

ANA LUISA SANTA CRUZ DE ALMEIDA

**O SORO APRESENTA MAIOR PROPORÇÃO DA VARIANTE JANUS QUINASE 2
V617F COMPARADO COM AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE TOTAL-EDTA:
UM MODELO DE QUANTIFICAÇÃO PARA VARIANTES SOMÁTICAS
UTILIZANDO qPCR E O MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta Cq}$**

BRASÍLIA, 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA LUISA SANTA CRUZ DE ALMEIDA

**O SORO APRESENTA MAIOR PROPORÇÃO DA VARIANTE JANUS QUINASE 2
V617F COMPARADO COM AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE TOTAL-EDTA:
UM MODELO DE QUANTIFICAÇÃO PARA VARIANTES SOMÁTICAS
UTILIZANDO qPCR E O MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta Cq}$**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra

BRASÍLIA
2020

*Àqueles que, de coração, torcem e acreditam em mim;
Àqueles que têm enorme paciência e nunca desistem de mim;
Àqueles que estão comigo em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade da vida, pela proteção diária, pela força e firmeza e por nunca me abandonar.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Barra, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e por me permitir fazer parte desse grupo tão especial em que estão Dra. Ticiane Santa Rita e Dr. Pedro Mesquita, colegas de trabalho e amigos de jornada. Sem vocês eu não teria finalizado mais essa etapa de muito aprendizado e conhecimento.

À equipe da Biologia Molecular, coordenada pela Dra. Lara, uma pessoa admirável e de um coração enorme, que me ensina todos os dias sobre resiliência, paciência e empatia. Agradeço de coração a cada membro da equipe, por se fazerem presentes no meu dia a dia, com alegrias, problemas, soluções, conhecimento, risadas e muito jogo de cintura. Especialmente àquelas que convivem comigo em todos os momentos, Deborah Layana, Claudia Sousa, Lara Velasco e Mércia Santos.

À minha família, que está presente em todos os momentos, acreditando no meu potencial, torcendo pelo meu sucesso, desejando a minha alegria sincera e me mostrando o real sentido de amor e confiança.

Aos amigos de longa data, que estão comigo há mais de 20 anos, àqueles que chegaram durante a faculdade e nunca se foram, àqueles que chegaram a menos tempo e ocupam o mesmo espaço no meu coração. Obrigada por nunca me abandonaram, por não desistirem de mim, por estarem sempre presentes nessa jornada comigo com irreverência, alegria, amor e leveza.

E agradeço também àqueles que já não estão perto fisicamente, mas se fazem presentes no meu coração e na minha mente.

Obrigada!

RESUMO

A detecção da variante JAK2 V617F faz parte dos critérios diagnósticos para as neoplasias mieloproliferativas crônicas e proporções elevadas de alelo mutante estão associadas a piores prognósticos. A mutação é geralmente detectada em DNA de amostras de sangue total-EDTA através do método de PCR em tempo real alelo específico (AS-qPCR) e quantificação absoluta. Entretanto, alguns equipamentos de extrações de DNA automatizados co-extraem inibidores de PCR quando partem de sangue total e a quantificação absoluta necessita de um esforço maior para gerar e manter as curvas padrão. A variante JAK2 V617F pode ser detectada em soro através de PCR digital (ddPCR), uma espécie que apresenta menos inibidores quando comparada ao sangue total e é mais amigável aos extratores de DNA automatizados. Entretanto, equipamentos de ddPCR não são amplamente disponíveis como os termocicladores de qPCR. Neste estudo, foi avaliado se a variante patogênica JAK2 V617F pode ser corretamente quantificada por AS-qPCR através do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ em DNA de amostras de sangue total-EDTA e validar o teste utilizando protocolos padrão em diagnóstico molecular. Em seguida, o método proposto foi aplicado para avaliar se a mutação pode ser corretamente detectada/quantificada em DNA de amostras de soro. O método proposto mostrou-se altamente exato (bias de 1,91%) comparado ao kit comercial (método referência), altamente preciso (CV% total de 0,40%, 1,92%, 11,12% em amostras com 93%, 54% e 2,5% de alelos mutantes, respectivamente) e extremamente sensível (limite de detecção de 0,16%) com resposta linear variando de 1,16% a 99,98% de alelos variantes. As amostras de soro foram quantificadas utilizando do método proposto e apresentaram média de alelos variantes 4% maior comparadas a amostras pareadas de sangue total-EDTA, o que permitiria aumentos nas taxas de detecção dessa variante e maior robustez nas análises.

Palavras-chave: JAK2 V617F; método $2^{-\Delta\Delta Cq}$; PCR em tempo real alelo específico; ARMS; quantificação relativa; neoplasias mieloproliferativas.

ABSTRACT

Detection of JAK2 V617F mutation is a diagnostic criterion for chronic myeloproliferative neoplasms and high levels of mutant alleles are associated with worse outcomes. This mutation is usually tested on blood DNA by allele-specific qPCR (AS-qPCR) and measured using absolute quantification. However, some automated DNA extractions co-extract PCR inhibitors from blood and absolute quantification needs increased effort to maintain standard curves. JAK2 V617F can also be detected in serum using droplet digital PCR (ddPCR), a specimen with less inhibitors and favorable to automated extractions, but ddPCR instruments are not wide available as qPCR thermocyclers. Here, we evaluate whether JAK2 V617F could be accurately quantified by AS-qPCR using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method on blood DNA and validate the assay using gold-standard molecular diagnostic protocols. Next, we apply the validated method to assess if the mutation could be reliably detected/quantified in serum. JAK2 V617F could be quantified by AS-qPCR using $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method, the assay was highly accurate (bias of 1.91%) compared to a gold-standard commercial kit, highly precise (total CV% of 0.40%, 1.92%, 11.12% for samples with 93%, 54% and 2.5% of mutant allele), highly sensitive (limit of detection of 0.16%) and demonstrated a linear detection response from 1.16% to 99.98%. Serum showed a higher mean mutant allele burden of 4% compared to the paired whole blood samples what would allow for increased JAK2 mutant detection rates and favors increased JAK2 V617F high-throughput analysis.

Keywords: JAK2 V617F; $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method; Allele-specific qPCR; ARMS; Relative quantification; Myeloproliferative neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização da variante somática JAK2 V617F. Substituição c.1849G>T no de *exon* 14 do gene *JAK2* e alteração na proteína (p.Val617Phe)..... 13
- Figura 2 - Reação de quantificação de DNA. A) Curva de amplificação em escala log. B) Curva padrão estabelecida a partir de concentrações conhecidas da RNase P (10^6 e 10^3 cópias da RNase P) 20
- Figura 3 – Análise de regressão linear dos alelos selvagem (círculos) e mutante (triângulo) a partir de diluição seriada 1:10 e 1:2 das amostras com diferentes concentrações de JAK2 V617F. Cada ponto representa uma replicata técnica 28
- Figura 4 – Valores de Cq RNase P obtidos a partir da AS-qPCR de JAK2 V617 e JAK2 F617 em amostras com diferentes proporções de alelos mutantes 29
- Figura 5 – Análise comparativa dos resultados obtidos da quantificação da variante JAK2 V617F de amostras com diferentes proporções de alelos JAK2 utilizando duas fórmulas de quantificação relativa. A) regressão linear ($r = 1$; $R^2 = 0,999$, $p = <0,0001$. B) Análise de Bland-Altman (bias = -0,61%, 95% IC = -2,5% a 1,3%) 30
- Figura 6 – Análise da amplificação da reação de quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra com 3,44% de alelos variantes. JAK2 V617 (azul), JAK2 F617 (vermelho) e RNase P (verde). A diferença de Cq entre os alelos encontra-se entre as linhas tracejadas (4,81) 31
- Figura 7 - Análise da amplificação da reação de quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra com 80,5% de alelos variantes. JAK2 V617 (azul), JAK2 F617 (vermelho) e RNase P (verde). A diferença de Cq entre os alelos encontra-se entre as linhas tracejadas (-2,05) 32
- Figura 8 - Análise da amplificação da reação de quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra que não apresenta alelos variantes. JAK2 V617 (azul), JAK2 F617 (vermelho) e RNase P (verde)..... 33

Figura 9 – Análise gráfica do LOD. Determinação da porcentagem de detecção da variante a partir da diluição seriada 1:2 de uma amostra sintética com 1,16% de JAK2 V617F (LOD = 0,15%, 95% IC = 0,12% – 0,21%)	34
Figura 10 - Definição do LOQ a partir do experimento de determinação do limite de detecção. Análise dos resultados de quantificação da variante JAK2 V617F obtidas das replicatas (n = 9) em amostras com 1,16%, 0,58%, 0,29% e 0,15% de JAK2 F617	35
Figura 11 – Análise da precisão do método proposto a partir da quantificação de JAK2 V617F em 9 dias consecutivos em amostras com 93%, 54% e 2,5% de alelos mutantes (n = 18). Para cada concentração foram estabelecidos média e desvio padrão, demonstrados em cada gráfico.....	35
Figura 12 – Avaliação entre os resultados de quantificação da mutação JAK2 V617F obtidos a partir do método proposto e do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (método referência). A) Regressão linear ($r = 0,998$, $p < 0,0001$; $R^2 = 0,996$). B) Análise de Bland-Altman (bias = 1,91%, (95% IC = -1,84% a 5,6%)).....	37
Figura 13 - Avaliação entre os resultados de quantificação da mutação JAK2 V617F obtidos através do método Cq comparativo, a partir de amostras de sangue total-EDTA (matriz referência) e soro. A) Regressão linear ($r = 0,982$, $p < 0,0001$; $R^2 = 0,965$). B) Análise de Bland-Altman (bias = 4,058%, (95% IC = -6,6% a 14,7%)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência do oligonucleotídeo ultrâmero empregado para a construção da curva padrão para a quantificação do DNA com o gene da RNase P como alvo.....	20
Tabela 2 - Sequência do conjunto primer/sonda utilizado para determinar a quantidade de DNA das amostras com gene da RNase P como alvo	20
Tabela 3 - Sequências de primers e sonda utilizados nas reações de quantificação da variante JAK2 V617F	21
Tabela 4 - Avaliação das eficiências (eff) de amplificação dos alelos mutante e selvagem da AS-qPCR a partir da diluição seriada de amostras com proporções variadas de JAK2 V617F	27
Tabela 5 - Determinação do LOD a partir da diluição seriada 1:2 de uma amostra com 1,16% de alelos mutantes.....	34
Tabela 6 - Análise qualitativa dos resultados da quantificação da variante JAK2 V617F obtidos a partir do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (método referência) e o método proposto $2^{-\Delta\Delta CQ}$	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%MUT	Porcentagem de alelo mutante
ARMS	Do inglês, <i>amplification refractory mutation system</i>
AS-qPCR	PCR em tempo real alelo específico
CLSI	Do inglês, <i>clinical and laboratory standards institute</i>
Cq	Ciclo quantitativo
ddPCR	Do inglês, <i>droplet digital PCR</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra cético
Eff	Eficiência
IC	Intervalo de confiança
JAK2	Janus quinase 2
JAK2 MUT %	Porcentagem de alelos mutantes
JH1	domínio tirosina quinase
JH2	Do inglês, <i>JAK homology 2</i>
LEC	Leucemia eosinofílica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNC	Leucemia neutrofílica crônica
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose primária
MUT	Mutante
NMP	Neoplasias mieloproliferativas
OMS	Organização mundial de saúde
pb	Pares de bases
Ph⁻	Do inglês, <i>philadelphia negative</i>
PV	Policitemia vera
qPCR	Reação da polimerase em cadeia em tempo real
RNase P	Ribonuclease P
SD	Do inglês, <i>standard deviation</i>

SNP Do inglês, *single nucleotide polymorphism*

TE Trombocitemia essencial

tRNA Ácido ribonucleico transportador

WT Do inglês, *wild type*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MÉTODOS	18
3.1	PARTICIPANTES	18
3.2	COLETA DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO	18
3.3	EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS	19
3.4	QUANTIFICAÇÃO DO DNA	19
3.5	QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE SOMÁTICA JAK2 V617F UTILIZANDO O MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta CQ}$	21
3.6	EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO	24
3.7	VARIAÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA (RNASE P)	24
3.8	DETERMINAÇÃO DO CUTOFF	24
3.9	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	25
3.10	PRECISÃO	25
3.11	EXATIDÃO	25
3.12	QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE SOMÁTICA JAK2 V617F EM AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE TOTAL-EDTA E SORO ATRAVÉS DO MÉTODO $2^{-\Delta\Delta CQ}$	26
3.13	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	26
4	RESULTADOS	27
4.1	VALIDAÇÃO DAS PRERROGATIVAS PARA A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta CQ}$ NA QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE JAK2 V617F E AVALIAÇÃO DAS FÓRMULAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ALELOS MUTANTES	27
4.2	VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE JAK2 V617F ATRAVÉS DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta CQ}$	32
4.3	QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE JAK2 V617F ATRAVÉS DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta CQ}$ EM AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE TOTAL-EDTA E SORO	37

5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) crônicas são um conjunto heterogêneo de doenças hematológicas clonais caracterizadas pelo aumento na produção de uma ou mais células maduras da linhagem mielóide. Fazem parte desse grupo: policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), dividida em duas categorias; estágio pré-fibrótico e pós-fibrótico, leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica (LEC) e NMP não classificáveis (1). A característica mais marcante desse conjunto de patologias é a ativação constitutiva de receptores tirosina quinase (responsáveis pela hematopoiese) que ocorre a partir da presença de uma variante genética em uma única célula tronco hematopoiética. As alterações genéticas descritas englobam translocações balanceadas, polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP do inglês, *single nucleotide polymorphysm*), e deleções. Fenotipicamente, as NMP são descritas pela hiperplasia de células mielóides diferenciadas de uma ou mais linhagens mielóide, clinicamente semelhantes (2,3).

As NMP classicamente denominadas como negativas para o cromossomo filadélfia (Ph⁻ do inglês, Philadelphia negative), ou seja, as que não apresentam a fusão gênica BCR-ABL, foram agrupadas nessa categoria pela sobreposição de características clínicas entre elas. Esse grupo engloba policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose (MF) (4). Elas são neoplasias raras, afetando menos de 6 pessoas em 100.000 por ano, principalmente adultos com idade média/avançada, entre 65 a 70 anos (5).

Policitemia vera é caracterizada por eritrocitose, predileção por complicações trombóticas, esplenomegalia leve a moderada e risco para transformação em mielofibrose ou leucemia mielóide aguda (LMA). Trombocitemia essencial é caracterizada por trombocitose, sintomas vasomotor debilitantes, trombose arterial ou venosa recorrentes (fator de risco aumentado para pacientes tabagistas, diabéticos ou hipertensos), complicações hemorrágicas e esplenomegalia leve a moderada. Mielofibrose é a mais debilitantes das três patologias após a transformação de PV ou TE. Apresenta-se com citopenia profunda, esplenomegalia severa e fibrose medular resultando em hematopoiese extramedular (6).

Em 2005, quatro grupos de pesquisadores identificaram um SNP no domínio pseudo-quinase (JH2 do inglês, *JAK homology-2*) do gene Janus Kinase-2 (*JAK2*) que daria início ao entendimento sobre a patogênese molecular dessas doenças (7–10). *JAK2* é uma tirosina quinase citoplasmática, membro da família janus tirosina quinase, necessária para a transdução de sinal das citocinas e seus receptores, como eritropoietina, trombopoietina, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos nas células hematopoiéticas, sendo, geralmente, ativada quando os ligantes ligam-se aos seus devidos receptores, com papel fundamental na mielopoiese (11–13).

O SNP (rs77375493) é caracterizado pela substituição de uma guanina (G) por uma timina (T) na posição 1849 (NM_001322194.1:c.1849G>T) do *exon 14* do gene *JAK2*, localizado no cromossomo 9p24. A variante genética patogênica resulta na substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 da proteína (NP_001309123.1:p.Val617Phe). A mutação *missense*, localizada no domínio regulatório JH2 (figura 1), leva a perda da função inibitória desse domínio, localizado *upstream* ao domínio tirosina quinase (JH1). Logo, o domínio JH1 perde o seu mecanismo de inibição tornando-se constitutivamente ativo, mesmo na ausência dos ligantes (7–12).

JAK2

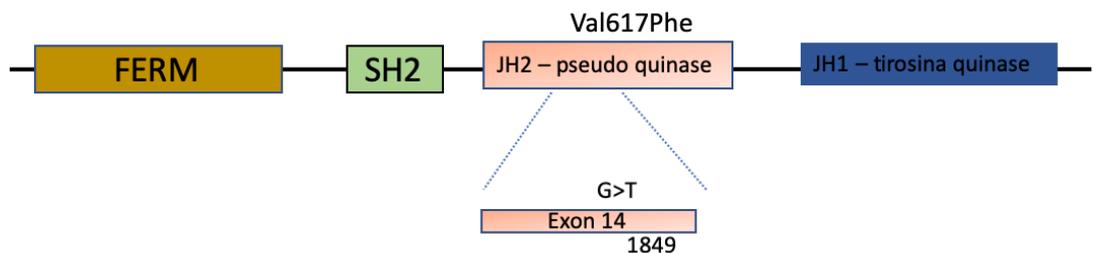


Figura 1 - Localização da variante somática *JAK2* V617F. Substituição c.1849G>T no de *exon 14* do gene *JAK2* e alteração na proteína (p.Val617Phe)

A variante *JAK2* V617F está presente em aproximadamente 96% dos pacientes com PV, 60% dos pacientes com TE e 65% dos pacientes MF (6) e sua detecção foi incluída como critério diagnóstico para as NMP a partir de 2008, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (14). A importância clínica para a sua quantificação baseia-se no fato de que a presença da alteração está associada a riscos aumentados de eventos cardiovasculares, trombose, transformação para mielofibrose em pacientes

com PV e níveis elevados do alelo mutante e conversão para leucemia em indivíduos com MFP (5).

A matriz biológica de escolha para a quantificação da variante é sangue total (coletado a partir de punção venosa) utilizando o anticoagulante ácido etileno diamino tetra cético (EDTA), devido a grande quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) derivada de células de origem mielóide e, principalmente, pela conveniência na aquisição quando comparado com medula óssea (15,16). Em 2018, Nystrand e colaboradores demonstraram que a variante somática JAK2 V617F poderia ser detectada em soro através de PCR digital (ddPCR). Além disso, encontraram uma maior proporção de alelos mutantes nessa matriz quando comparada com amostras pareadas de sangue total, o que poderia permitir aumento nas taxas de detecção para tais alelos. Resultados confiáveis foram observados quando mais de 5 ng de DNA foram utilizados na ddPCR (17).

Como o DNA genômico é liberado dos leucócitos para o soro durante o processo de coagulação (18) e o coágulo também libera DNA genômico para essa espécime ao longo do tempo (19), ambos processos poderiam ser empregados para aumentar a concentração de DNA no soro, o que garantiria a quantidade mínima necessária para a obtenção de resultados confiáveis. Ademais, algumas extrações automatizadas de DNA desenhadas para soro/plasma co-extraem inibidores de PCR quando são operadas com sangue total (ex: Nuclisens Easymag System, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, França) e etapas adicionais de purificação são necessárias para alcançar DNA amplificável (20,21), o que diminui a robustez das análises em laboratórios clínicos. Dessa maneira, o soro torna-se uma matriz biológica alternativa com algumas vantagens quando comparada ao sangue total para a detecção/quantificação da variante patogênica JAK2 V617F.

Equipamentos de ddPCR não são amplamente disponíveis aos laboratórios clínicos e de pesquisa como os equipamentos de PCR em tempo real (qPCR), principalmente nos países em desenvolvimento. Sendo assim, especialmente para esse público, a detecção da variante em soro poderia ser realizada empregando qPCR.

A literatura mostra que a detecção/quantificação da variante JAK2 V617F já foi realizada por diversas metodologias. Os primeiros relatos utilizaram sequenciamento de Sanger, tecnologia que apresenta sensibilidade em torno de 20%, e foi substituída ao longo do tempo por metodologias mais sensíveis na detecção dessa variante (22).

Atualmente, a detecção/quantificação da variante somática JAK2 V617F é realizada principalmente pelo método de PCR em tempo real alelo-específico (AS-qPCR). Esse método, também denominado como *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS), foi primeiramente relatado em 1989 por Newton e colaboradores e baseia-se na confecção de dois *primers* alelo específico, um específico para o alelo variante e outro específico para o alelo selvagem, sendo que, em ambos é incorporado deliberadamente um *mismatch* no segundo nucleotídeo a partir da extremidade 3' OH do *primer*, estratégia utilizada para aumentar a discriminação alélica entre os alelos selvagem e mutante (23). Esse método foi adaptado para PCR em tempo real e é o mais utilizado na quantificação da variante patogênica JAK2 V617F, devido a alta sensibilidade analítica menor que 1% de alelos mutantes (15). O teste é realizado através de duas reações de PCR independentes, uma específica para o alelo selvagem (JAK2 V617) e a outra, para o alelo mutante (JAK2 F617) e quantificação absoluta.

A quantificação absoluta fornece o número de cópias exato do alvo em questão através de curva padrão, que contém concentrações conhecidas dos alelos mutante e selvagem (24,25). Esse método de análise é aplicado, por exemplo, para a determinação de carga viral, no qual a quantidade de vírus, número de cópias exato, é importante para a conduta clínica terapêutica. A maior desvantagem em relação a quantificação absoluta é gerar e manter as curvas padrão (26). Quando não há a necessidade em saber o número de cópias do alvo, pode-se optar pelo método de quantificação relativa que mostra a relação quantitativa de um alvo em relação a um gene de referência, o *fold-change*. O método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$, também conhecido como método Cq comparativo, é bastante empregado na avaliação da expressão gênica, pois muitas vezes a ciência em quanto aumentou ou diminuiu a expressão de um gene relativamente a uma referência é mais informativa do que a informação da variação em número de cópias. O método fornece o *fold-change* do alvo de interesse em relação a um gene de referência em duas amostras distintas (amostras A e B), não sendo necessária a confecção de curva padrão (27).

São vários os genes de referência descritos na literatura, como GAPDH, β -actina, entre outros. O importante para a escolha de um gene de referência é que o mesmo não sofra variação nas duas condições testadas, ou seja, não sofra variação nas amostras A e B (27). Genes que apresentam regiões conservadas em sua sequência são bons alvos para qPCR, podendo ser utilizados como gene de

referência. A Ribonuclease P (RNase P) é uma enzima com papel importante na maturação de ácido ribonucleico transportador (tRNA) e na transcrição associada a RNA polimerase III. O gene que codifica a subunidade RNA da RNase P (*H1RNA*), apresenta somente um *exon* e é localizado no cromossomo 14q11.2 (28,29). Além disso, ele contém regiões conservadas e variáveis alternadas em sua sequência, o que permite a produção de pequenos fragmentos de PCR tornando-o bom alvo para qPCR (30). No entanto, neste estudo não se avalia a expressão gênica e sim a presença de uma mutação somática no DNA, como o gene da RNase P está presente em todo e qualquer genoma humano, sua validação é dispensável.

O método Cq comparativo apresenta algumas premissas que devem ser garantidas para que possa ser empregado com segurança: a) a eficiência de amplificação do alvo de interesse e do gene de referência devem ser similares e próximas de 1; e b) a quantidade do gene de referência deve ser estável nas duas amostras (amostras A e B) (27). Portanto, aplicando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para determinar a quantidade de alelos mutantes para a variante JAK2 V617F ou quantificar qualquer outra variante somática é vantajoso, pois é simples e fornece dados quantitativos, podendo ser também um método ortogonal para a validação de resultados de sequenciamento massivo paralelo (como requerido pelos protocolos de validação desse método) (31).

Atualmente, não há uma descrição clara na literatura sobre a aplicação do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para a quantificação da variante JAK2 V617F (e outras mutações somáticas), especialmente, se considerar a validação das premissas do método assim como os parâmetros de diagnóstico do teste como: limite de detecção (LOD), linearidade, precisão e exatidão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi quantificar a variante somática JAK2 V617F por AS-qPCR através do método Cq comparativo em amostras de sangue total-EDTA e definir os parâmetros diagnósticos do teste. Além disso, avaliar se a variante pode ser detectada e quantificada sob as mesmas condições previamente descritas em amostras de soro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se a quantificação da variante JAK2 V617F pode ser realizada através de AS-qPCR com o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ em DNA de amostras de sangue total-EDTA;
- b) Validar o método Cq comparativo para a quantificação da variante somática JAK2 V617F e encontrar a seu desempenho diagnóstico em amostras de sangue total-EDTA;
- c) Aplicar o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ nas condições previamente descritas e verificar se a variante JAK2 V617F pode ser detectada e quantificada em DNA de amostras de soro por AS-qPCR.

3 MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES

Foram selecionados para o estudo 27 indivíduos sem histórico de doenças hematológicas e 114 voluntários com resultados previamente conhecidos da variante JAK2 V617F, sendo 45 positivos para o alelo variante e 69, negativos. Os participantes com *status* prévio da variante foram obtidos a partir de um laboratório clínico e o teste foi realizado de acordo com Larsen e colaboradores (32). A partir do início do recrutamento, todos os pacientes que procuraram o laboratório clínico para a realização do teste JAK2 V617F foram convidados a participar do estudo. Aqueles que forneceram o consentimento foram convidados a retornar para nova coleta, sendo uma amostra de soro e uma de sangue total-EDTA. Após as amostras negativas terem atingido uma quantidade adequada, somente os pacientes positivos para o alelo mutante foram convidados a retornar.

3.2 COLETA DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO

Foram coletados dois tubos de cada participante através de punção venosa, sendo um tubo de sangue total, Vacuette EDTA K2, e um de soro, Vacuette Z soro com ativador de coágulo, ambos de 4mL (Greiner-bio-one, Kremsmunter, Áustria). Os tubos foram encaminhados refrigerados à unidade de processamento, sendo que o transporte ocorreu entre 4 e 24 horas. A partir do recebimento, as amostras de soro foram incubadas a temperatura ambiente, entre 48 e 60 horas, a fim de aumentar a quantidade de DNA no soro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2200 x g durante 10 minutos) e armazenadas a -20°C até o processamento. As amostras de sangue total-EDTA foram armazenadas a -20°C a partir do recebimento.

3.3 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada no equipamento NUCLISENS easyMAG (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, França) através do protocolo *Generic 2.0.1* com adição de 140 μ L de sílica magnética diluída em 600 μ L de tampão de lise e eluição em 55 μ L. O sangue passou por uma etapa prévia à extração que consistiu em 2mL de tampão de lise e 740 μ L de sílica magnética, em um tubo de 15mL, para evitar/minimizar a co-extração de inibidores de PCR. Essa etapa não foi necessária para o soro. A extração dos ácidos nucleicos também ocorreu no equipamento MagNA Pure 96 *Instrument* (Roche Diagnostics Ltd, Pleasanton, Califórnia, EUA), com o kit *MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit* para sangue total e *MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit* para soro, ambos eluídos em 50 μ L. A extração de sangue total-EDTA partiu de 200 μ L de amostra e a de soro, 500 μ L. Todas as extrações foram realizadas seguindo orientações do fabricante e o DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização dos testes.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA extraído foi quantificado por qPCR no equipamento StepOne™ *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) utilizando o gene da RNase P como alvo (marcado na fluorescência HEX/VIC), através de quantificação absoluta. O oligonucleotídeo ultrâmero (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, Iowa, EUA) empregado para a construção da curva padrão, assim como a sequência do conjunto de *primer/sonda* (*PrimeTime XL qPCR Assay*, *Integrated DNA Technologies*, Coralville, Iowa, EUA) para o alvo da RNase P foram descritos previamente (19) e encontram-se nas tabelas 1 e 2 a seguir.

Tabela 1 - Sequência do oligonucleotídeo ultrâmero empregado para a construção da curva padrão para a quantificação do DNA com o gene da RNase P como alvo

Sequência oligonucleotídeo 5'-3'
AGATTTGGACCTGCGAGCGGGTTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCGACTTGTGGAGACAGCCGCTC

Tabela 2 - Sequência do conjunto *primer*/sonda utilizado para determinar a quantidade de DNA das amostras com gene da RNase P como alvo

<i>Amplicon</i>	Sequência primer/sonda 5'-3'	Alvo
	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
65pb	HEX/TTCTGACCT/ZEN/GAAGGCTCTGCGCG/3IABkFQ	gene <i>RNase P</i>
	AGATTTGGACCTGCGAGCG	

A reação de PCR consistiu em 7,5µL de Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 1,5µL 10x RNase P *Prime Time Assay* (*Integrated DNA technologies*, Coralville, Iowa, EUA), 5µL de DNA e 1µL de água reagente nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C. O *threshold* foi estabelecido em 0,05 DeltaRn em todos os experimentos. A curva padrão foi confeccionada a partir de dois pontos de concentração, 10⁶ e 10³ cópias de RNase P por reação, concentração determinada a partir do oligonucleotídeo ultrâmero fita simples sintético, descrito na tabela 1. A figura 2 mostra o gráfico de amplificação de uma reação de quantificação de DNA, a partir da curva padrão que apresentou eficiência de 97,04% e R² = 1.

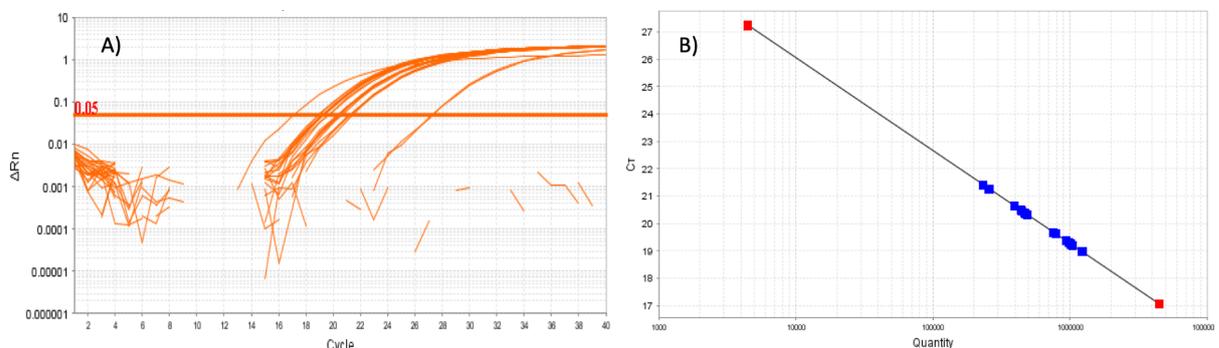


Figura 2 - Reação de quantificação de DNA. A) Curva de amplificação em escala log. B) Curva padrão estabelecida a partir de concentrações conhecidas da RNase P (10⁶ e 10³ cópias da RNase P)

A quantidade de DNA nas amostras foi calculada a partir da seguinte fórmula: número de cópias da RNase P, fornecida pelo equipamento, mais o peso do genoma

humano haploide em nanogramas (0,0033ng) dividido por 2, para corrigir o DNA fita dupla, mais o volume de *input* de DNA na reação de PCR (5 μ L). Todas as amostras de DNA foram normalizadas para 2,5 ng/ μ L, sendo utilizados 10 μ L nas reações de AS-qPCR.

$$\text{DNA (ng}/\mu\text{L)} = (\text{cópias RNase P} + 0,0033/2) + 5$$

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE SOMÁTICA JAK2 V617F UTILIZANDO O MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Os alelos mutante e selvagem do alvo JAK2 foram amplificados em duas reações AS-qPCR *multiplex* independentes, uma específica para o alelo selvagem e outra específica para o alelo mutante. O alvo da RNase P foi co-amplificado em cada reação para controlar se a quantidade de DNA estava adequada para a reação de PCR, e funcionar como gene de referência para o método Cq comparativo. As sequências de *primers* e sonda (*PrimeTime Integrated DNA technologies*, Coralville, Iowa, EUA) foram previamente descritas por Larsen e colaboradores (32) e encontram-se na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Sequências de *primers* e sonda utilizados nas reações de quantificação da variante JAK2 V617F

Sequência <i>primer</i> /sonda 5'-3'	Descrição
CTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA	<i>Primer</i> comum
FAM/TGAGCAAGC/ZEN/TTTCTACAAGCATTTGGTTT-3IABkFQ	Sonda
GTAGTTTACTTACTCTCGTCTCCACA _t AC	<i>Primer</i> referência
GTAGTTTACTTACTCTTGTCTCCACA _t AA	<i>Primer</i> alternativo

Ambos os *primers* reversos apresentam um *mismatch* no terceiro nucleotídeo a partir da extremidade 3' OH do *primer*, estratégia utilizada nas reações de AS-qPCR para aumentar a discriminação alélica. Os *primers* da RNase P são os mesmos utilizados na reação de quantificação do DNA, descritos na tabela 2. As reações de PCR foram realizadas no equipamento StepOne™ *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e consistiram em 15 μ L de Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts,

EUA), 3µL 10x JAK2 *Prime Time Assay*, 1,5µL 10x RNase P *Prime Time Assay* e 10µL de DNA normalizado (2,5 ng/µL) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. O *threshold* foi estabelecido em 0,1 DeltaRn em todos os experimentos. O produto de PCR apresenta 100 pares de bases (pb). Controles positivo, negativo e de contaminação foram processados paralelamente as amostras.

A reação JAK2 V617 foi considerada como amostra A e a reação JAK2 F617, amostra B, para a equação $2^{-\Delta\Delta Cq}$. A porcentagem de alelo mutante foi calculada a partir da seguinte fórmula: porcentagem de alelo mutante (JAK2 MUT %) é igual a 100% dividido por $2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ JAK2 mut})} + 1$ ou 100% dividido por $2^{-(Cq \text{ JAK2 wt} - Cq \text{ RNase P wt}) - (Cq \text{ JAK2 mut} - Cq \text{ RNase P mut})} + 1$, caso seja do interesse incluir a RNase P nos cálculos para controlar pequenas variações na quantidade de DNA entre as reações do alelo selvagem e mutante. JAK2 MUT % representa a porcentagem de alelos mutantes, Cq JAK2 wt, o ciclo quantitativo para o alelo selvagem; e Cq Rnase P wt, o ciclo quantitativo para Rnase P pesquisada juntamente com o alelo selvagem, Cq JAK2 Mut representa o ciclo quantitativo para o alelo mutante; Cq Rnase P mut, o ciclo quantitativo para Rnase P pesquisada juntamente com o alelo mutante.

$$\begin{aligned} \text{JAK2 MUT \%} &= 100\% / 2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ JAK2 mut})} + 1, \text{ ou} \\ \text{JAK2 MUT \%} &= 100\% / 2^{-(Cq \text{ JAK2 wt} - Cq \text{ RNase P wt}) - (Cq \text{ JAK2 mut} - Cq \text{ RNase P mut})} + 1) \end{aligned}$$

A fim de demonstrar que ambas as fórmulas fornecem resultados semelhantes, amostras com diferentes concentrações de alelo mutante (97,57%, 74,8%, 67,35%, 52,51%, 40,41%, 34,97%, 21,95%, 10,41% e 4,86%) foram calculadas utilizando as duas fórmulas, que derivaram da seguinte: a quantificação relativa de JAK2 mutante e selvagem é igual a porcentagem de alelos selvagem dividido pela porcentagem de alelos mutantes (equação 1).

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta Cq} &= \text{JAK2 WT \%} \div \text{JAK2 MUT \%}, \\ 2^{-(Cq \text{ JAK2 wt} - Cq \text{ RNaseP wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut} - Cq \text{ RNaseP mut})} &= \text{JAK2 WT \%} \div \text{JAK2 MUT \%} \text{ (equação 1)} \end{aligned}$$

Como o DNA dessas reações tem origem na mesma fonte (mesmo DNA extraído e normalizado), o Cq RNase P wt é o mesmo (ou muito próximo) do Cq RNase P mut. Sendo assim, a contribuição da RNase P para o cálculo pode ser negligenciada pois ela não altera o resultado da quantificação relativa, podendo ser

removida da equação (equação 2). Contudo, ela também pode ser mantida para controlar pequenas variações na quantidade de DNA em cada reação independente.

$$2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut})} = \text{JAK2 WT \%} \div \text{JAK2 MUT \%} \text{ (equação 2)}$$

A premissa que necessita ser garantida para que o método Cq comparativo possa ser utilizado é a que os alelos JAK2 selvagem e mutante sejam considerados o mesmo alvo na PCR. Para tanto, as reações devem apresentar eficiências de amplificação semelhantes. De fato, a única diferença entre as reações de PCR é o último nucleotídeo na extremidade 3' OH do *primer*. Sendo assim, é esperado amplificação semelhante para as duas reações, que deve ser confirmada.

Ainda em relação ao cálculo de quantificação da variante patogênica, a porcentagem de alelo selvagem mais a porcentagem de alelo mutante é igual a 100% de alelos JAK2 na amostra (equação 3).

$$\text{JAK2 WT \%} + \text{JAK2 MUT \%} = 100\% \text{ (equação 3)}$$

Substituindo a equação 3 na equação 2, temos a equação 4, que foi utilizada para calcular a porcentagem de JAK2 V617F nesse estudo:

$$\begin{aligned} 2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut})} &= (100\% - \text{JAK2 MUT \%}) \div \text{JAK2 MUT \%}, \\ 2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut})} &= (100\% \div \text{JAK2 MUT \%}) - (\text{JAK2 MUT \%} \div \text{JAK2 MUT \%}), \\ 2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut})} &= 100\% \div \text{JAK2 MUT \%} - 1, \\ [(2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut})}) + 1] &= 100\% \div \text{JAK2 MUT \%}, \end{aligned}$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div [(2^{-(Cq \text{ JAK2 wt}) - (Cq \text{ Jak2 mut})}) + 1] \text{ (equação 4)}$$

3.6 EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO

As eficiências de amplificação das curvas dos alvos mutante e selvagem foram determinadas a partir de diluições seriadas 1:2 ou 1:10 (4 a 5 pontos de diluição) em amostras positivas para a variante com concentrações variadas de alelo mutante (6% a 96% de JAK2 F617). Os parâmetros das curvas foram avaliados, principalmente o *slope*, no qual a eficiência de amplificação é derivada. Os *slopes* foram comparados por regressão linear no software Graphpad Prism versão 6.0 (Graphpad, Inc).

3.7 VARIAÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA (RNase P)

Os valores de Cq obtidos nas reações AS-qPCR dos alelos JAK2 V617 e JAK2 F617, em amostras com diferentes concentrações de alelo mutante, foram comparados através do teste t pareado (software Graphpad Prism versão 6.0 - Graphpad, Inc). Valor mínimo e máximo, média (M) e desvio padrão (SD, do inglês standard deviation) foram calculados.

3.8 DETERMINAÇÃO DO *CUT OFF*

Vinte e sete amostras de indivíduos saudáveis, sem histórico clínico de doenças hematológicas, foram submetidas ao ensaio teste (método Cq comparativo) e a amplificação inespecífica do alelo selvagem pelo *primer* do alelo mutante foi inspecionada, pois foi observada na publicação desses primers (32). Caso presente, a porcentagem de alelos mutantes foi calculada a partir da equação 4, descrita no item 3.5.

3.9 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de detecção foi determinado através da análise de regressão probit (Minibab versão 19.2.0.0) nos resultados obtidos a partir do método proposto em amostras de DNA construídas a partir de diluição seriada 1:2 partindo de 1,16% de alelos JAK2 V617F mutantes (1,16%, 0,58%, 0,29%, 0,145%, 0,073%, 0,036%, 0,018% e 0,009%). O experimento foi desenhado utilizando o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) EP17-A2 como base (33). Cada concentração foi construída a partir da quantidade apropriada de controle positivo Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen, Hilden, Alemanha) que contém 100% de alelos mutantes, diluída em DNA de amostras negativas (100% de alelos selvagem). Cada concentração foi testada 9 vezes. O limite de quantificação (LOQ) foi derivado desse experimento, através da comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados, pelo teste t para uma amostra (software Graphpad Prism versão 6.0, Graphpad, Inc). Foram calculados média e desvio padrão.

3.10 PRECISÃO

Três amostras com concentrações conhecidas de alelos mutantes (93%, 54% e 2,5%) foram submetidas ao método proposto em duplicatas durante nove dias úteis consecutivos (n=18, para cada concentração). Foram calculados média e coeficiente de variação (CV%) para cada reação e entre os diferentes dias. O experimento foi desenhado utilizando o protocolo do CLSI EP05-A2, adaptado (34).

3.11 EXATIDÃO

Os resultados do método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ foram comparados aos resultados obtidos a partir da utilização do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen, Hilden, Alemanha) no equipamento StepOne™ *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City,

Califórnia, EUA). O kit usa AS-qPCR e quantificação absoluta para a quantificação da variante patogênica JAK2 V617F. As concordâncias positiva, negativa e total (análise qualitativa) foram calculadas em porcentagem dos resultados concordantes em uma tabela 2x2. Correlação de Pearson, regressão linear e análise de Bland-Altman foram utilizados para calcular o coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (R^2) e a concordância (bias) entre ambos os métodos, respectivamente. Protocolo adaptado do CLSI EP15-A2 (35). Os cálculos foram realizados no software Graphpad Prism v6.0 (Graphpad, Inc) e o kit comercial foi processado seguindo as orientações do fabricante e definido como método referência. A linearidade do teste foi retirada desse experimento através dos resultados da regressão linear.

3.12 QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE SOMÁTICA JAK2 V617F EM AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE TOTAL-EDTA E SORO ATRAVÉS DO MÉTODO $2^{-\Delta\Delta CQ}$

Noventa e cinco amostras pareadas de sangue total-EDTA e soro, com *status* previamente conhecido da variante JAK2 V617F, foram submetidas ao método proposto. Detalhes sobre volume de amostra e condições de extração de DNA estão detalhadas na seção extração dos ácidos nucléicos. As mesmas análises descritas na seção exatidão foram realizadas nos dados obtidos a partir desse experimento: concordância positiva, negativa e total, correlação de Pearson, regressão linear e análise de Bland-Altman.

3.13 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa FEPECS/SES-DF (CAAE: 49481315.4.0000.5553) e o consentimento informado foi obtido de cada participante.

4 RESULTADOS

4.1 VALIDAÇÃO DAS PRERROGATIVAS PARA A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta Cq}$ NA QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE JAK2 V617F E AVALIAÇÃO DAS FÓRMULAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ALELOS MUTANTES

A primeira etapa do estudo foi avaliar se as premissas do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ são atendidas para que ele possa ser utilizado na quantificação da variante somática JAK2 V617F. Sendo assim, as eficiências (Eff) das curvas de amplificação JAK2 V617 e JAK2 F617 foram avaliadas através de diluição seriada 1:10 ou 1:2 em amostras com proporções variadas de alelo mutante, utilizando o método proposto (6,4% a 96% de JAK2 F617), demonstrado na tabela 4. A concentração relativa de 1 foi arbitrariamente atribuída ao primeiro ponto da diluição. As eficiências de amplificação dos alelos selvagem e mutante provenientes da AS-qPCR variaram de 100,54% a 109,72% e 97,91% a 111,76%, respectivamente, e não se mostraram diferentes quando comparadas na mesma amostra e entre as diferentes amostras, em todas as instâncias (valor de p encontra-se descrito na tabela 4 para cada concentração). Esses resultados mostram a semelhança entre os dois alvos, JAK2 V617 e F617, atendendo a primeira premissa do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Tabela 4 - Avaliação das eficiências (eff) de amplificação dos alelos mutante e selvagem da AS-qPCR a partir da diluição seriada de amostras com proporções variadas de JAK2 V617F

JAK2 MUT % (diluição)	Eff wt (%)	Eff mut (%)	P valor
96% (1:10)	109,72	106,85	0,61
81,4% (1:2)	104,17	106,9	0,45
62,5% (1:2)	102,48	102,43	0,95
50% (1:10)	109,57	110,02	0,71
36,9% (1:2)	104,94	104,35	0,91
13,1% (1:2)	102,56	97,91	0,51
6,4% (1:2)	100,54	111,76	0,22

A figura 3 mostra os dados da regressão linear determinados a partir da diluição seriada 1:10 e 1:2 com 4 a 5 pontos de diluição nas amostras com diferentes concentrações de alelos mutantes. Os dados mostram que não há diferença significativa entre as eficiências dos alvos ($p = 0,18$, avaliação do slope, em que as eficiências são derivadas, entre todas as amostras testadas), em todas as circunstâncias testadas, cumprindo a primeira premissa do método Cq comparativo.

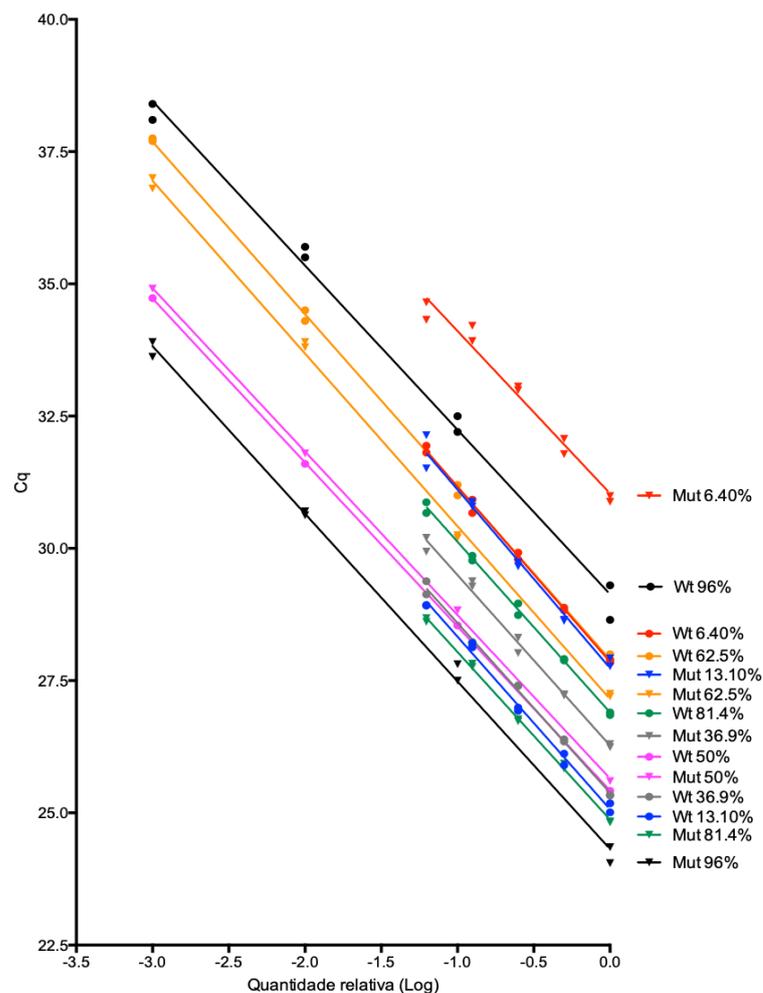


Figura 3 – Análise de regressão linear dos alelos selvagem (círculos) e mutante (triângulo) a partir de diluição seriada 1:10 e 1:2 das amostras com diferentes concentrações de JAK2 V617F. Cada ponto representa uma replicata técnica

Além da semelhança entre as eficiências de amplificação dos alelos mutante e selvagem, a segunda premissa do método Cq comparativo é a manutenção da quantidade do gene de referências nas duas condições a serem testadas, amostras A e B, definidas para esse estudo. O gene de referência selecionado foi a RNase P,

utilizada para quantificar e normalizar o DNA das amostras. Em todas as instâncias, o Cq da RNase P em ambos os alelos foi menor que 30. O menor valor de Cq foi 27,21 e o maior 29,75 com média e desvio padrão de $28,75 \pm 0,5406$ e $28,74 \pm 0,5403$ para o alelo selvagem e mutante, respectivamente. O teste t pareado foi aplicado aos valores de Cq da RNase P obtidos a partir das reações JAK2 V617 e JAK2 F617 em amostras com diferentes proporções de alelo mutante, não sendo observada diferença entre eles ($p = 0,65$). A figura 4 demonstra em cinza os valores de Cq da RNase P em cada uma das reações (JAK2 V617 e JAK2 F617) e em preto estão representados média e desvio padrão). Os dados mostram que a variação entre os ciclos quantitativos do gene de referência nos alelos selvagem e mutante para cada amostra não foi significativa. Sendo assim, a segunda premissa do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ foi atendida, garantindo a sua correta utilização a fim de quantificar a variante JAK2 V617F.

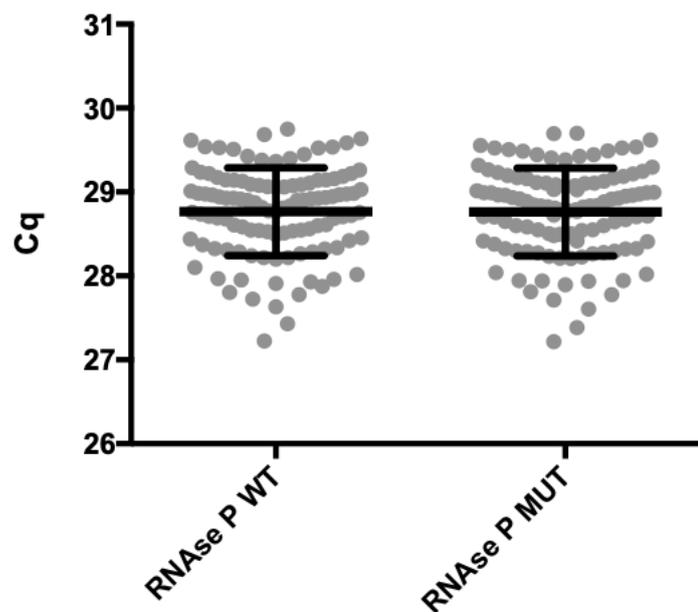


Figura 4 – Valores de Cq para RNase P obtidos a partir da AS-qPCR de JAK2 V617 e JAK2 F617 em amostras com diferentes proporções de alelos mutantes (teste t pareado, $p = 0,65$)

Posteriormente, as duas equações para a quantificação do alelo mutante, $JAK2\ MUT\ \% = 100\% \div ((2^{-(Cq\ JAK2\ wt)} - (Cq\ Jak2\ mut)) + 1)$ ou $JAK2\ MUT\ \% = 100\% \div ((2^{-(Cq\ JAK2\ wt - Cq\ RNaseP\ wt)} - (Cq\ Jak2\ mut - Cq\ RNaseP\ mut)) + 1)$, foram testadas para avaliar se forneciam quantificações semelhantes. Submetendo os valores de Cq obtidos das reações de AS-qPCR em amostras com as concentrações de 97,57%, 74,8%, 67,35%, 52,51%,

40,41%, 34,97%, 21,95%, 10,41% e 4,86% de JAK2 F617 em ambas as fórmulas, os resultados foram os seguintes: correlação de Pearson com $r = 1$, regressão linear com $R^2 = 0,999$ e análise de Bland-Altman com bias de -0,61% (95% IC = -2,5% a 1,3%). A figura 5 dispõe os resultados acima em que, no eixo X estão plotados os resultados da fórmula original $\Delta\Delta Cq$, ou seja, a fórmula que leva em consideração os valores de Cq da RNase P, e no eixo Y estão os resultados obtidos a partir da fórmula que não utiliza os Cqs da RNase P (ΔCq). Em conjunto, as análises mostram alta concordância entre os resultados, comprovando que ambas as fórmulas fornecem quantificações semelhantes.

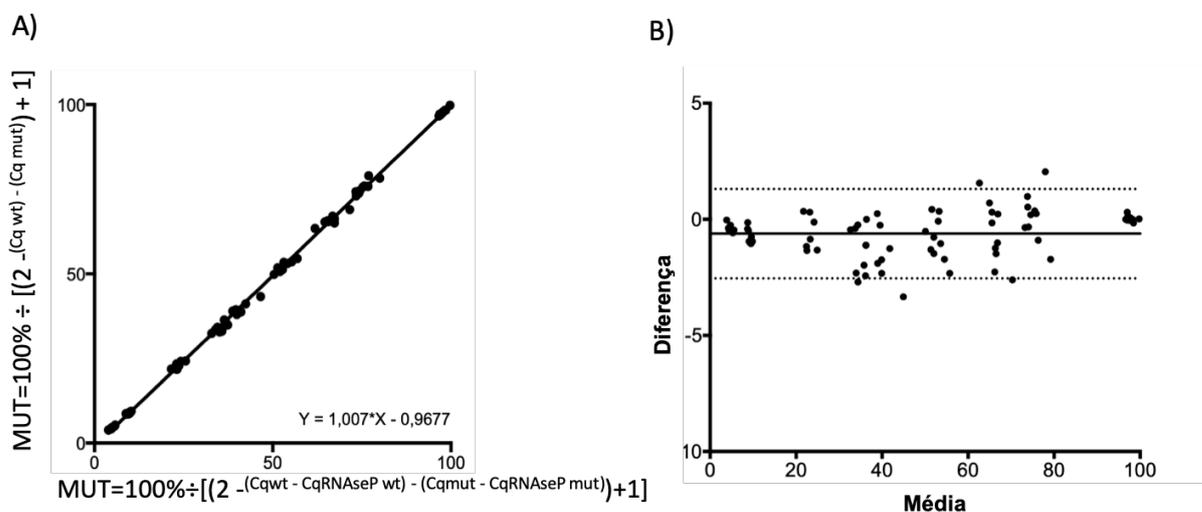


Figura 5 – Análise comparativa dos resultados obtidos da quantificação da variante JAK2 V617F de amostras com diferentes proporções de alelos JAK2 utilizando duas fórmulas de quantificação relativa. A) regressão linear ($r = 1$; $R^2 = 0,999$, $p = <0,0001$). B) Análise de Bland-Altman (bias = -0,61%, 95% IC= -2,5% a 1,3%)

Ao garantir a correta utilização do método Cq comparativo e a fórmula para calcular a proporção de alelos JAK2 V617F, duas amostras foram selecionadas para demonstrar passo a passo como foi calculada a porcentagem desses alelos em cada amostra no estudo. A figura 6 mostra a curva de amplificação de uma amostra que apresenta 3,44% de alelos variantes. O alelo selvagem (wt do inglês, wild-type) aparece na cor azul, o alelo mutante (mut) na cor vermelha e a RNase P na cor verde (as curvas de amplificação para esse alvo nas amostras A e B são iguais e, dessa maneira, aparecem sobrepostas). A diferença entre os ciclos quantitativos de JAK2 wt e JAK2 mut está descrito na figura entre as duas linhas tracejadas e foi 4,81. Sendo assim,

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div ((2^{-\text{Cq JAK2 wt}} - \text{Cq Jak2 mut}) + 1)$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div ((2^{-4,81}) + 1)$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div (28,051 + 1)$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div 29,051$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 3,44\%$$

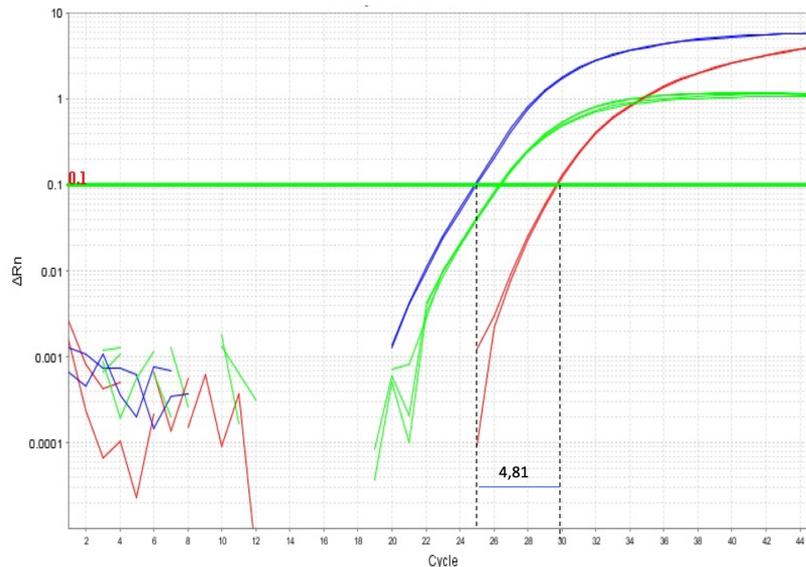


Figura 6 – Análise da amplificação da reação de quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra com 3,44% de alelos variantes. JAK2 V617 (azul), JAK2 F617 (vermelho) e RNase P (verde).

A diferença de Cq entre os alelos encontra-se entre as linhas tracejadas (4,81)

A segunda amostra selecionada apresenta 80,5% de alelos variantes e a diferença entre os ciclos quantitativos de JAK2 wt e JAK2 mut foi -2,05, localizado na figura 7 entre as linhas tracejadas. O alelo selvagem (wt do inglês, wild-type) aparece na cor azul, o alelo mutante (mut) na cor vermelha e a RNase P na cor verde. Da mesma maneira que a figura 6, os ciclos quantitativos para o alvo da RNase P nas amostras A e B são iguais e, conseqüentemente, aparecem sobrepostos na curva de amplificação. Assim sendo,

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div ((2 - (\text{Cq JAK2 wt} - \text{Cq Jak2 mut})) + 1)$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div ((2 - (-2,05)) + 1)$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 100\% \div (0,241 + 1)$$

$$\text{JAK2 MUT \%} = 80,5\%$$

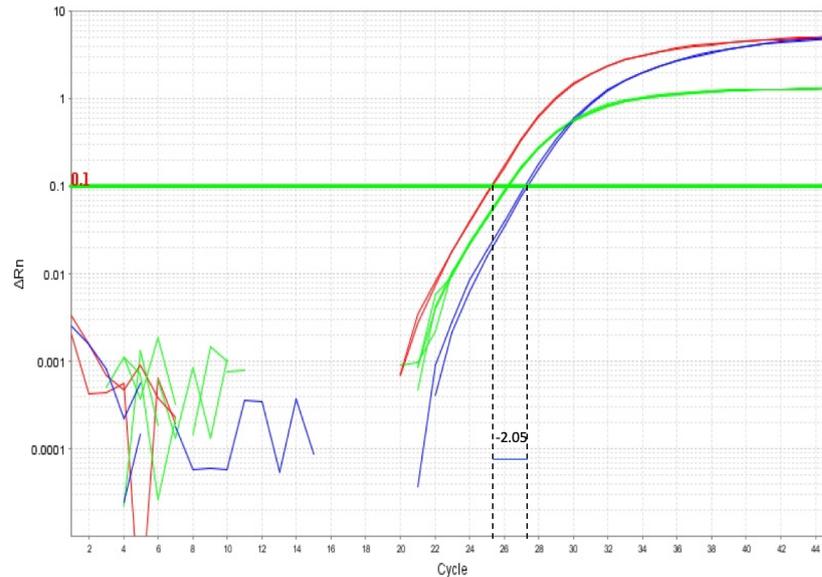


Figura 7 - Análise da amplificação da reação de quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra com 80,5% de alelos variantes. JAK2 V617 (azul), JAK2 F617 (vermelho) e RNase P (verde). A diferença de Cq entre os alelos encontra-se entre as linhas tracejadas (-2,05)

4.2 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE JAK2 V617F ATRAVÉS DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Após garantir a correta utilização do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e as fórmulas para a quantificação da variante JAK2 V617F, a etapa seguinte foi determinar a performance diagnóstica do teste. A primeira etapa consistiu em determinar se o método proposto fornecia resultados positivos em amostras sabidamente negativas. Vinte e sete amostras de indivíduos sem histórico clínico de doenças hematológicas foram testadas. Dessas, 26 não apresentaram amplificação após 45 ciclos de PCR. A figura 8 apresenta a curva de amplificação da quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra negativa para o alelo mutante. O alelo selvagem (wt do inglês, *wild-type*) aparece na cor azul, o alelo mutante (mut) na cor vermelha e a RNase P na cor verde (Cq das amostras A e B são iguais e aparecem sobrepostos na figura 8).

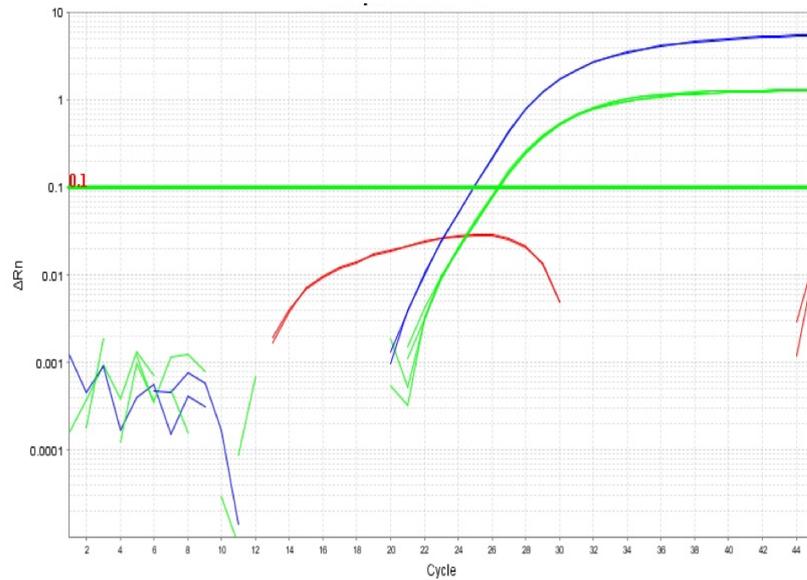


Figura 8 - Análise da amplificação da reação de quantificação da variante JAK2 V617F em uma amostra que não apresenta alelos variantes. JAK2 V617 (azul), JAK2 F617 (vermelho) e RNase P (verde)

Para esse experimento de determinação do valor de corte (*cut off*), apenas uma amostra apresentou sinal positivo no Cq 42, valor correspondente a 0,0015% de alelos mutantes, calculado de acordo com a equação 4, descrita no item 3.5. Então, arbitrariamente, estabeleceu-se o valor de corte com Cq maior que 42, ou seja, amostras que apresentaram amplificação com Cq acima de 42 foram determinadas como negativas para a variante pois a amplificação foi considerada como inespecífica.

O limite de detecção foi estabelecido a partir da diluição seriada 1:2 do controle positivo com 100% de alelos mutantes do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen, Hilden, Alemanha) adicionado ao DNA de amostras sabidamente negativas. Cada concentração foi testada nove vezes. As amostras com 1,16%, 0,58% e 0,29% de alelos mutantes foram detectadas 100% das vezes, 9 resultados positivos em 9 reações; a amostra com 0,145% de alelos mutantes, das 9 reações, 8 mostraram resultado positivo (88,8% de detecção); a amostra com 0,073% de alelos mutantes, apresentou taxa de detecção de 44,4% (4 resultados positivos em 9 testados); e as amostras com 0,036%, 0,018% e 0,09% de alelos mutantes não exibiram resultado positivo em nenhuma das 9 reações realizadas (0% de detecção), dados demonstrados na tabela 5 abaixo. Aplicando a análise de regressão probit, o LOD obtido foi de 0,15% (95% IC = 0,12% a 0,21%), demonstrando que o teste apresenta uma ótima sensibilidade analítica (figura 9).

Tabela 5 - Determinação do LOD a partir da diluição seriada 1:2 de uma amostra com 1,16% de alelos mutantes

JAK2 MUT %	Testado (n)	Detectado (n)	Deteção (%)	Probabilidade de deteção
1,16	9	9	100	1
0,58	9	9	100	1
0,29	9	9	100	1
0,145	9	8	88	0,939
0,073	9	4	44	0,28
0,036	9	0	0	0,047
0,018	9	0	0	0,013
0,009	9	0	0	0,006

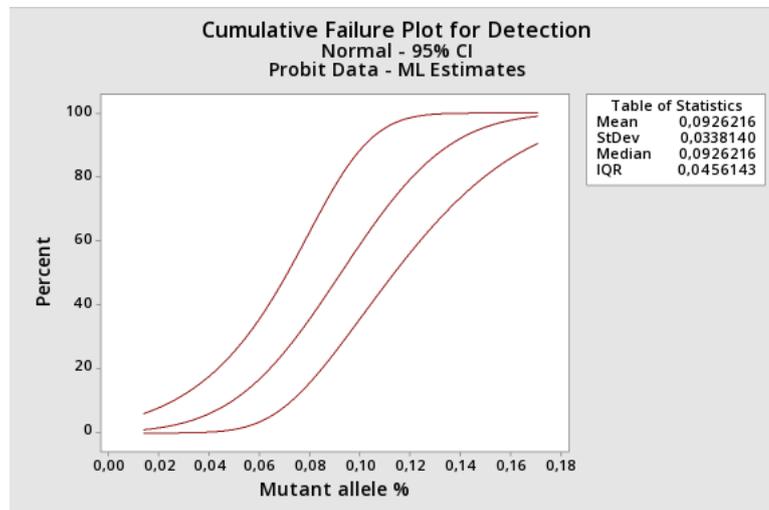


Figura 9 – Análise gráfica do LOD. Determinação da percentagem de deteção da variante a partir da diluição seriada 1:2 de uma amostra sintética com 1,16% de JAK2 V617F (LOD = 0,15%, 95% IC = 0,12% – 0,21%)

O limite de quantificação foi retirado a partir desse experimento, comparando os resultados obtidos com os resultados esperados, para cada ponto da diluição. Utilizando as amostras com 1,16%, 0,58%, 0,29% e 0,145% de alelos mutantes (detectadas pelo menos em 8 das 9 reações) os resultados de média e desvio padrão foram os seguintes: 1,03% \pm 0,25% ($p=0,17$), 0,19% \pm 0,06% ($p<0,0001$), 0,048% \pm 0,037% ($p<0,0001$) e 0,0098% \pm 0,0053% ($p<0,0001$), respectivamente (demonstrado na figura 10). Observa-se que o teste é linear até a proporção de 1,16% de alelos mutantes e abaixo desse valor, perde a sua linearidade. Posto isso, esse foi o limite de quantificação estabelecido.

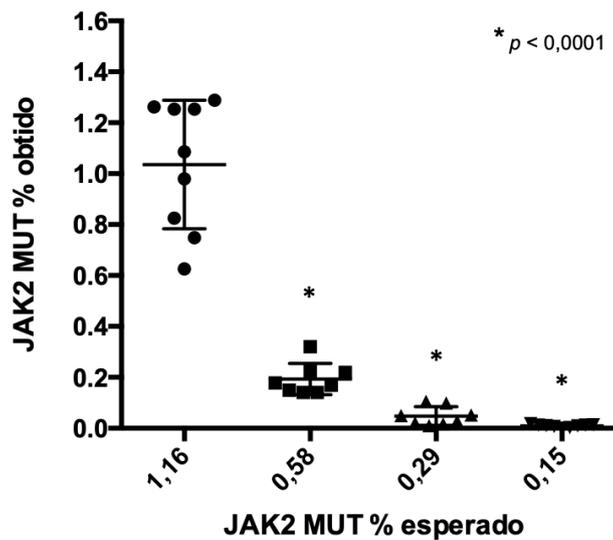


Figura 10 - Definição do LOQ a partir do experimento de determinação do limite de detecção. Análise dos resultados de quantificação da variante JAK2 V617F obtidas das replicatas (n = 9) em amostras com 1,16%, 0,58%, 0,29% e 0,15% de JAK2 F617 (linha central e barra representam média e desvio padrão, respectivamente)

Em seguida, amostras com 3 diferentes concentrações de alelos mutantes (93%, 54% e 2,5%) foram testadas em duplicatas durante 9 dias úteis consecutivos. Os resultados referentes a esse experimento estão dispostos na figura 11 abaixo. Média, coeficiente de variação (CV%) total, CV% entre os dias e CV% na mesma reação foram os seguintes: 93,5%, 0,40%, 0,26% e 0,30%; 54,14%, 1,92%, 1,15% e 1,53%; 2,76%, 11,12%, 9,22% e 6,21%, para as amostras com 93%, 54% e 2,5% de JAK2 F617, respectivamente, certificando que o teste é altamente preciso em uma ampla faixa de quantificação de alelos mutantes, com variação menor que 12%.

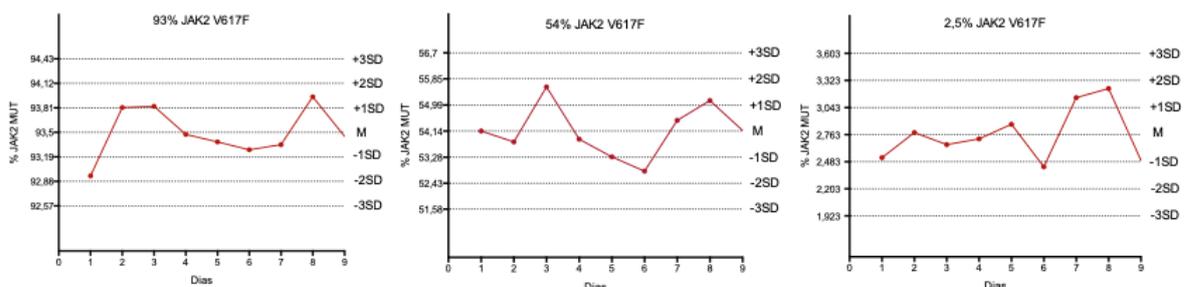


Figura 11 – Análise da precisão do método proposto a partir da quantificação de JAK2 V617F em 9 dias consecutivos em amostras com 93%, 54% e 2,5% de alelos mutantes (n = 18). Para cada concentração foram estabelecidos média e desvio padrão, demonstrados em cada gráfico

Finalmente, a exatidão do teste foi definida comparando os resultados obtidos do método proposto com os do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen, Hilden, Alemanha), considerado como método referência. Vinte e três amostras positivas para a variante, com a proporção de alelos mutantes variando de 1,5% a 99,98%, e 19 amostras negativas foram submetidas ao experimento. A análise qualitativa demonstrou concordância positiva, negativa e total de 100% entre os dois métodos, demonstrada na tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Análise qualitativa dos resultados da quantificação da variante JAK2 V617F obtidos a partir do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (método referência) e o método proposto $2^{-\Delta\Delta CQ}$

Método $2^{-\Delta\Delta CQ}$	Kit Ipsogen JAK2 MutaQuant		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	23	0	23
Negativo	0	19	19
TOTAL	23	19	42

A análise quantitativa da exatidão foi realizada a partir da comparação entre os resultados positivos obtidos do método referência e o método proposto. Foram avaliados regressão linear ($R^2 = 0,996$), correlação de Pearson ($r = 0,998$; $p < 0,0001$) e análise de Bland-Altman que mostrou bias de 1,91% (linha contínua, demonstrada na figura 8B) com intervalo de confiança de 95% de -1,84% a 5,6%, exposto na figura 12 com a linha tracejada. Os resultados dessa análise, em conjunto, mostraram que a quantificação da variante somática JAK2 V617F pode ser realizada utilizando o tanto o método de quantificação absoluta quanto a relativa pois eles apresentam resultados quantitativos semelhantes (diferença média de 1,91%). A linearidade do método proposto pôde ser retirada a partir desse experimento, pois foi avaliada a resposta linear dos pontos testados que abrangem toda a faixa de variação de alelos mutantes, sendo estabelecida na faixa de 1,16% a 99,98% de alelos mutantes.

Todos os experimentos acima descritos foram realizados em amostras de DNA de sangue total-EDTA.

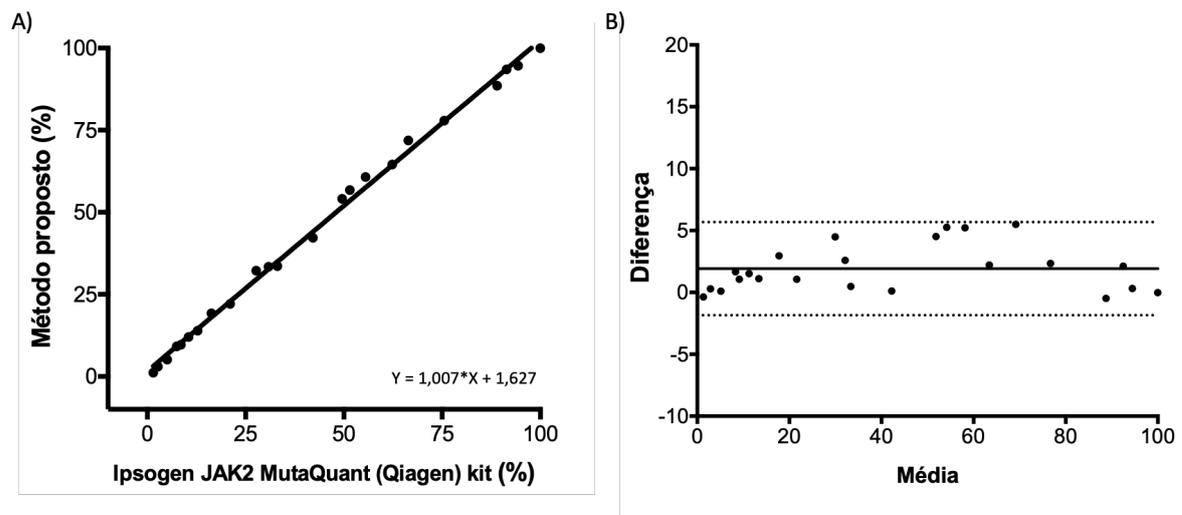


Figura 12 – Avaliação entre os resultados de quantificação da mutação JAK2 V617F obtidos a partir do método proposto e do kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (método referência). A) Regressão linear ($r = 0,998$, $p < 0,0001$; $R^2 = 0,996$). B) Análise de Bland-Altman (bias = 1,91%, (95% IC = -1,84% a 5,6%)

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA VARIANTE JAK2 V617F ATRAVÉS DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA $2^{-\Delta\Delta Cq}$ EM AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE TOTAL-EDTA E SORO

Após a validação do método proposto, a etapa seguinte foi verificar se a quantificação da variante JAK2 V617F poderia ser realizada nas mesmas condições previamente validadas, ou seja, AS-qPCR e o método Cq comparativo, utilizando como matriz biológica amostras de soro.

Para esse experimento, o sangue total-EDTA foi considerado como matriz referência. Noventa e cinco amostras com *status* da variante previamente conhecido foram avaliadas, sendo 35 positivas para o alelo variante e 60, negativas. O volume inicial de amostra utilizado para a extração dos ácidos nucléicos para sangue total foi 200 μ L e, para o soro, 500 μ L. Todas as amostras foram normalizadas para 25ng de DNA por reação de AS-qPCR. A análise qualitativa pareada apresentou 100% de concordância positiva, negativa e total entre as duas matrizes. A figura 13 apresenta a análise quantitativa entre os resultados positivos pareados obtidos a partir da quantificação da variante somática JAK2 V617F em sangue total-EDTA e soro. A correlação de Pearson apresentou $r = 0,982$, ($p < 0,0001$), regressão linear com $R^2 =$

0,965 e análise de Bland-Altman com bias = 4,058% e intervalo de confiança de 95% de -6,6% a 14,7% (bias representado na figura 9B com linha contínua e o intervalo de confiança apresentado pelas linhas tracejadas).

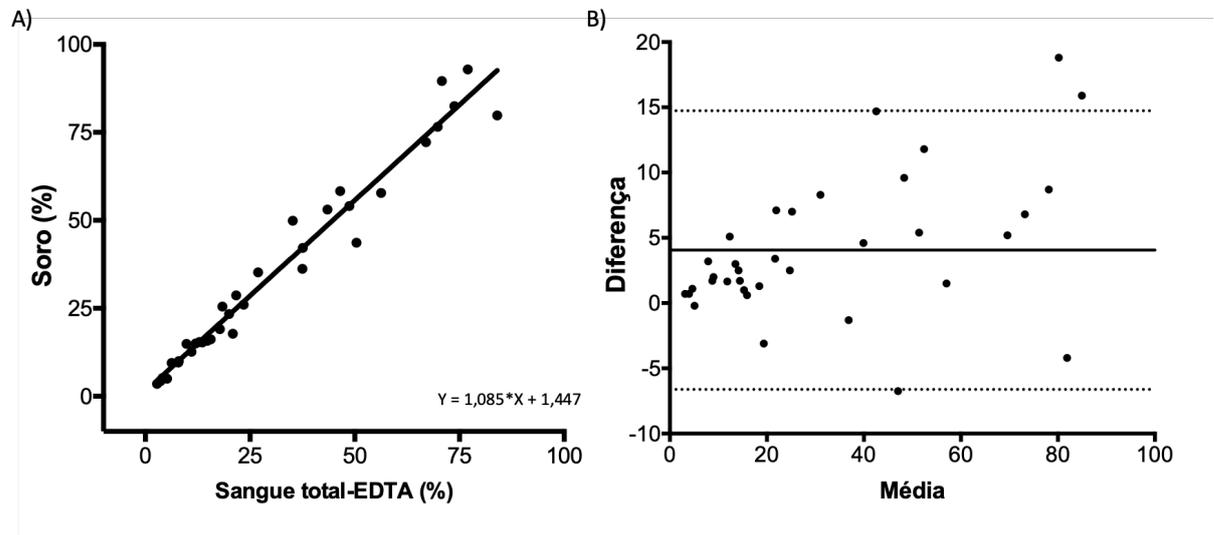


Figura 13 - Avaliação entre os resultados de quantificação da mutação JAK2 V617F obtidos através do método Cq comparativo, a partir de amostras de sangue total-EDTA (matriz referência) e soro. A) Regressão linear ($r = 0,982$, $p < 0,0001$; $R^2 = 0,965$). B) Análise de Bland-Altman (bias = 4,058%, (95% IC = -6,6% a 14,7%)

Avaliando os resultados obtidos, observa-se que a diferença entre as matrizes é maior em amostras com maior proporção de alelos mutantes. Sendo assim, as amostras de soro foram divididas em dois grupos, amostras com menos de 20% de JAK2 F617 e amostras com mais de 20% de alelos mutantes. No grupo com menos de 20% de JAK2 F617 ($n = 15$), os resultados obtidos das análises da correlação de Pearson, regressão linear e Bland-Altman foram: $r = 0,966$ ($p < 0,0001$), $R^2 = 0,934$ e bias = 1,737% (95% IC = 0,83% a 4,30%), respectivamente. No grupo com mais de 20% de JAK2 F617 ($n = 20$) os resultados das mesmas análises foram: $r = 0,960$ ($p < 0,0001$), $R^2 = 0,921$ e bias = 5,798% (95% IC = -7,26% a 18,86%), respectivamente. Esses resultados mostram que as amostras com maior proporção de alelos variantes contribuem mais extensivamente na diferença observada entre os resultados da quantificação de JAK2 V617F nas duas matrizes.

5 DISCUSSÃO

O estudo avaliou se a quantificação da variante somática JAK2 V617F poderia ser corretamente realizada através de AS-qPCR utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e a performance do teste, usando protocolos padrão de validação em diagnóstico molecular, foi definida. Em seguida, verificou-se se o método proposto poderia ser corretamente empregado para detectar e quantificar a variante patogênica em amostras de soro.

Primeiramente, as prerrogativas do método Cq comparativo foram avaliadas e os experimentos foram realizados para verificar se as premissas do método de quantificação relativa eram atendidas e, assim, garantir a sua correta utilização na quantificação da variante JAK2 V617F.

Assim, a primeira etapa avaliou as eficiências das curvas de amplificação dos alelos selvagem e mutante com o intuito de verificar a semelhança entre elas e garantir a primeira premissa para que o método Cq comparativo pudesse ser utilizado. A reação JAK2 V617 foi considerada como amostra A e a reação JAK2 F617 como amostra B, para a equação $2^{-\Delta\Delta Cq}$. A única diferença entre ambas é o último nucleotídeo na extremidade 3' OH do *primer* e, por essa razão, é previsto que ambas apresentem eficiências de amplificação semelhantes. Os experimentos realizados com as amostras em diferentes proporções de alelo mutante (variaram de 96% a 6,4%) comprovaram a semelhança entre as eficiências das reações, tanto para a mesma reação como entre as diferentes reações testadas, atendendo a primeira premissa do método Cq comparativo.

A segunda premissa refere-se à manutenção da quantidade do gene de referência nas duas condições, A e B. Os resultados mostraram que o Cq da RNase P, em todas as circunstâncias, não foi maior que 30. Além disso, não houve variação significativa entre os ciclos quantitativos da RNase P nos dois alelos para a mesma amostra ($p = 0,65$). O DNA utilizado nas reações JAK2 V617 e JAK2 F617 foi normalizado a partir da RNase P e, independente disso, provém da mesma origem (mesma extração). Sendo assim, a semelhança entre os ciclos quantitativos também é prevista, pois a única diferença esperada é a variação provinda da pipetagem em poços distintos. Dessa maneira, o método Cq comparativo é um método passível de escolha para a quantificação da variante somática JAK2 V617F nas condições

previamente descritas, pois atendem as premissas do método. Ao nosso conhecimento, essa é a primeira vez que os métodos $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e AS-qPCR são agrupados e forneceram resultados confiáveis na relação de alelos variantes em uma amostra

Além de garantir a correta utilização do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, também foi avaliada a relação entre a porcentagem da variante e os valores de Cq na amplificação dos alelos selvagem e mutante que deriva das fórmulas: $JAK2\ MUT\ \% = 100\% \div ((2^{-(Cq\ JAK2\ wt)} - (Cq\ Jak2\ mut)) + 1)$ ou $JAK2\ MUT\ \% = 100\% \div ((2^{-(Cq\ JAK2\ wt - Cq\ RNaseP\ wt)} - (Cq\ Jak2\ mut - Cq\ RNaseP\ mut)) + 1)$. A fórmula original $2^{-\Delta\Delta Cq}$ inclui o Cq do gene de referência nas duas condições e como demonstrado nesse estudo, o Cq da RNase P para ambos alelos na mesma amostra não é diferente, fato conjecturado já que o *input* de DNA das reações para o alelo selvagem e mutante provem da mesma extração e normalização.

Ainda assim, ambas as fórmulas foram comparadas e os resultados demonstraram que elas fornecem resultados semelhantes ($r = 1$; $R^2 = 0,999$). Sendo assim, os valores de Cq para a RNase P foram negligenciados para os cálculos da porcentagem de alelo mutante nas amostras desse estudo, contudo foram considerados em todos os experimentos, pois a RNase P auxilia no controle de erros de pipetagem. A maior vantagem em optar pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ é excluir a necessidade de curva padrão.

Uma vez estabelecida a possibilidade da correta utilização do método Cq comparativo e a fórmula para calcular a quantidade de alelos mutantes, a etapa seguinte foi definir a performance diagnóstica do teste utilizando protocolos padrão de validação para diagnóstico molecular. Parâmetros como exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade foram determinados. Valores definidos para cada um desses parâmetros não estão disponíveis na literatura de um modo geral, pois sua variação é ampla e cada condição (método, analito) apresenta suas particularidades.

Primeiramente, foi investigado se a AS-qPCR para JAK2 V617F gera sinal positivo no *template* incorreto, ou seja, se ocorre amplificação do alelo selvagem pelo *primer* mutante. A amplificação tardia do alelo “incorreto” pelo *primer* específico é comum na AS-qPCR (19) e foi observada na publicação que descreveu os *primers* (32). Essa amplificação ocorre, pois o *mismatch* no *primer* não impede a amplificação e sim atrasa a sua extensão, permitindo a genotipagem (19). A amplificação tardia do alelo selvagem pelo *primer* mutante foi rara nesse estudo, tendo sido observada

somente em uma amostra dentre as 27 que foram testadas em indivíduos sem histórico clínico de doenças hematológicas. Além disso, não houve amplificação inespecífica em nenhuma das amostras testadas dos voluntários com resultados sabidamente negativos para a variante patogênica. Esse dado demonstra que a presença/ausência do alvo não vai depender de um valor de *cut off* estabelecido e, sim, da presença/ausência de amplificação, o que facilita a definição do resultado. Dessa maneira, concluiu-se que a amplificação inespecífica consistente do alelo selvagem JAK2 V617 pelo primer mutante, descrita na publicação de Larsen e colaboradores (32), não é prevalente para o método proposto. Ainda assim, devido a presença dessa amplificação inespecífica, estabeleceu-se o valor de corte no Cq 42, ou seja, amostras com Cq > 42 foram consideradas negativas para a variante.

A ausência de amplificação tardia do alelo selvagem pelo *primer* mutante pode estar associada ao formato *multiplex* do teste, já que a RNAse P é co-amplificada com o JAK2. A reação *multiplex* poderia, de alguma maneira, atrasar ainda mais a amplificação inespecífica, por exemplo, através de crosstalk entre os filtros de fluorescência FAM e HEX ou mesmo da competição pelos componentes da reação (enzima, substrato) (36), a ponto de não haver ciclos suficientes na reação de PCR para que a amplificação ocorresse, como pôde ser observado nesse estudo que mesmo após 45 ciclos o sinal inespecífico não foi visualizado, com exceção de uma única amostra.

Em relação a performance do método proposto, o mesmo demonstrou ser altamente exato apresentando boa concordância e correlação, com diferença média de 1,91% (95% IC = -1,84% a 5,6%), comparado ao kit comercial (método referência) que realiza quantificação absoluta. Além disso, extremamente sensível, sendo capaz de detectar concentrações de alelos mutantes em baixíssimas concentrações, 0,15% de JAK2 F617 (95% CI = 0,12% a 0,21%). Resultados no intervalo de 0,15% a menor que 1,16% de alelos mutantes devem ser reportados como detectado abaixo do limite de quantificação, já que valores menores que 1,16% estão fora da linearidade do teste. Ademais, o método teste mostrou-se bastante preciso ao longo da linearidade estabelecida com CV% total de 0,4%, 1,92% e 11,12% para amostras com proporções de alelos mutantes de 93%, 54% e 2,5%, respectivamente.

Os métodos que trabalham com amplificação de ácidos nucléicos são geralmente muito mais sensíveis quando comparados a outras metodologias comumente presentes em laboratórios clínicos e suas medidas podem ser menos

precisas, sendo aceitáveis coeficientes de variação maiores, como por exemplo, CV% de 40 a 24% em exames de carga viral (37). Outro ponto importante é que essa variação aumenta, a medida que a concentração do alvo diminui (37,38), o que foi constatado nos experimentos realizados nesse estudo. Compilando todos os resultados obtidos a partir da avaliação da performance diagnóstica do teste, nota-se que a variante somática JAK2 V617F pode ser corretamente quantificada por AS-qPCR através do método Cq comparativo em amostras de sangue total-EDTA.

Após a validação dos parâmetros do método proposto, o próximo passo foi avaliar se a variante JAK2 V617F poderia ser detectada e quantificada em amostras de soro, assim como em sangue total-EDTA, através de AS-qPCR e quantificação através do método Cq comparativo.

A concentração de DNA genômico aumenta no soro quando incubado a temperatura ambiente, caso permaneça em contato com o coágulo (19). Essa estratégia foi empregada para garantir a concentração necessária de DNA nessa matriz biológica para a reação de PCR (25 ng/reação). Além disso, o DNA do soro é altamente fragmentado (fragmentos em torno de 150 pb) devido a atividade das DNases (39) e pela sua própria origem, provavelmente derivada de apoptose (19,40). Sendo assim, produtos de PCR com tamanhos menores amplificam melhor nas reações que provem dessa matriz biológica. Os produtos de PCR de JAK2 V617F gerados nesse estudo apresentam 100 pb e, portanto, o tamanho do *amplicon* não foi uma preocupação na detecção/quantificação dos alelos JAK2 V617F no soro.

Os resultados dessa análise demonstraram que não só a variante JAK2 V617F pode ser detectada no soro por AS-qPCR mas também que, comparados a amostras pareadas de sangue total-EDTA, a diferença média da quantificação da variante entre as matrizes é em torno de 4%, (bias = 4,058%, 95% IC = -6,6% a 14,7%). Esses resultados corroboram com uma descrição prévia que utilizou ddPCR (17), sugerindo que a utilização do soro pode permitir aumento na taxa de detecção dos alelos variantes. Além disso, outras vantagens podem ser apontadas ao utilizar o soro: 1) apresenta menos inibidores quando comparado ao sangue total-EDTA; 2) pode ser aplicado diretamente na qPCR (19); 3) é mais amigável aos equipamentos automatizados de extração de DNA, não sendo necessária etapas adicionais de purificação para obter DNA amplificável (21), o que permite uma análise com maior robustez; 4) é a matriz biológica mais comum em biobancos, o que permite a realização de testes nesses materiais armazenados (17). A desvantagem da

incubação a temperatura ambiente, com o objetivo de aumentar a concentração de DNA, é o aumento do tempo de entrega do resultado. Entretanto, a partir do momento que a amostra atinge 25 ng de DNA, o teste pode ser realizado. O volume inicial de amostra e o volume de eluição podem ser ajustados para atingir essa concentração mais rapidamente. A quantidade de DNA no soro, duas horas após a flebotomia, varia de 1500 a 7500 cópias/mL ou 5 a 25 ng/mL (18) logo, a quantidade de DNA necessária pode ser alcançada rapidamente.

Observando os resultados obtidos da quantificação da variante JAK2 V617F em amostras de sangue total-EDTA e soro, a medida que a porcentagem de alelos mutantes aumenta, a diferença na quantificação da variante entre as duas matrizes também aumenta.

Dividindo a concentração de alelos mutantes em duas categorias, < 20% (n = 15) e > 20% (n = 20) de JAK2 F617, a diferença média dos resultados entre as duas matrizes para o grupo com menor concentração de alelos mutantes foi 1,737% (95% IC = 0,83% a 4,30%) e para o grupo com maior concentração de alelos mutantes foi 5,798% (95% IC = -7,26% a 18,86%). Dessa maneira, o grupo com mais de 20% de alelos mutantes contribui mais extensivamente para a diferença observada. A quantidade de DNA no soro é geralmente maior do que em outras matrizes biológicas, como o plasma, entretanto, a sua qualidade pode sofrer impacto devido a lise dos monócitos, principalmente (41).

Sendo assim, a hipótese desenhada para essa questão foi: as células mielóides, mas não as linfóides, podem apresentar lise preferencial durante o processo de coagulação e, durante a incubação *ex-vivo*, aumentar a proporção de alelos mutantes no soro.

Finalmente, o método de quantificação e a validação propostos nesse estudo podem ser aplicados na detecção de outras variantes somáticas relevantes. Por exemplo, a variante T790M *gatekeeper*, presente no gene *EGFR exon 20*, é o mecanismo de resistência mais comum aos inibidores tirosina quinase de primeira e segunda geração (erlotinib, gefitinib e afatinib).

Devido a disponibilidade de osimertinib, droga que supera o mecanismo de resistência da T790M, a detecção dessa variante somática no plasma é de extrema importância em pacientes que apresentam carcinoma de pulmão de não pequenas células (42,43). A partir do momento que 25 ng de DNA puder ser obtido das amostras de biópsia líquida, o teste pode ser realizado, ou quantidades menores de DNA podem

ser validadas. Adicionalmente, outra aplicação para a quantificação relativa em AS-qPCR utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ é como método ortogonal na validação de variantes somáticas encontradas a partir de sequenciamento massivo paralelo, como determinado pelos protocolos de validação do método (31), pois o método se mostrou altamente sensível, confiável, de fácil implementação, com a facilidade de que instrumentos de qPCR são amplamente disponíveis.

6 CONCLUSÕES

O método Cq comparativo, associado a PCR em tempo real alelo-específico, pode ser utilizado para a quantificação do alelo mutante JAK2 F617 em relação ao alelo selvagem (JAK2 V617). O método proposto é bastante exato (bias = 1,91%) comparado ao kit comercial (método referência), extremamente preciso (CV% total de 0,40%, 1,92% e 11,12% em amostras com 93%, 54% e 2,5% de JAK2 mutantes, respectivamente) e altamente sensível (LOD = 0,15%). Ele dispensa curva padrão e apresenta uma resposta linear de 1,16% a 99,98% de alelos mutantes. Quando aplicado em amostras de soro, a média de alelos mutantes encontrada foi aproximadamente 4% maior quando comparado aos resultados obtidos em amostras pareadas de sangue total-EDTA. Sendo assim, o soro torna-se uma matriz biológica alternativa que permite a detecção da variante somática JAK2 V617F com proporções aumentadas de alelos mutantes por AS-qPCR e quantificação relativa com o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, além de ser amigável para a maioria dos equipamentos automatizados de extração de DNA, o que favorece maior robustez nas análises.

REFERÊNCIAS

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, Blood. American Society of Hematology; 2016. p. 2391–405.
2. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Vol. 129, Blood. American Society of Hematology; 2017. p. 667–79.
3. Spivak JL. Myeloproliferative neoplasms. Vol. 376, New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society; 2017. p. 2168–81.
4. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European LeukemiaNet. Vol. 32, Leukemia; 2018. p. 1057–69.
5. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. Vol. 129, Blood. American Society of Hematology; 2017. p. 680–92.
6. Geyer H, Mesa RA. Approach to MPN Symptom Assessment. Vol. 12, Current Hematologic Malignancy Reports. Current Science Inc.; 2017. p. 381–8.
7. Baxter EJ, Scott PhD LM, Campbell FRACP PJ, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou MRCP GS, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Vol. 365, The lancet; 2005. p. 1054-61.

8. James C, Rie Ugo V, Le Coué Dic J-P, Staerk J, Ois Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Vol. 434, *Nature*; 2005. p. 1144-48.
9. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Vol. 7, *Cancer Cell*; 2005. p. 387–97.
10. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. Vol. 352, *N Engl J Med*; 2005. p. 1779-90.
11. Spivak JL. Narrative Review: Thrombocytosis, Polycythemia Vera, and JAK2 Mutations: The Phenotypic Mimicry of Chronic Myeloproliferation. Vol. 152, *Ann Intern Med*; 2010. p. 300-06.
12. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. Vol. 102, *Haematologica*; 2017. p. 7–17.
13. Schischlik F, Kralovics R. Mutations in myeloproliferative neoplasms—their significance and clinical use. Vol. 10, *Expert Review of Hematology*; 2017. p. 961–73.
14. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Vol. 22, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2008. p. 14–22.
15. Mahe E, Pedersen KM, Çolak Y, Bojesen SE, Lynch T, Sinclair G, et al. JAK2-tree: A simple CBC-based decision rule to guide appropriate JAK2 V617F mutation testing. Vol. 72, *J Clin Pathol*; 2019. p. 172–6.

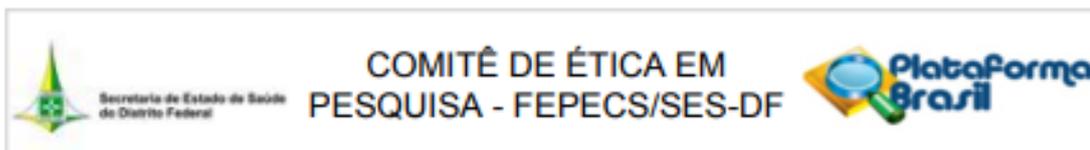
16. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. Vol. 160, *Br J Haematol*; 2013. p. 25–34.
17. Nystrand CF, Ghanima W, Waage A, Jonassen CM. JAK2 V617F mutation can be reliably detected in serum using droplet digital PCR. Vol. 40, *Int J Lab Hematol*; 2018. p. 181–6.
18. Et L. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. Vol. 41, *Transfusion*; 2001. p. 276-82.
19. Barra GB, Santa Rita TH, Jardim DP, Mesquita PG, Nobre CS, Jácomo RH, et al. Genotyping of single nucleotide polymorphisms using allele-specific qPCR producing amplicons of small sizes directly from crude serum isolated from capillary blood by a hand-powered paper centrifuge. Vol. 9, *Diagnostics*; 2019.
20. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Vol. 410, *Anal Bioanal Chem*; 2018. p. 2569–83.
21. Jeddi F, Piarroux R, Mary C. Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction: Optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. Vol. 20, *Parasite*; 2013.
22. Rapado I, Albizua E, Ayala R, Hernández JA, Garcia-Alonso L, Grande S, et al. Validity test study of JAK2 V617F and allele burden quantification in the diagnosis of myeloproliferative diseases. Vol. 87, *Ann Hematol*; 2008. p. 741–9.
23. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalshekerl N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Vol. 17, *Nucleic Acids Research*; 1989. p. 2503-16.
24. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, et al. Laboratory

- practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: A report of the association for molecular pathology. Vo. 15, J Mol Diagnostics; 2013. p. 733–44.
25. Kinz E, Leiherer A, Lang AH, Drexel H, Muendlein A. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR. Vo. 37, Int J Lab Hematol; 2015. p. 217–24.
 26. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Vol. 3, Nat Protoc; 2008. p. 1101–8.
 27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Vol. 25, Methods; 2001. p. 402–8.
 28. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Vol. 35, Cell; 1983. p. 849–57.
 29. Baer M, Nilsen TW, Costigan C, Altman S. Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. Vol. 18, Nucleic Acids Research; 1989. p. 97-103.
 30. Innings Å, Ullberg M, Johansson A, Rubin CJ, Noreus N, Isaksson M, et al. Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. Vo. 45, J Clin Microbiol; 2007. p. 874–80.
 31. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. Vol. 19, Journal of Molecular Diagnostics. Elsevier B.V.; 2017. p. 341–65.

32. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. Vol. 136, Br J Haematol; 2007. p. 745–51.
33. Tholen DW, Linnet K, Kondratovich M, Armbruster DA, Jones RL, Kroll MH, Lequin RM, Pankratz TJ, Scassellat GA, Schimmel H, Tsai J. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation ; Approved Guideline. Vol. 24, CLSI Document EP17-A; 2004. p. 1–52.
34. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, Krouwer JS, Meier K. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. Vol. 24, CLSI Document EP5-A2; 2004. p. 1-39.
35. Carey RN, Anderson FP, George H, Hartmann AE, Janzen VK, Wallner A, Levine JB, Schiffgens J, Tholen DW. CLSI. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline. Vol. 21, CLSI Document EP15-A2; 2006. p. 1-49.
36. Wilson JA, Jacobson JW, KAlman L, Krunic N, Matthijs G, Pratt, VM. Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays; Approved Guideline. Vol. 28; CLSI Document MM17-A; 2008. p. 1-73.
37. Caliendo AM, Fernandes H, Egan C, Mubarak HS, Espy MJ, et al. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. Vol. 28; CLSI Document MM06-A2; 2010. p. 1-62.
38. Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of Coefficient of Variation in Assessing Variability of Quantitative Assays. Vol. 9, Clin. Diagn. Lab. Immunol; 2002. p. 1235–9.
39. Barra GB, Santa Rita TH, Vasques J de A, Chianca CF, Nery LFA, Costa SSS. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex

- vivo degradation in blood samples. Vol. 48, Clin Biochem; 2015. p. 976–81.
40. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. Vol. 424, Clin Chim Acta; 2013. p. 222–30.
 41. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. Vol. 14, Mol Cancer Res; 2016. p. 898-908.
 42. Steendam CMJ, Atmodimedjo P, de Jonge E, Paats MS, van der Leest C, Oomen-de Hoop E, et al. Plasma Cell-Free DNA Testing of Patients With EGFR Mutant Non–Small-Cell Lung Cancer: Droplet Digital PCR Versus Next-Generation Sequencing Compared With Tissue-Based Results. Vol. 3, JCO Precis Oncol; 2019. p. 1–9.
 43. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-Positive lung cancer. Vol. 376, N Engl J Med; 2017. p. 629–40.

ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa da mutação JAK2 V617F no sangue total e soro

Pesquisador: Gustavo Barcelos Barra

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 49481315.4.0000.5553

Instituição Proponente: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.314.102

Apresentação do Projeto:

Sem alterações em relação ao Parecer número 1.258.253 de 05/10/2015.

Objetivo da Pesquisa:

Sem alterações em relação ao Parecer número 1.258.253 de 05/10/2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações em relação ao Parecer número 1.258.253 de 05/10/2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem alterações em relação ao Parecer número 1.258.253 de 05/10/2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem alterações em relação ao Parecer número 1.258.253 de 05/10/2015.

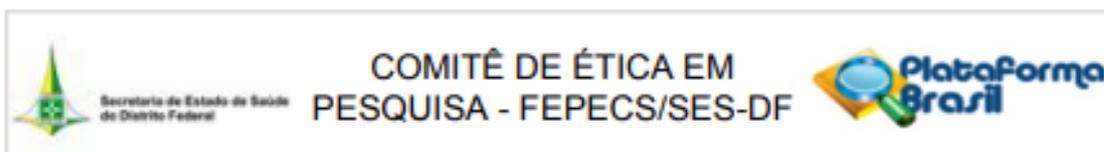
Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência resolvida.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.314.102

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_593998.pdf	08/10/2015 14:14:33		Aceito
Declaração do Patrocinador	Termo_de_concordancia_JAK_assinatura_Rafael.pdf	08/10/2015 14:13:56	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade_jak.pdf	18/09/2015 10:30:26	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_jak_assinada.pdf	18/09/2015 10:30:04	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_JAK_v0.pdf	18/09/2015 09:51:07	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_assistente.pdf	18/09/2015 09:50:02	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Pesquisador_principal.pdf	18/09/2015 09:49:31	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_JAK2_v1.docx	18/09/2015 09:48:48	Gustavo Barcelos Barra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 09 de Novembro de 2015

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO

Article

Serum Has Higher Proportion of Janus Kinase 2 V617F Mutation Compared to Paired EDTA-Whole Blood Sample: A Model for Somatic Mutation Quantification Using qPCR and the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ Method

Gustavo Barcelos Barra^{1,2,*†}, Ticiane Henriques Santa Rita^{1,†}, Ana Luisa Santa Cruz Almeida^{1,2,†}, Rafael Henriques Jácomo¹ and Lídia Freire Abdalla Nery¹

¹ Sabin Medicina Diagnóstica, SAAN, quadra 3, lote 145/185, Brasília 70632-300, Brazil; ticihenriques@gmail.com (T.H.S.R.); santacruz.analuisa@gmail.com (A.L.S.C.A.); rhjacom@gmail.com (R.H.J.); lidia@sabin.com.br (L.F.A.N.).

² Post-Graduation in Health Science, University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil.

* Correspondence: gbbarra@gmail.com.

† These authors contributed equally to the study.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Detection of the Janus Kinase-2 (JAK2) V617F mutation is a diagnostic criterion for myeloproliferative neoplasms, and high levels of mutant alleles are associated with worse outcomes. This mutation is usually tested on blood DNA by allele-specific qPCR (AS-qPCR) and measured using absolute quantification. However, some automated DNA extractions co-extracts of PCR inhibitors from blood and qPCR absolute quantification need increased efforts in order to maintain standard curves. JAK2 V617F can also be detected in serum using droplet digital PCR (ddPCR), a specimen with less inhibitors and favorable to automated extractions, but ddPCR instruments are not wide available as qPCR thermocyclers. Here, we evaluate whether JAK2 V617F could be accurately quantified by AS-qPCR using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method on blood DNA and validate the assay using gold-standard molecular diagnostic protocols. Next, we apply the validated method to assess if the mutation could be reliably detected/quantified in serum. JAK2 V617F could be quantified by AS-qPCR using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method – the assay was highly accurate (bias of 1.91%) compared to a commercial kit, highly precise (total CV% of 0.40%, 1.92%, 11.12% for samples with 93%, 54%, and 2.5% of mutant allele), highly sensitive (limit of detection of 0.15%), and demonstrated a linear detection response from 1.1% to 99.9%. Serum presented a higher mutant allele burden compared to the paired whole blood (mean of 4%), which allows for an increased JAK2 mutant detection rate and favors increased JAK2 V617F high-throughput analysis.

Keywords: JAK2V617F; $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method; Allele-specific qPCR; Relative quantification; Myeloproliferative neoplasms

1. Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) comprise of polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF), as well as chronic eosinophilic leukemia, and not otherwise specified and unclassifiable MPN [1]. This group of disorders is characterized by the constitutive activation of signal-transduction pathways responsible for hematopoiesis, which derives from a single somatically mutated hematopoietic stem cell. Phenotypically, they are described by

hyperplasia of differentiated myeloid cells of one or more myeloid lineages and, consequently, have similar clinical features [2,3].

In 2005, four different groups identified a somatic point mutation in pseudokinase domain of Janus kinase-2 (JAK2) gene (JAK homology-2, JH2), which would then initiate the understanding of the molecular pathogenesis of those disorders. The mutation occurred in the autoregulatory JH2 tyrosine kinase domain located upstream of JH1 tyrosine kinase domain, leading to the loss of its inhibitory effect and, consequently, constitutive activation of JAK2 and downstream signaling molecules [4–7]. It is a G to T transversion at nucleotide 1849 in exon 14 of JAK2 gene located on chromosome 9p24, which leads to a valine (V) to phenylalanine (F) substitution at codon 617. JAK2 V617F mutation was present in over 95% of patients with PV and in approximately half of patients with ET and PMF [8]; and moreover, in 2008, the World Health Organization included its detection as diagnostic criteria for MPN [9]. The clinical significance of JAK2 V617F quantification relied on the fact that high levels of mutant alleles are associated with increased risk of cardiovascular events, thrombosis and, in PV, to myelofibrotic transformation [10].

The specimen usually chosen to test for JAK2 V617F is peripheral blood using EDTA as an anticoagulant, because of its high abundance of DNA derived from cells of myeloid origin and sampling convenience when compared to bone marrow [11]. In 2018, Nystrand C. F. and colleagues described that the JAK2 V617F mutation could be reliably detected in serum using ddPCR. The authors also found a higher mutant allele burden in serum compared to paired peripheral blood samples, which may allow for increased mutant detection rates for serum. Reliable results were observed when more than 5 ng of serum DNA input was used in the ddPCR [12].

As leukocyte genomic DNA is released into serum during the coagulation [13], and blood clots continuously liberate genomic DNA molecules to this specimen overtime [14], both processes can deliberately be used to increase genomic DNA concentration in serum, which would guarantee the minimal amount of DNA ensuring reliable results. Additionally, some automated DNA extractions designed for serum/plasma co-extracts of PCR inhibitors when whole blood is used (e.g, Nuclisens Easymag System, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) and additional purification steps are required to achieve amplifiable DNA [15]. These additional steps diminish the high-throughput of JAK2 V617F analysis in a clinical laboratory setting. Thus, serum is an advantageous alternative biological material compared to whole blood for JAK2 V617F detection/quantification.

However, ddPCR instruments are not widely available for clinical and research laboratories as qPCR instruments, especially in developing countries. As such, in order to be more clinical useful, helping a great number of patients, the method should be migrated to qPCR. Today, AS-qPCR is the most widely performed method for JAK2 V617F detection/quantification due to its high analytical sensitivity (less than 1% of mutant alleles burden) [11]. The assay is mainly performed using two independent reactions, one specific for JAK2 V617 and other specific for JAK2 F617, and absolute quantification, which requires standard curves with known concentrations of the wild type and mutant JAK2 V617F alleles [16,17]. The main disadvantage of qPCR absolute quantification is the increased effort to generate and maintain standard curves [18].

Relative quantification is another method of analyzing qPCR data where the target of interest amount is presented relative to an internal calibrator or reference gene. A widely used method to calculate relative quantification is the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method, also referred as comparative C_q method, which is mostly used for gene expression analysis. The method returns the fold-change of the qPCR target of interest relative to reference target in two different samples (Sample A versus Sample B), so standard curves are unnecessary [18].

The $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method has some premises: a) The amplification efficiency of the target of interest and reference target must be similar and close to 1 and b) the reference target abundance should be stable in sample A and B [18]. Thus, applying the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method to determine the JAK2 V617F mutant allele burden or quantifying any other somatic mutation is advantageous because it is easy to use and returns quantitative data (fold change), also working as a good orthogonal method for quantitative next-generation sequencing results validation (as required by current NGS validation protocols [19]). Today,

a clear description of the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method application for JAK2 V617F mutation quantification (and other somatic mutation) is absent in the literature, especially if considering the inclusion of the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ premises validation and the determination of the assay diagnostic parameters as: Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, precision and trueness.

Thus, the aims of this study were to evaluate whether JAK2 V617F mutant allele quantification could be accurately retrieved by AS-qPCR using the comparative Cq method on DNA extracted from whole blood, and to validate the assay using gold-standard molecular diagnostic protocols to find its diagnostic performance. Then, we applied the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method to assess if the mutation could be reliably detected and quantified in serum by AS-qPCR.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

The FEPECS/SES-DF research ethical committee approved this study (registry CAAE 49481315.4.0000.5553, approval date: 09 November 2015) and written informed consent was obtained from each participant.

2.2. Volunteers and recruitment

The study enrolled 27 healthy individuals with no clinical history of hematological disorders and 114 volunteers with a known status of a JAK2 V617F mutation (45 positives and 69 negatives). The patients with a known status of a JAK2 V617F mutation were obtained from our clinical laboratory service, which performed the assay according to Larsen, T.S., et. al. [20]. All patients who were referred to the laboratory for a JAK2 V617F test were invited to the study at the beginning of recruitment. Those patients who consented were invited to return for an extra collection of paired samples of serum and EDTA-whole blood. After the negative samples reached a reasonable number only the positive ones were contacted, especially those who presented some specific mutant allele burden.

2.3. Sample Collection and Storage

Two tubes were drawn from venous blood of each participant, one Vacuette EDTA K2 whole blood 4mL tube and one Vacuette Z Serum Clot Activator 4 mL tube (Greiner-bio-one, Kremsmunter, Austria). Serum and whole blood tubes were transported to the processing unit refrigerated. This transportation could take 4–24 h. Upon arrival, serum was incubated for 48–60 h at room temperature to increase its DNA amount and then separated from the blood clot ($2200\times g$ for 10 min). Separated serum was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further processing. Whole blood was also stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ upon arrival at the processing unit.

2.4. DNA Extraction

DNA extraction from whole blood (200 μL) and serum samples (500 μL) was performed using Nuclisens Easymag System (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) according to generic protocol 2.0.1 with the addition of 140 μL of magnetic silica particle suspension diluted in 600 μL of lysis buffer and eluted in 55 μL . Blood was premixed with lysis buffer (2 mL) and diluted silica (740 μL) off-board in a 15 mL tube to avoid inhibitor co-extraction; this step was not necessary for serum. Some DNA samples were also extracted using MagNA Pure 96 Instrument (Roche Diagnostics Ltd., Pleasanton, CA, USA) with the MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit for whole blood and MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit for serum, both eluted in 50 μL and processed according to manufacturer's protocol. All extracted DNA samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further processing.

2.5. DNA Quantification

DNA was quantified by qPCR absolute quantification using 65 base pairs RNase P gene sequence as target. Primers and probes were previously described [14]. The qPCR reaction consisted in 7.5 μL of

Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 1.5 μL 10× RNase P Prime Time Assay (Integrated DNA technologies, Coralville, IA, USA), 5 μL of DNA, 1 μL of PCR grade water, and the following thermocycling conditions: Denaturation for 10 min at 95 °C; followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 15 s at 60 °C. The instrument used was StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Two points standard curves (10⁶ and 10³ copies/reaction) were set up using ssDNA corresponding to the RNase P gene target sequence (AGATTTGGAC CTGCGAGCGGGTTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCGGACTTGTGGAGACAGCCGCTC) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). The equation describing the RNase P calibration curve was $Y = -3.26X + 29.75$ (efficiency = 102.4% and $R^2 = 0.998$). The DNA amount was calculated by the following formula: Number of RNase P ssDNA copies returned from the qPCR plus the weight of human haploid genome in nanograms (0.0033 ng) divided by 2 to correct for dsDNA, plus the reaction DNA input volume (5μL). The quantification by qPCR was used to reliably quantify short fragments DNA in serum. All DNA samples were normalized to 2.5 ng/μL and 10 μL was used in each AS-qPCR.

2.6. Quantification of JAK2 V617F Somatic Mutation using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ Method

JAK2 V617F wild type and mutant alleles were amplified by two independent AS-qPCR multiplex reactions, one specific for the wild type allele, and the other specific for the mutant allele. The RNase P gene was co-amplified in each reaction to control if the inputted DNA was suitable for PCR and as reference target for the comparative Cq method, if desirable. JAK2 V617F wild type and mutant primers were described by Larsen, T.S., et.al [20]: Common primer: 5'-CTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA-3', JAK2 V617F wild type primer 5'-GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACA_tAC-3', JAK2 V617F mutant primer 5'- GTAGTTTTACTTACTCTTGTCTCCACA_tAA-3' and probe 6FAM-TGAGCAAGC/ZEN/TTTCTCACAAGCATTGGTTT-3IABkFQ (all purchased from Integrated DNA technologies, Coralville, IA, USA, as PrimeTime assays). Lower case letters indicate the deliberate mismatch introduced to enhance allele discrimination. JAK2 V617F amplicon size is 100 base pairs. The RNase P gene primers were the same as described above (DNA quantification section). All AS-qPCR reactions were performed in StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and consisted of 15 μL of Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 3 μL of 10× JAK-2 Prime Time Assay and 1.5 μL 10× RNase P Prime Time Assay and 10 μL of DNA normalized to 2.5 ng/ μL in the following thermocycling conditions: Denaturation for 10 min at 95 °C; followed by 45 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. Non-template control (NTC), positive, and negative controls were performed in each reaction. Threshold was always set to 0.1 DeltaRn in all qPCR experiments.

JAK2 V617 reaction was considered sample A and JAK2 F617 reaction was considered the sample B in the legacy $2^{-\Delta\Delta Cq}$ equation. The percentage of JAK2 V617F mutant allele was calculated using the equation: $JAK2 \text{ mut } \% = 100\% \div ((2^{-Cq \text{ JAK2 wt}} - Cq \text{ Jak2 mut}) + 1)$, or $JAK2 \text{ mut } \% = 100\% \div ((2^{-Cq \text{ JAK2 wt} - Cq \text{ RNaseP wt}} - Cq \text{ Jak2 mut} - Cq \text{ RNaseP mut}) + 1)$, if one would like to include RNase P in the calculus to control for the small variation in DNA quantity between wild type and mutant reactions (arose from pipetting two independent reactions). Derivation of these formulas can be found in the Supplementary Material. To demonstrate that both formulas reach very similar results DNA with 97.6%, 74.8%, 67.3%, 52.5%, 40.4%, 34.9%, 21.9%, 10.4%, and 4.8% of JAK2 mutant allele were quantified using both formulas.

2.7. Establishment of Cq cut-off Value

Twenty-seven healthy volunteers with no clinical history of hematological disorders were tested using the proposed method and the unspecific amplification of JAK2 V617F wild-type allele by the JAK2 V617F mutant primer was inspected, because it was observed in the seminal publication of these primers [20], and if present, the percentage of allele mutant was calculated using equation 4 described in the supplemental material..

2.8. Amplification Efficiency

JAK2 V617F wild type and mutant alleles amplification efficiencies were investigated by testing 10-fold or 2-fold serially dilution (4–5 dilution points) of some positive samples for JAK2 mutant allele encompassing a range of proportion considered low, medium and high in the clinical setting (from 6% to 96%) followed by the evaluation of the standard curve parameters, especially its slope, from which the amplification efficiency was derived. Slopes were compared using linear regression tools available in Graphpad Prism software version 6.0 (Graphpad, Inc., San Diego, CA, USA).

2.9. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

LOD was determined applying the probit regression analysis (Minitab Version 19.2.0.0.) to the results returned by the proposed method when applied to constructed DNA samples representing a 2-fold decreasing serial dilution of the JAK2 V617F mutant allele starting at 1.16% (1.16%, 0.58%, 0.29%, 0.145%, 0.073%, 0.036%, 0.018%, and 0.009% of mutant alleles). Protocol inspired from CLSI EP17-A2 [21], however, using artificial DNA that could have a different amplification behavior in the PCR. Each concentration point was constructed by spiking the appropriated amount of Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen, Hilden, Germany) positive control (100% mutant of alleles) into the negative DNA sample (100% of wild type alleles). Each concentration was tested nine times. The assay limit of quantification (LOQ) was also retrieved from this experiment by comparing the observed versus the expected amount (mean and SD) of mutant alleles using one-sample *t* test [Graphpad Prism software version 6.0 (Graphpad, Inc)].

2.10. Precision

Three selected DNA samples with 93%, 54%, and 2.5% of mutant allele burden were submitted to the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method in duplicate for 9 consecutive working days ($n = 18$, for each concentration), and the mean, total, and between-day and within-run coefficients of variation were calculated. Protocol adapted from CLSI EP05-A2 [22].

2.11. Trueness

The proposed comparative Cq method for JAK2 V617F quantitative results were compared to the results observed by the commercial kit Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen, Hilden, Germany) kit using StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), executed according to manufacturer's protocol. This kit used AS-qPCR and absolute quantification for JAK-2 mutant allele quantification. Total, positive, and negative agreement (qualitative analysis) were calculated as percentage of concordant result using 2×2 table. Pearson correlation, linear regression, and Bland–Altman analysis were used to calculate the correlation coefficient (r), the coefficient of determination (R^2), and the agreement (bias) between both methods, respectively. Protocol adapted from CLSI EP15-A2 [23]. Calculations were performed using Graphpad Prism Software v6.0 (Graphpad, Inc) and the commercial kit was considered the reference method. The assay linearity was retrieved from this experiment (from linear regression results).

2.12. JAK-2 V617F Mutation Quantification in Paired EDTA-Whole Blood and Serum Using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ Method

Ninety-five paired samples of EDTA-whole blood and serum with known status for JAK-2 V617F mutation were submitted to the proposed method. EDTA-whole blood and serum sample volumes and DNA extraction details were described above in the DNA extraction section. The same analyses described in the session trueness were performed with the data obtained in this experiment: Total, positive and negative agreement, Pearson correlation, linear regression, and Bland–Altman analysis.

3. Results

3.1. Validation of the JAK2 V617F Mutant Allele Relative Quantification Using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ Method

First, we determined if the proposed assay would return positive results for negative samples. Twenty-seven blood samples from healthy volunteers with no clinical history of hematological disorders were tested, 26 of them did not show any positive signal after 45 PCR cycles, except one sample that presented a Cq of 42. This Cq value corresponded to 0.0015% of JAK2 mutant alleles when the proposed comparative Cq method was applied. A Cq cut-off value of > 42 was arbitrarily established, meaning that samples Cq higher than 42 were considered unspecific amplification and discarded. We conclude that the consistent unspecific amplification of JAK2 V617F wild-type allele by the JAK2 V617F mutant primer described in their seminal publication is not prevalent for the proposed method. Representative amplification plots and calculations can be found in Figure 1.

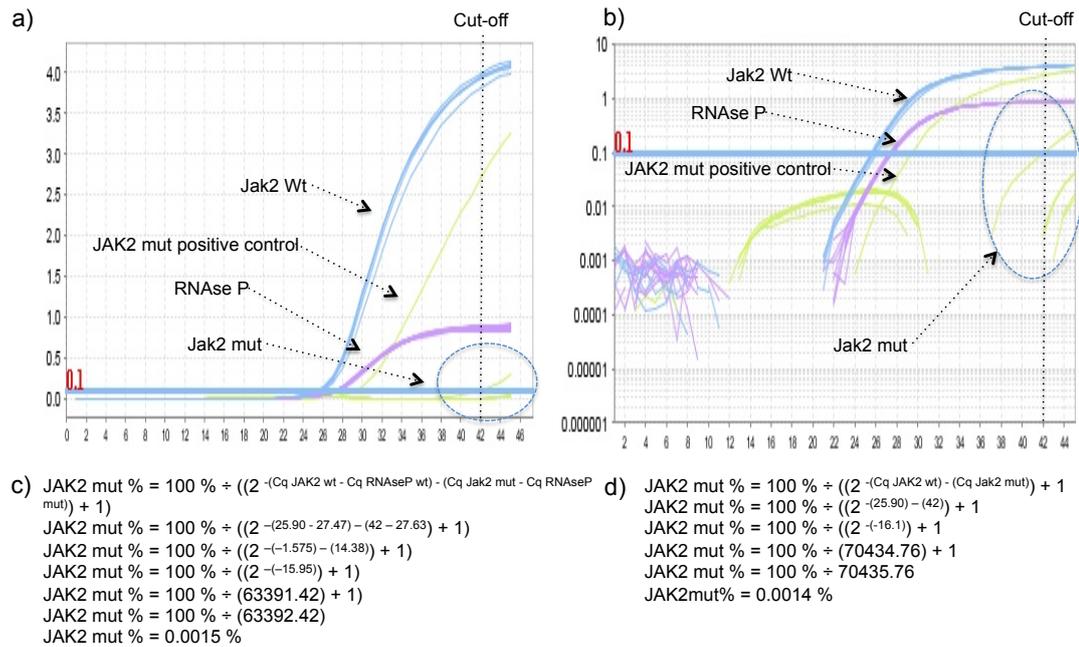


Figure 1. Depiction of Janus Kinase-2 (JAK2) wild type allele (blue), JAK2 mutant allele (yellow), and RNase P (magenta) amplification curves in JAK2 V617F negative samples ($n = 27$) to illustrate the lack of amplification in most negative samples and the arbitrary established Cq cut-off value because one negative sample presented a Cq of 42: (a) Delta Rn in linear scale, (b) delta Rn in log scale. Examples of how raw data resulted in a particular mutant allele percentage: (c) Excepting RNase P Cq, (d) including RNase P in the calculation.

Next, we investigated the JAK2 V617F wild type and mutant alleles amplification efficiencies applying a 1:10 or 1:2 serial dilution of DNA samples with distinct proportions of JAK2 mutant allele to the proposed method. The relative concentration of 1 was arbitrarily attributed to the first dilution point. The results can be found in Figure 2, which depicts standard curves and the associated linear regression of samples with distinct proportions of JAK2 mutant alleles, and in Table 1, which describes the corresponding AS-qPCR amplification efficiencies for wild type and mutant alleles. Wild type and mutant alleles AS-qPCR amplification efficiencies ranged from 100.5% to 109.7% and 97.9% to 111.7%, respectively. The intra-sample and inter-sample amplification efficiencies were not different in all instances (p -values on Table 1), satisfying the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ premises, so the method can be applied to the relative quantification of JAK2 V617F somatic mutation.

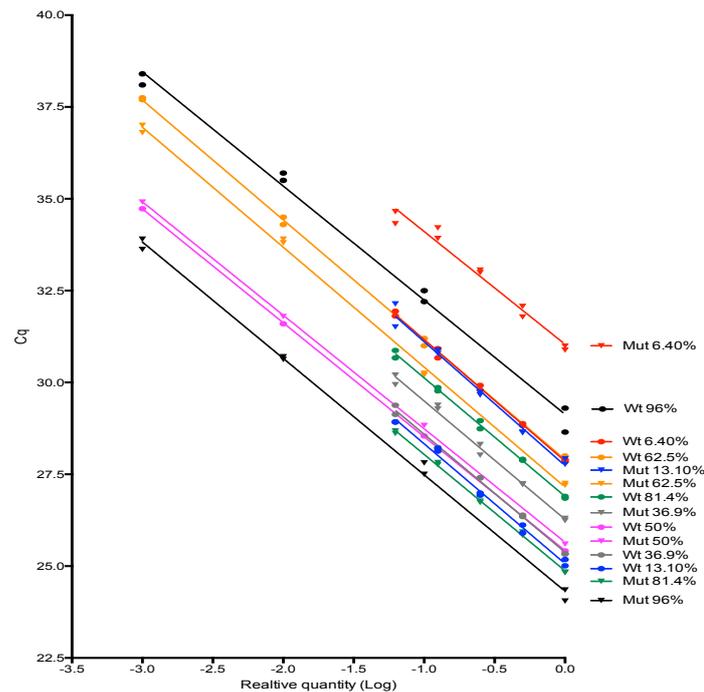


Figure 2. Linear regression depiction of JAK2 wild type allele (circles) and mutant allele (triangles) amplification when the proposed method was applied to 1:10 or 1:2 serial dilutions of DNA samples with distinct proportions of JAK2 mutant allele. We observed that both wt and mut standard curves were parallel (similar slopes) in all instances, satisfying the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ premises. Each point represents a technical replicate.

Table 1. AS-qPCR amplification efficiencies of serial dilutions of DNA samples with distinct proportions of JAK2 mutant alleles.

Mutant Allele % (Dilution)	wt effl(%)	Mut Eff (%)	<i>p</i> value
96% (1:10)	109.7	106.8	0.61
81.4% (1:2)	104.1	106.9	0.45
62.5% (1:2)	102.4	102.4	0.95
50% (1:10)	109.5	110.02=	0.71
36.9% (1:2)	104.9	104.3	0.91
13.1% (1:2)	102.5	97.9	0.51
6.4% (1:2)	100.5	111.7	0.22

¹Eff—Amplification efficiencies, slopes of all linear regressions were not different ($p = 0.18$).

After that, we proved that both formulas $JAK2 \text{ mut } \% = 100\% \div ((2^{-Cq_{JAK2 \text{ wt}}} - Cq_{JAK2 \text{ mut}}) + 1)$, or $JAK2 \text{ mut } \% = 100\% \div ((2^{-Cq_{JAK2 \text{ wt}} - Cq_{RNaseP \text{ wt}}} - Cq_{JAK2 \text{ mut}} - Cq_{RNaseP \text{ mut}}) + 1)$ resulted in very similar outcomes. By submitting the Ct values of samples with 97.5%, 74.8%, 67.3%, 52.5%, 40.41%, 34.9%, 21.9%, 10.4%, and 4.8% of JAK2 mutant allele to both formulas, a Pearson correlation with $r = 1$, linear regression with $R^2 = 0.999$ and Bland–Altman analysis with a bias of -0.61% (95% CI -2.5% to 1.3%) was observed, meaning a high agreement between them.

Then, we determined the assay LOD, applying the proposed method to a 1:2 serial dilution of the Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen) positive control (100% mutant sample) spiked into the negative DNA sample. Applying the probit regression analysis to the results, a LOD of 0.15% (95%IC 0.12–0.21%) was returned, demonstrating that the assay has an excellent analytical sensitivity (Table 2 and Figure 3).

Table 2. Assay limit of detection (LOD) raw data and probability of detection (graphical results can be found in Figure 3).

Mutant Allele %	Tested (n)	Detected (n)	Detection (%)	Probability of Detection
1.160	9	9	100	1.000
0.580	9	9	100	1.000
0.290	9	9	100	1.000
0.145	9	8	88	0.939
0.073	9	4	44	0.280
0.036	9	0	0	0.047
0.018	9	0	0	0.013
0.009	9	0	0	0.006

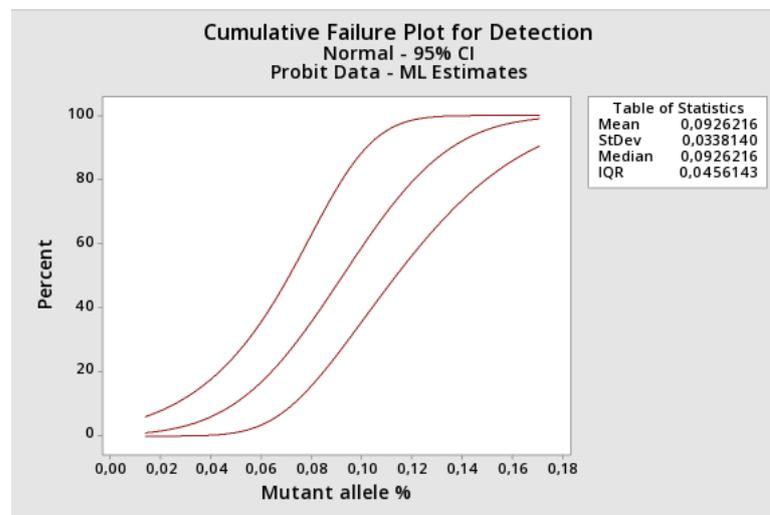


Figure 3. Probit regression analysis depicting the percentage of detection versus the JAK2 mutant allele (%). The LOD point is equal to the concentration at which 95% of the experiments gives a clearly positive signal.

The limit of quantification could also be retrieved from this experiment by comparing the observed versus the expected result for each data point. Samples with 1.16%, 0.58%, 0.29%, 0.15% of mutant alleles (detected in at least eight of nine instances) returned the values of $1.03 \pm 0.25\%$ ($p = 0.17$), $0.19 \pm 0.06\%$ ($p < 0.0001$), $0.048 \pm 0.037\%$ ($p < 0.0001$), $0.0098\% \pm 0.0053$ ($p < 0.0001$), indicating that the assay lost its linearity after 1.16%, so this value was considered the LOQ.

Next, samples with high (93%), medium (54%) and low (2.5%) JAK2 V617F mutant allele burden were tested in duplicate during nine consecutive working days. The observed mean, total CV%, between-day CV%, and within-run CV% indicated that the assay is highly precise along a wide detection range (variation lower than 12%) (Table 3).

Table 3. Assay precision evaluation.

Mutant Allele (%)	Mean (%)	Total CV (%)	Between-Day CV (%)	Within-Run CV (%)
93	93.5	0.40	0.2	0.3
54	54.1	1.9	1.1	1.5
2.5	2.76	11.1	9.2	6.2

Finally, we evaluated the assay trueness by comparing the proposed method versus the Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen) kit head to head. The latter was considered the reference method. The test was performed using two reactions, one specific for the wild type and other for the mutant allele. However, the quantification was based on qPCR absolute quantification through standard curve. Twenty-three positive samples with JAK-2 V617F mutant alleles proportions ranging from 1.5% to

99.9% of mutant alleles and 19 negatives were submitted to both assays. We observed that the total, positive, and negative agreements were 100% between the two methods qualitatively (23 positives and 19 negatives results). Additionally, both methods presented similar quantitative results: Pearson correlation with $r = 0.998$ ($p < 0.0001$), linear regression with $R^2 = 0.996$, and Bland–Altman analysis with a bias of 1.9% (95% CI -1.9% to 5.6%) (Figure 4, a and b). These results indicate that the absolute quantification and the relative quantification of the JAK2 V617F were highly correlated and agree to each other very well (mean difference of 1.9%). The proposed method linearity could also be retrieved from this assay, as it returned a linear response from all tested range of mutant alleles (from 1.1% to 99.9%).

All the above-described experiments were executed on DNA extracted from whole blood.

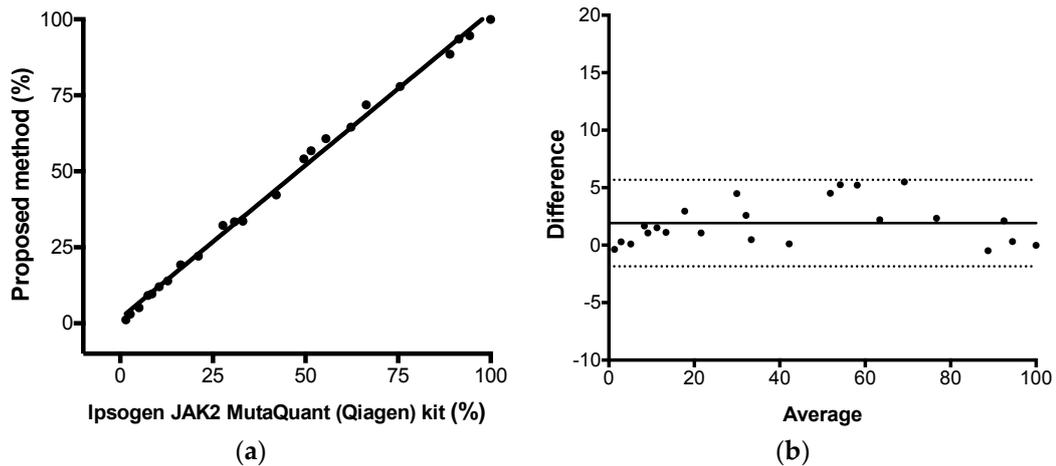


Figure 4. Proposed method trueness evaluation ($2^{-\Delta\Delta C_q}$ method versus Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen) kit. (a) Linear regression ($R^2 = 0.996$). (b) Bland–Altman analysis (bias of 1.91% (solid line) with 95% CI -1.87% to 5.6% (dashed lines)). Twenty-three selected positive samples encompassing the percentages range that could be observed in a clinical setting were tested (from 1.16% to 99.98%).

3.2. Quantification of the JAK2 Using $2^{-\Delta\Delta C_q}$ in Paired Serum and EDTA-Whole Blood Samples

After the assay validation, we evaluated if the JAK2 V617F mutation could be quantified in serum by AS-qPCR using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method. EDTA-whole blood was the comparator and considered the reference specimen. Ninety-five selected samples with known JAK2 mutant allele burden were enrolled in this analysis. For DNA extraction, whole blood sample input was 200 μL and serum sample input was 500 μL . All DNA were normalized for 25 ng/reaction. The $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method returned 35 positive results and 60 negative results for both specimens, so the qualitative total, positive, and negative agreement between serum and EDTA-whole blood were 100%. Pearson correlation, linear regression, and Bland–Altman analysis returned r of 0.982 ($p < 0.0001$), R^2 of 0.965, and a mean difference (bias) of 4.0% (95% CI = -6.6% to 14.7%) (Figure 5, a and b). Observing the data, it seems that the difference between serum and blood was higher in the samples with high percentages of mutant allele burden. As such, we performed subgroup analyses by dividing them into samples with less than 20% and more than 20% JAK2 mutant alleles in serum. Pearson correlation, linear regression, and Bland–Altman analysis returned r of 0.966 ($p < 0.0001$), R^2 of 0.934, and a mean difference (bias) of 1.737% (95% CI = -0.83% to 4.30%) for the subgroup with less than 20% ($n = 15$) and r of 0.960 ($p < 0.0001$), R^2 of 0.921, and a mean difference (bias) of 5.7% (95% CI = -7.2% to 18.8%) for the subgroup with higher than 20% of JAK2 mutant alleles ($n = 20$), demonstrating that samples with higher percentages of JAK2 mutant alleles contribute more extensively to the difference in the JAK2 mutant allele difference observed between the two specimens.

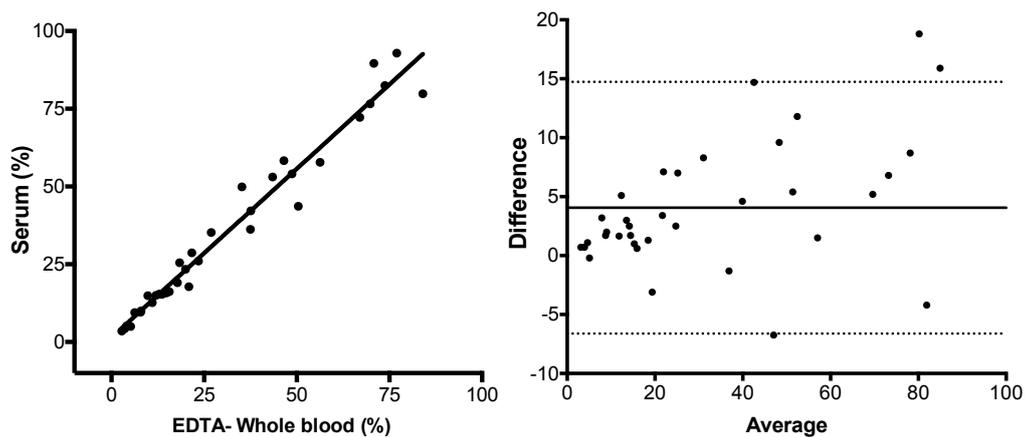


Figure 5. Comparison of JAK2 V617V mutant quantities in paired serum and EDTA-whole blood using $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method. (a) Linear regression (R^2 of 0.965). (b) Bland–Altman analysis (Bias of 4.058% (solid line) with 95% CI -6.6% to 14.7% (dashed lines)). Thirty-five positive samples with known results were included in this analysis.

4. Discussion

In this study, we evaluated whether JAK2 V617F mutant allele quantification could be accurately performed by AS-qPCR using the comparative Cq method and defined the assay diagnostic performance using gold-standard molecular diagnostic validation protocols. Then, we tested if the method could reliably detect and quantify the mutation in serum.

First, we investigated whether the JAK2 V617F AS-qPCR generates a positive signal on the incorrect template (e.g., wild-type allele amplification by the mutant primer). The late amplification of the “wrong allele” by an allele specific primer is common in AS-qPCR [14], and it was observed in the seminal publication of these primers [20]. This outcome was generated because the mismatches that provide the allele discrimination do not impair, but delay the primer extension, allowing the genotyping [14]. In our hands, the delayed amplification of the wild-type allele by the mutant primer was rare, meaning that presence/absence of the target did not depend on a cut-off value, but on the presence or absence of amplification, which facilitates the achievement of a conclusion. However, because of that single false positive, a Cq cut-off value of 42 was established, and any Cq value higher than 42 was considered negative. The absence of the delayed amplification of the wild-type allele by the mutant primer could be secondary to the multiplex format of the assay, as RNase P was co-amplified with JAK2 in all reaction tubes with Cq lower 30, which could somehow (e.g., production of pyrophosphate, FAM/HEX fluorescence crosstalk) further delay the unspecific amplifications, hence, it was not observed during the 45 cycles of the reaction, except in one sample.

Next, we investigate if the JAK2 V617F wild type and mutant allele have similar amplification efficiencies for the comparative Cq method to be applied. To our knowledge, this was the first time that the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method and AS-PCR were congregated to accurately retrieve the proportion of variant alleles in a sample. The JAK2 V617 reaction was considered as sample A and the JAK2 F617 reaction was considered as sample B in the legacy $2^{-\Delta\Delta Cq}$ equation. The unique difference between both reactions was the 3'-end nucleotide, hence, it was highly probable that both alleles showed similar amplification efficiencies. After testing several samples with distinct JAK2 mutant allele proportion, we empirically proved that JAK2 wild type and mutant primers had similar efficiencies, so the comparative Cq method premises was attended. Additionally, we demonstrated the relationship between the percentage of a somatic mutation and the Cq values of wild type and mutant alleles amplification by deriving the formula used in this study. The major advantage of this method was that it did not require standard curves. As DNA input of wild type and mutant AS-qPCR come from the same extraction tube, their Cq were the same or similar, and did not account for the JAK2 V617F mutant percentage. However, RNase P Cq could control pipetting errors, so we considered it in all experiments of this study.

After that, we applied some gold-standard molecular diagnostic validation protocols to the assay to find its diagnostic performance. Parameters like trueness, total, between-days and within-run precisions, limit of detection, limit of quantification, and linearity were determined. The proposed assay demonstrated itself to be highly accurate compared to a commercial kit based on absolute quantification, highly precise along its linear range and highly sensitive, being capable to detect as little as 0.15% of mutant alleles in a sample. Correct quantitative results were found from 1.1%, result between 0.15% and 1.1% should be reported as detected, because the assay lost its linearity in this range. Taken together, the results showed that JAK2 V617F somatic mutations could be accurately quantified by AS-qPCR using the comparative Cq method.

Next, we evaluated if JAK2 V617F could be detected and reliably quantified in serum, as well as in whole blood, by AS-qPCR. Genomic DNA yield increases in serum incubated at room temperature, if the specimen remained in contact with the clot [14]. This strategy was used to ensure that serum always yielded the DNA amount necessary to the reaction (25 ng). However, serum DNA is highly fragmented, because blood DNAses are active in this specimen [24] and it's probably of apoptotic origin [14]. As such, PCR products with small amplicon sizes amplify better than larger ones when applied to the DNA extracted from this specimen [14]. JAK2 V617F product used in this study had 100 base pairs, so amplicon size was not a concern in the detection/quantification of JAK2 alleles from serum DNA. Our results showed that not only could the JAK2 V617F mutation could be detected in serum by qPCR, but this specimen also presented a mean bias of 4.058% when compared to the paired peripheral blood sample. These results corroborate with the previous description using ddPCR [12], suggesting that the use of serum DNA may allow for increased mutant detection rates. Other serum advantages are: 1) It has less inhibitors than whole blood; 2) it can be directly used in qPCR [14]; and 3) it is more friendly most automated DNA extractions and additional purifications steps are not required to achieve amplifiable DNA [15], allowing increased high-throughput analysis. The downside of the incubation at room temperature to enrich genomic DNA in serum is the increase of the assay turn-around time. However, as soon as the sample could yield 25 ng of DNA, the assay can be performed. Sample input volume and DNA extraction elution volume can be adjusted to achieve this concentration, as soon as possible. Indeed, serum DNA amounts within 2h after phlebotomy ranges from 1500 to 7500 copies/mL or 5 to 25 ng/mL [13], so the necessary DNA yield can be achieved quickly. In this study, the incubation at room temperature was 48–60 h, after the sample arrival to the processing unit. Observing the data, it seemed that as allele burden increases, the difference becomes higher. Dividing allele burden into two categories, < 20% ($n = 15$) and > 20% ($n = 20$), there is a mean difference (bias) of 1.7% for the subgroup with less than 20% and 5.7% for the subgroup with higher than 20% of JAK2 mutant alleles. As such, samples with >20% contribute more extensively for the observed difference between serum and whole blood. Our hypothesis for the increased JAK2 V617F mutant allele burden in serum compared to the paired peripheral blood is that myeloid cells but not lymphoid cells, somehow, are preferentially disrupted during coagulation and during the ex-vivo incubation at room temperature, increasing the mutant allele proportion in this specimen.

Finally, the method and validation proposed in this study can be applied for other clinically relevant somatic mutations detected in the plasma of cancer patients, such as the gatekeeper mutation T790M in EGFR exon 20, the most common resistance mechanism to first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors (erlotinib, gefitinib, and afatinib). Because of the availability of osimertinib, a drug that overcomes the T790M resistance mechanism, the detection of this gatekeeper mutation in plasma is of high importance in non-small-cell lung cancer [25,26]. Once 25 ng of DNA can be retrieved from the liquid biopsy samples, the assay can be performed, or smaller DNA inputs can be validated. Additionally, one application of the proposed AS-qPCR relative quantification using $2^{-\Delta\Delta Cq}$ is used as an orthogonal method for the validation of the NGS test for somatic mutations, as requested by current validations protocols [19], because the method demonstrates high sensitivity, reliability, is easy to implement, and the qPCR instruments are widely available.

5. Conclusions

Comparative Cq derived from allele-specific qPCR can be used for JAK2 V617F mutant allele quantification relative to wild type alleles. The assay is highly accurate (bias of 1.91%) compared to a commercial kit, highly precise (total CV% of 0.40%, 1.92%, 11.1% for samples with 93%, 54%, and 2.5% of JAK2 mutant allele), and highly sensitive (LOD of 0.16%). The assay does not require standard curves and demonstrated a linear detection response ranging from 1.1% to 99.9%. When applied to serum, a higher mean allele burden of 4% compared to the paired whole blood was observed. Serum became an alternative specimen that could allow increased JAK2 mutant detection rates by qPCR and is friendly with the majority of most automated DNA extractions, favoring increased high-throughput analysis.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1.

Author Contributions: Conceptualization, data curation, project administration, methodology, investigation, writing—original draft, supervision, writing—review & editing (G.B.B.); Conceptualization, data curation formal analysis, methodology, writing—review & editing (T.H.S.R.); Data curation, formal analysis, methodology, investigation, writing—original draft (A.N.S.A.); Project administration, resources, supervision, funding acquisition, writing—review & editing (R.H.J.); Project administration, resources, supervision, funding acquisition, writing—review & editing (L.F.A.N).

Funding: This work was entirely funded by Sabin Laboratory—equipment, reagents, and professionals (authors).

Acknowledgments: The authors are very thankful to Janete Ana Ribeiro Vaz and Sandra Santana Costa Soares from Sabin Laboratory, Brasilia, Federal District, Brazil—who approved the funding for this study.

Conflicts of Interest: Sabin laboratory is a private commercial laboratory. All authors are employees of Sabin Laboratory.

References

1. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R. The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2391–2405.
2. Vainchenker, W.; Kralovics, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* **2017**, *129*, 667–679.
3. Spivak, J.L. Myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 895–896.
4. Baxter, E.J.; Scott, L.M.; Campbell, P.J.; East, C.; Fourouclas, N.; Swanton, S.; Vassiliou, G.S.; Bench, A.J.; Boyd, E.M.; Curtin, N.; et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase jak2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **2005**, *365*, 1054–1061.
5. James, C.; Ugo, V.; Le Couedic, J.P.; Staerk, J.; Delhommeau, F.; Lacout, C.; Garcon, L.; Raslova, H.; Berger, R.; Bennaceur-Griscelli, A.; et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **2005**, *434*, 1144–1148.
6. Kralovics, R.; Passamonti, F.; Buser, A.S.; Teo, S.S.; Tiedt, R.; Passweg, J.R.; Tichelli, A.; Cazzola, M.; Skoda, R.C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1779–1790.
7. Levine, R.L.; Wadleigh, M.; Cools, J.; Ebert, B.L.; Wernig, G.; Huntly, B.J.; Boggon, T.J.; Wlodarska, I.; Clark, J.J.; Moore, S.; et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 387–397.
8. Schischlik, F.; Kralovics, R. Mutations in myeloproliferative neoplasms—Their significance and clinical use. *Expert Rev. Hematol.* **2017**, *10*, 961–973.
9. 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*, 14–22.
10. Rumi, E.; Cazzola, M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* **2017**, *129*, 680–692.
11. Mahe, E.; Pedersen, K.M.; Colak, Y.; Bojesen, S.E.; Lynch, T.; Sinclair, G.; Khan, F.; Shabani-Rad, M.T. Jak2-tree: A simple cbc-based decision rule to guide appropriate JAK2 V617F mutation testing. *J. Clin. Pathol.* **2019**, *72*, 172–176.
12. Nystrand, C.F.; Ghanima, W.; Waage, A.; Jonassen, C.M. JAK2 V617F mutation can be reliably detected in serum using droplet digital pcr. *Int. J. Lab. Hematol.* **2018**, *40*, 181–186.

13. Lee, T.H.; Montalvo, L.; Chrebtow, V.; Busch, M.P. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: Higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* **2001**, *41*, 276–282.
14. Barra, G.B.; Santa Rita, T.H.; Jardim, D.P.; Mesquita, P.G.; Nobre, C.S.; Jacomo, R.H.; Abdalla Nery, L.F. Genotyping of single nucleotide polymorphisms using allele-specific qpcr producing amplicons of small sizes directly from crude serum isolated from capillary blood by a hand-powered paper centrifuge. *Diagnostics* **2019**, *9*, doi:10.3390/diagnostics9010009.
15. Jeddi, F.; Piarroux, R.; Mary, C. Application of the nuclisens easymag system for nucleic acid extraction: Optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. *Parasite* **2013**, *20*, 52.
16. Gong, J.Z.; Cook, J.R.; Greiner, T.C.; Hedvat, C.; Hill, C.E.; Lim, M.S.; Longtine, J.A.; Sabath, D.; Wang, Y.L.; Association for Molecular Pathology. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: A report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* **2013**, *15*, 733–744.
17. Kinz, E.; Leihner, A.; Lang, A.H.; Drexel, H.; Muendlein, A. Accurate quantitation of jak2 V617F allele burden by array-based digital pcr. *Int. J. Lab. Hematol.* **2015**, *37*, 217–224.
18. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
19. Jennings, L.J.; Arcila, M.E.; Corless, C.; Kamel-Reid, S.; Lubin, I.M.; Pfeifer, J.; Temple-Smolkin, R.L.; Voelkerding, K.V.; Nikiforova, M.N. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: A joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of american pathologists. *J. Mol. Diagn.* **2017**, *19*, 341–365.
20. Larsen, T.S.; Christensen, J.H.; Hasselbalch, H.C.; Pallisgaard, N. 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.* **2007**, *136*, 745–751.
21. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline—Second edition. In *CLSI Document EP17-A2*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2012.
22. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline—second edition. In *CLSI Document EP05-A2*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2004.
23. CLSI. User verification of performance for precision and trueness. In *CLSI Document EP15-A2*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2005.
24. Barra, G.B.; Santa Rita, T.H.; de Almeida Vasques, J.; Chianca, C.F.; Nery, L.F.; Santana Soares Costa, S. Edta-mediated inhibition of dnases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin. Biochem.* **2015**, *48*, 976–981.
25. Christi, M.J.S.; Peggy, A.; Evert de, J.; Marthe, S.P.; Cor van der, L.; Esther Oomen-de, H.; Maurice, P.H.M.J.; Marzia Del, R.; Jan, H.v.d.T.; Winand, N.M.D.; et al. Plasma cell-free DNA testing of patients with egfr mutant non-small-cell lung cancer: Droplet digital PCR versus next-generation sequencing compared with tissue-based results. *JCO Precis. Oncol.* **2019**, *3*, 1–9.
26. Mok, T.S.; Wu, Y.L.; Ahn, M.J.; Garassino, M.C.; Kim, H.R.; Ramalingam, S.S.; Shepherd, F.A.; He, Y.; Akamatsu, H.; Theelen, W.S.; et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 629–640.

