

ĐỊNH LƯỢNG ĐỘT BIẾN GEN JAK2 V617F BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR KỸ THUẬT SỐ TRÊN NHÓM BỆNH HỘI CHỨNG TỦY TĂNG SINH TẠI BỆNH VIỆN TRUYỀN MÁU HUYẾT HỌC

CAO SỸ LUÂN^{1,2*}, PHÙ CHÍ DŨNG¹, PHAN THỊ XINH^{1,3}

Tóm tắt

Đột biến gen JAK2, đặc biệt là đột biến JAK2V617F, là đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất và có vai trò thiết yếu trong bệnh sinh của nhóm bệnh hội chứng tủy tăng sinh (MPN). Do đó, việc xác định đột biến JAK2V617F có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán, tiên lượng bệnh và theo dõi đáp ứng điều trị. Có hai phương pháp để xác định đột biến JAK2V617F là phương pháp định tính và định lượng. Trong đó, để định lượng đột biến JAK2V617F thì kỹ thuật ddPCR được đánh giá là có độ nhạy và độ chính xác cao, đặc biệt phù hợp để chẩn đoán và theo dõi điều trị ở những bệnh nhân có tỷ lệ đột biến JAK2V617F thấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá độ chính xác, độ nhạy và độ tái lập của phương pháp định lượng đột biến JAK2 V617F bằng kỹ thuật ddPCR. Kết quả là đã xác định tỷ lệ đột biến JAK2V617F trong mẫu chứng cũng như mẫu bệnh nhân MPN được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học (BTH) với độ nhạy, độ chính xác và độ tái lập cao với hệ số biến thiên (CV) < 0,05. Đồng thời, chúng tôi cũng nhận thấy có sự tương đồng về kết quả xác định đột biến JAK2 V617F giữa ddPCR và phương pháp định tính ASO-PCR. Ngoài ra, kết quả ngoại kiểm xác định tình trạng đột biến JAK2 V617F với mẫu được gửi từ UK NEQAS cũng cho thấy có sự phù hợp và hoàn toàn tương đồng giữa kết quả của chúng tôi và UK NEQAS với chỉ số z-score ≤ 0,5. Như vậy, chúng tôi đã thiết lập thành công kỹ thuật ddPCR để xác định tỷ lệ đột biến JAK2V617F ở những bệnh nhân MPN được chẩn đoán và điều trị tại BTH với độ nhạy, độ chính xác và độ tái lập cao.

Từ khóa: hội chứng tủy tăng sinh, đột biến JAK2V617F, ddPCR

Abstract

JAK2 gene mutations, especially JAK2 V617F mutation, is the most prevalent mutation and play an essential role in the pathogenesis of proliferative myeloid syndromes (MPN). Therefore, the identification of JAK2 V617F mutation has important implications in diagnosis, prognosis and monitoring of treatment

¹ Bệnh viện Truyền máu Huyết học Tp.HCM,

² Trường Đại học Cửu Long

³ Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

* Người chịu trách nhiệm về bài viết: Cao Sỹ Luân

response. There are two methods to identify JAK2 V617F mutation including qualitative and quantitative methods. In particular, quantification of the JAK2 V617F mutation, ddPCR technique is evaluated to have high sensitivity and accuracy, especially suitable for diagnosis and monitoring treatment in patients with low frequency of JAK2 V617F mutation. In this study, we evaluated the accuracy, sensitivity and reproducibility of quantification of the JAK2 V617F mutation by ddPCR technique. As a result, the JAK2 V617F mutation rate was determined in the control samples as well as in the MPN patient samples diagnosed and treated at the Blood Transfusion Hematology Hospital (BTH) with high sensitivity, accuracy and reproducibility with the coefficient of variation (CV) < 0.05. Furthermore, we also found a similarity in the results of JAK2 V617F mutation identification between ddPCR and ASO-PCR method. In addition, the external test results of the JAK2 V617F mutation identification with samples from UK NEQAS show that our results are completely matched and highly equivalent with the results of UK NEQAS with z-score ≤ 0.5 . Based on those, we have successfully established ddPCR technique to determine the ratio of JAK2 V617F mutation in MPN patients diagnosed and treated at BTH with high sensitivity, accuracy and reproducibility.

Keywords: *proliferative myeloid syndromes, JAK2 V617F mutation, ddPCR*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng tủy tăng sinh (MPN) là một nhóm các bệnh lý tăng sinh bất thường các tế bào dòng tủy trong tủy xương, bao gồm các thể bệnh đa hồng cầu (PV), tăng tiểu cầu tiên phát (ET) và sơ tủy nguyên phát (PMF). Nguyên nhân gây bệnh là do sự xuất hiện của các bất thường di truyền và đột biến gen trong các tế bào gốc tạo máu dẫn tới sự tăng sinh mất kiểm soát và làm rối loạn quá trình biệt hóa của chúng. Một trong những đột biến gen phổ biến trong nhóm bệnh lý này là đột biến gen *JAK2*, đặc biệt là đột biến *JAK2V617F*. Đây là đột biến chiếm tỷ lệ cao trong các thể bệnh của MPN, cụ thể PV (81-99%), ET (41-72%) và PMF (39-57%) [1]. Chính vì vậy, đột biến được sử dụng làm một trong các tiêu chuẩn để chẩn đoán các thể bệnh MPN theo tiêu chuẩn WHO 2016 [2]. Hơn thế nữa, tỷ lệ đột biến *JAK2 V617F* còn có thể giúp phân biệt chẩn đoán giữa ET (thấp), PV và PMF (trung bình), post-PV MF (cao) [3]. Ngoài vai trò trong

chẩn đoán, một số nghiên cứu còn cho thấy giá trị của đột biến *JAK2V617F* trong phân nhóm tiên lượng và theo dõi điều trị. Cụ thể, tỷ lệ cao đột biến *JAK2 V617F* ảnh hưởng đến tiên lượng, bao gồm các nguy cơ cao thuyên tắc huyết khối tĩnh mạch (VTE), xơ hóa tủy xương (post-PV MF) và tiến triển bệnh [3,4]. Đồng thời, với việc thuốc ức chế hoạt động của protein *JAK2* (Ruxolitinib) đã được FDA phê duyệt sử dụng thì định lượng đột biến *JAK2 V617F* giúp đánh giá chính xác đáp ứng với thuốc trúng đích ức chế *JAK2* và cũng có thể được sử dụng để đánh giá mức độ đáp ứng sinh học phân tử trên cả những bệnh nhân sau khi được điều trị với Interferon- α (IFN- α) [5].

Để xác định đột biến *JAK2 V617F* trên bệnh nhân MPN tại thời điểm chẩn đoán thì chúng ta chỉ cần sử dụng phương pháp PCR định tính là ASO-PCR. Tuy nhiên, để có thể định lượng đột biến *JAK2 V617F* cho mục đích phân biệt chẩn đoán các thể bệnh MPN, tiên lượng bệnh hay đánh giá đáp ứng sau điều trị

thì cần thực hiện PCR định lượng. Hiện có 2 phương pháp PCR định lượng được sử dụng để xác định tỷ lệ đột biến *JAK2* V617F là RQ-PCR và ddPCR (hay còn gọi là PCR kỹ thuật số). Trong 2 kỹ thuật thì ddPCR được đánh giá là có nhiều ưu điểm hơn so với RQ-PCR. Cụ thể là ddPCR có độ nhạy, độ chính xác và độ tái lập cao hơn [6]. Ngoài ra, kỹ thuật ddPCR là phương pháp định lượng tuyệt đối, không định lượng gián tiếp dựa trên đường chuẩn như RQ-PCR nên kết quả định lượng không phụ thuộc vào chất lượng của đường chuẩn [6]. Thêm một ưu điểm nữa của ddPCR là do phản ứng PCR được chia nhỏ trong nhiều giọt dầu riêng biệt nên ít bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế phản ứng PCR [7]. Hiện tại, đa số các nghiên cứu ở Việt Nam mới chỉ dừng lại ở việc xác định đột biến *JAK2* V617F để hỗ trợ chẩn đoán bệnh MPN chứ chưa có nghiên cứu định lượng đột biến *JAK2* V617F để hỗ trợ phân biệt chẩn đoán giữa các thể bệnh MPN cũng như tiên lượng bệnh và đánh giá đáp ứng điều trị. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Bước đầu định lượng đột biến *JAK2* V617F bằng phương pháp ddPCR trên nhóm bệnh MPN được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học (BTH)” nhằm cung cấp thêm thông tin hỗ trợ cho bác sĩ điều trị trong chẩn đoán, tiên lượng bệnh và theo dõi đáp ứng điều trị.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu ngoại kiểm (10 mẫu) được gửi từ Trung tâm đánh giá ngoại kiểm (UK NEQAS) và mẫu lưu DNA của người bệnh được chẩn đoán MPN (10 mẫu) được lưu tại Khoa Di truyền học phân tử, BTH.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:

Nghiên cứu mô tả loạt ca, hồi cứu, triển khai kỹ thuật mới.

2.2.2. Phương pháp tiến hành

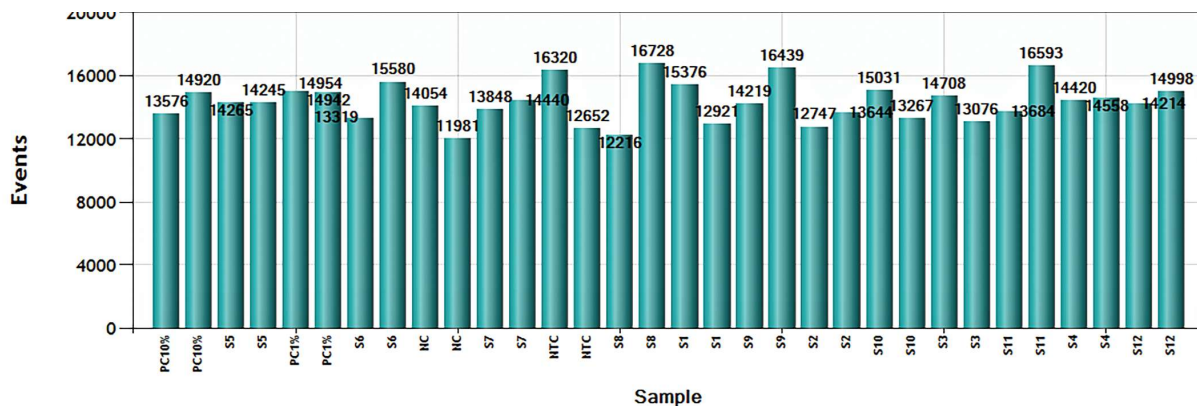
Ly trích DNA: Đối với mẫu ngoại kiểm, mẫu tế bào đông khô được gửi từ UK NEQAS được hoàn nguyên với 1 ml dung dịch PBS. Đối với mẫu của người bệnh được chẩn đoán MPN, lấy 2 ml máu ngoại biên trong chống đông EDTA. Ly trích DNA từ mẫu ngoại kiểm và máu ngoại biên của người bệnh bằng bộ kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, sản phẩm ly trích sẽ được đo độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng máy quang phổ ở hai bước sóng 260 nm và 280 nm, và pha loãng để thu được nồng độ 20ng/uL.

Thực hiện phản ứng ddPCR: Thành phần phản ứng ddPCR gồm có 2x ddPCR supermix for Probes (No dUTP), *JAK2* Assay (20x), Enzyme HaeIII, nước nuclease free và mẫu DNA trong 22 μ L thể tích phản ứng. Sau đó, hút 20 μ L phản ứng ddPCR có chứa DNA vào hàng giếng chính giữa của cartridge và 70 μ L dầu tạo vi giọt (DG Oil for Probes) vào hàng giếng dưới cùng của cartridge để tạo vi giọt chứa các thành phần của phản ứng ddPCR. Tiếp theo, chuyển ngay vi giọt vào đĩa PCR 96 giếng, dán giấy nhôm lên đĩa và chạy chương trình luân nhiệt trên máy PCR C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Hoa Kỳ), gồm các bước 95°C trong 10 phút; theo sau là 40 chu kỳ với 94°C trong 30 giây và 55°C trong 60 giây; và cuối cùng là 98°C trong 10 phút. Sau đó, chuyển sản phẩm PCR qua máy Droplet Reader IVD (Bio-Rad, Hoa Kỳ) để đọc tín hiệu phản ứng PCR trong từng vi giọt.

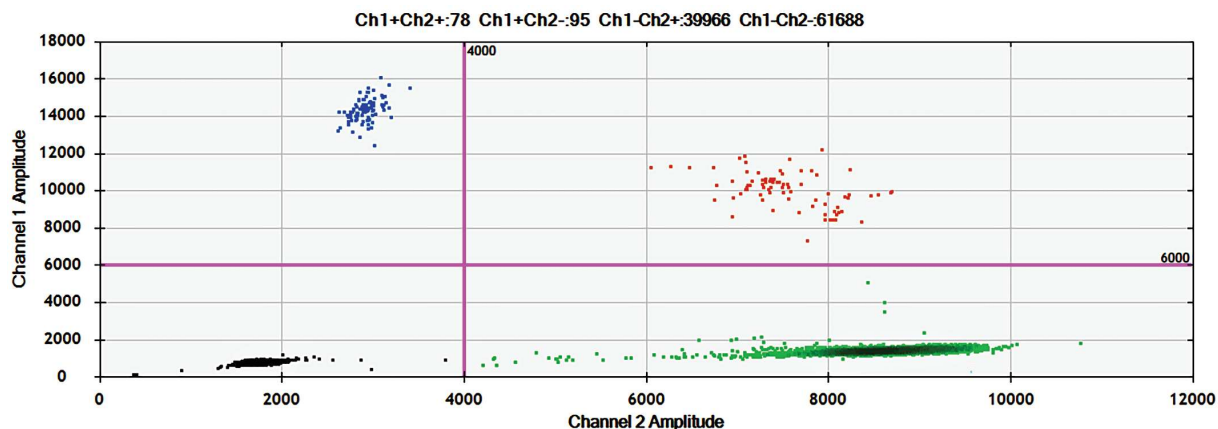
Phân tích kết quả: Kết quả được phân tích bằng phần mềm QuantaSoft 1.7.4 (Bio-Rad, Hoa Kỳ). Tiêu chuẩn để đánh giá hiệu quả tạo vi giọt trong phản ứng ddPCR là dựa trên số

lượng vi giọt trong mỗi giếng (>10000 vi giọt/giếng). Sử dụng kết quả của các mẫu chứng dương và âm để thiết lập vị trí của ngưỡng kênh màu FAM và màu HEX theo nguyên tắc 1/3 mỗi trục, ghi nhận lại giá trị Threshold cho Ch1

và Ch2 và áp dụng làm ngưỡng cho các mẫu còn lại, có thể điều chỉnh lại giá trị Threshold (nếu cần) sao cho các đường ngưỡng của 2 kênh màu không cắt các cụm vi giọt.



Hình 1: Minh họa kết quả đếm số lượng vi giọt trong mỗi giếng của phản ứng ddPCR. (tất cả đều có > 10000 vi giọt/giếng)

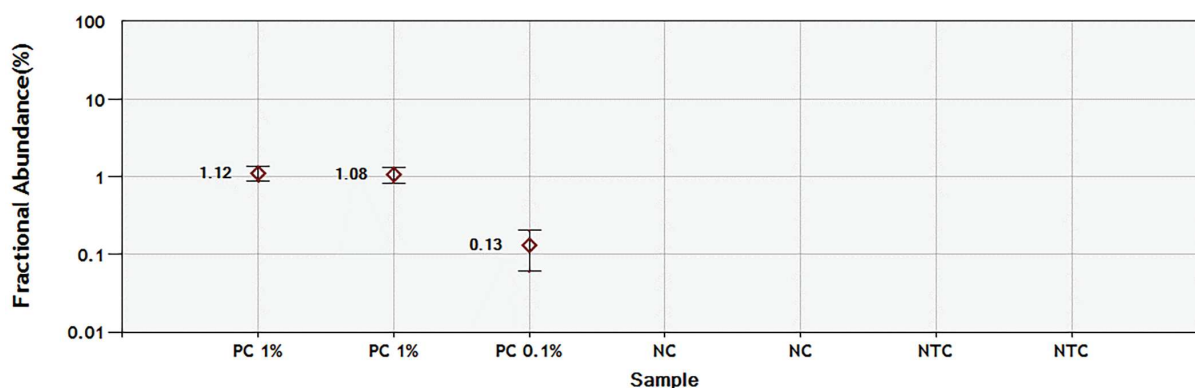


Hình 2: Minh họa kết quả thiết lập vị trí của ngưỡng kênh màu FAM và màu HEX theo nguyên tắc 1/3 mỗi trục. (Màu xám: không có cả JAK2 bình thường và đột biến, Màu xanh dương: có JAK2 đột biến, Màu xanh lá: có JAK2 bình thường và Màu cam: có cả JAK2 bình thường và đột biến)

III. KẾT QUẢ

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá độ chính xác, độ nhạy và độ tái lập của phương pháp định lượng đột biến JAK2 V617F bằng kỹ thuật ddPCR. Trước hết, dựa trên kết quả định lượng các mẫu chứng gồm chứng dương 1% (PC 1%), chứng dương 0,1% (PC 0,1%), chứng âm (NC, chỉ chứa JAK2 bình

thường), chứng không (NTC, không chứa DNA) cho thấy kết quả định lượng đột biến JAK2 V617F bằng kỹ thuật ddPCR có sự tương đồng cao. Cụ thể, mẫu PC 1% cho kết quả tỷ lệ đột biến gần bằng 1% (trung bình là 1,11%); mẫu PC 0,1% cũng cho thấy tỷ lệ đột biến gần bằng 0,1% (0,13%); còn mẫu NC và NTC thì tỷ lệ đột biến là 0% (Hình 3).



Hình 3: Kết quả xác định tỷ lệ đột biến trên các mẫu chứng, gồm PC 1%, PC 0,1%, NC (chứng âm) và NTC (chứng âm không chứa DNA)

Kết quả định lượng đột biến *JAK2* V617F trên mẫu bệnh nhân MPN (10 mẫu) cho thấy có độ lặp lại cao. Dựa trên kết quả tỷ lệ đột biến *JAK2* V617F được xác định giữa hai giếng của cùng một mẫu bệnh nhân cho thấy có độ lặp lại cao, tất cả các mẫu đều có hệ số biến thiên (CV) < 0,05 (Bảng 1).

Bảng 1: Tỷ lệ đột biến *JAK2* V617F trên mẫu bệnh nhân MPN được xác định bằng kỹ thuật ddPCR

Mẫu	Tỷ lệ đột biến <i>JAK2</i> V617F (%)			
	Giếng 1	Giếng 2	Trung bình	Hệ số biến thiên (CV)
MPN01	1,49	1,44	1,46	0,02
MPN02	53,5	54,2	53,9	0,01
MPN03	33,6	33,6	33,6	0,00
MPN04	8,2	8,0	8,09	0,01
MPN05	0	0	0	*
MPN06	38,2	38,2	38,2	0,00
MPN07	49,2	48,1	48,7	0,01
MPN08	0	0	0	*
MPN09	70,9	70,5	70,7	0,00
MPN10	73,4	73,1	73,3	0,00

* Do kết quả định lượng đột biến *JAK2* V617F bằng 0 nên không tính hệ số biến thiên.

Đồng thời, chúng tôi cũng kiểm tra sự ổn định của kết quả định lượng đột biến *JAK2* V617F giữa các lần thực hiện phản ứng ddPCR. Kết quả cho thấy tỷ lệ đột biến *JAK2* V617F được xác định giữa hai lần thực hiện phản ứng ddPCR của cùng một mẫu có CV < 0,05 (Bảng 2).

Bảng 2: Tỷ lệ đột biến JAK2 V617F trên mẫu bệnh nhân MPN được xác định bằng kỹ thuật ddPCR giữa các lần thực hiện phản ứng ddPCR khác nhau

Mẫu	Tỷ lệ đột biến JAK2 V617F (%)					
	Kết quả lần 1		Kết quả lần 2		Trung bình	Hệ số biến thiên (CV)
	Giếng 1	Giếng 2	Giếng 1	Giếng 2		
MPN06	38,2	38,2	38,8	39,5	38,68	0,02
MPN07	49,2	48,1	47,5	48,6	48,35	0,01
MPN08	0	0	0	0	0	*
MPN09	70,9	70,5	70,5	71	70,73	0,00
MPN10	73,4	73,1	73,8	72,8	73,28	0,01

* Do kết quả định lượng đột biến JAK2 V617F bằng 0 nên không tính hệ số biến thiên.

Ngoài ra, chúng tôi cũng tham gia thực hiện ngoại kiểm xác định tình trạng đột biến JAK2 V617F với mẫu được gửi từ UK NEQAS. Theo báo cáo đánh giá từ UK NEQAS cho thấy kết quả xác định tình trạng đột biến JAK2 V617F theo phương pháp ddPCR được thực hiện tại Khoa Di truyền học phân tử, BTH đạt cả về tiêu chí đánh giá định tính và định

lượng. Cụ thể, về tiêu chí đánh giá định tính thì kết quả do BTH báo cáo hoàn toàn tương đồng với kết quả do NEQAS đưa ra và liên tục xếp hạng “Satisfactory” (nộp đủ kết quả và kết quả đúng) về hiệu quả xét nghiệm (Bảng 3). Còn về tiêu chí đánh giá định lượng thì tỷ lệ đột biến JAK2 V617F do BTH báo cáo luôn có chỉ số z-score $\leq 0,5$ (Bảng 4).

Bảng 3: Kết quả ngoại kiểm đánh giá định tính tình trạng đột biến JAK2 V617F

Đợt tham gia	Mẫu	Kết quả định tính (BTH)	Kết quả định tính (NEQAS)	Xếp hạng hiệu quả xét nghiệm*
06-07/2020	165	Âm tính	Âm tính	Satisfactory
	166	Dương tính	Dương tính	
10-11/2020	167	Dương tính	Dương tính	Satisfactory
	168	Âm tính	Âm tính	
02-03/2021	169	Dương tính	Dương tính	Satisfactory
	170	Dương tính	Dương tính	
10-11/2021	173	Dương tính	Dương tính	Satisfactory
	174	Dương tính	Dương tính	
02-03/2022	175	Âm tính	Âm tính	Satisfactory
	176	Dương tính	Dương tính	

* Xếp hạng hiệu quả xét nghiệm của lab theo hai bậc “Satisfactory” (nộp đủ kết quả và kết quả đúng) hoặc “Critical” (nộp đủ kết quả nhưng kết quả sai hoặc không nộp kết quả).

Bảng 4: Kết quả ngoại kiểm đánh giá định lượng đột biến *JAK2 V617F*

Đợt tham gia	Mẫu	Kết quả định tính (BTH)	Kết quả định tính (NEQAS)	z-score
06-07/2020	165	0%	0%	*
	166	74,1%	74,4%	*
10-11/2020	167	67,87%	66%	*
	168	0%	0%	*
02-03/2021	169	4,975%	4,92%	0,04
	170	6,036%	5,12%	0,51
10-11/2021	173	3,355%	3%	0,33
	174	23,722%	23,39%	0,05
02-03/2022	175	0%	0%	N/A
	176	7,3%	7,38%	-0,03

* Chưa áp dụng đánh giá kết quả định lượng, N/A: Not analysed (Do kết quả định lượng đột biến *JAK2 V617F* bằng 0 nên không phân tích).

IV. BÀN LUẬN

Theo như kết quả xác định đột biến *JAK2 V617F* trên 4 mẫu chứng gồm mẫu PC 1%, PC 0,1%, NC và NTC thì tất cả các mẫu đều đạt các yêu cầu phân tích về tổng số giọt/giếng, thành phần mẫu và tỷ lệ đột biến, đảm bảo độ tin cậy của kết quả xét nghiệm. Ngoài ra, với kết quả định lượng chính xác tỷ lệ đột biến *JAK2 V617F* trên mẫu có tỷ lệ đột biến thấp (PC 0,1%) còn chứng tỏ độ nhạy cao của kỹ thuật ddPCR. Theo một số nghiên cứu thì giới hạn phát hiện đột biến *JAK2 V617F* của kỹ thuật ddPCR có thể đạt tới 0,01% [8,9].

Kết quả xác định tỷ lệ đột biến *JAK2 V617F* trên mẫu bệnh nhân MPN trong nghiên cứu cho thấy ddPCR là phương pháp định lượng có độ nhạy, độ chính xác và độ tái lập cao với hệ số biến thiên (CV) rất thấp ($< 0,05$) giữa các giếng của cùng một mẫu và ngay cả giữa các lần thực hiện ddPCR khác nhau. Việc định lượng được tỷ lệ đột biến sẽ giúp cung cấp

thêm thông tin cho bác sĩ trong việc phân biệt chẩn đoán các thể bệnh MPN, tiên lượng bệnh và theo dõi đáp ứng điều trị. Một số nghiên cứu cho thấy ddPCR có độ nhạy cao hơn so với RQ-PCR, đặc biệt là trong trường hợp tỷ lệ đột biến *JAK2 V617F* ở mức rất thấp [6,9]. Như vậy, với độ nhạy và độ chính xác cao ddPCR định lượng đột biến *JAK2 V617F* được đề nghị sử dụng để đánh giá MRD ở những bệnh nhân MPN đáp ứng sâu sau điều trị [9].

Dựa trên các báo cáo đánh giá kết quả ngoại kiểm các mẫu của UK NEQAS (Bảng 3 và 4), chúng ta có thể thấy kết quả của tất cả các đợt đánh giá đều hoàn toàn tương đồng và có sự chênh lệch rất ít so với giá trị trung vị do NEQAS tính được. Như vậy, với kết quả ngoại kiểm được đánh giá cao cả về định tính và định lượng, cho thấy phương pháp định lượng đột biến *JAK2 V617F* bằng kỹ thuật ddPCR được thực hiện tại Khoa Di truyền học phân tử, BTH đạt tiêu chuẩn quốc tế và đáng tin cậy.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã triển khai thành công phương pháp định lượng đột biến *JAK2* V617F bằng kỹ thuật ddPCR cho mẫu người bệnh MPN được chẩn đoán và điều trị tại BTH. Với các kết quả thu được từ các mẫu chứng, mẫu người bệnh và mẫu ngoại kiểm đã cho thấy độ chính xác, độ nhạy và độ tái lập cao của kỹ thuật ddPCR trong định lượng đột biến *JAK2* V617F.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):673-83
- [2] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.
- [3] Passamonti F, Rumi E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica*. 2009 Jan;94(1):7-10.
- [4] Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, et al. The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*. 2015 Feb;135(2):272-80.
- [5] Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3065-72.
- [6] La Rocca F, Grieco V, Ruggieri V, et al. Superiority of Droplet Digital PCR Over Real-Time Quantitative PCR for *JAK2V617F* Allele Mutational Burden Assessment in Myeloproliferative Neoplasms: A Retrospective Study. *Diagnostics* (Basel). 2020 Mar 5;10(3):143.
- [7] Nystrand CF, Ghanima W, Waage A, et al. JAK2 V617F mutation can be reliably detected in serum using droplet digital PCR. *Int. J. Lab. Hematol*. 2018, 40, 181–186.
- [8] Waterhouse M, Follo M, Pfeifer D, et al. Sensitive and accurate quantification of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms by droplet digital PCR. *Ann Hematol*. 2016 Apr;95(5):739-44.
- [9] Link-Lenczowska D, Pallisgaard N, Cordua S, et al. A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. *Ann Hematol*. 2018 Dec;97(12):2299-2308.