele burden quantification in the diagnosis of myeloproliferative diseases. *Ann Hematol*. 2008;87:741–9.
- 37.** Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. JAK2 (V617F) mutation in healthy individuals. *Br J Haematol*. 2007;136:678–9.
- 38.** Lippert E, Mansier O, Migeon M, et al. Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. 2014;99:e98–101.
- 39.** Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9–16.
- 40.** He ZP, Tian HY, Tan M, et al. Clinical Analysis of Driver Mutation in Patients with Ph Negative Myeloproliferative Neoplasms. *J Exp Hematol*. 2018;26(3):842–8.
- 41.** Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507–13.
- 42.** Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062–9.