

Abstract

Introduktion: Dette projekt har til formål at belyse betydningen ved implementering af reagensmixet ddPCRTM Multiplex Supermix, til metoden Droplet Digital PCR. Droplet digital PCR bruges i projektet IMPROVE, til detektion af cirkulerende tumor DNA i plasma, ved colorektal cancerpatienter. Da der forefindes begrænset DNA i plasma, analyseres alt oprenset plasma på 60 µl. Det nuværende reagensmix ddPCRTM Supermix for probes (No dUTP) kan have 9 µl oprenset plasma pr. brønd, mens det nye reagensmix kan have op til 14,5 µl, hvorved det undersøges om man ved implementering kan opnå højere input. Derudover ses der på det økonomiske aspekt, forbundet med implementering. Da prøvemateriale fra IMPROVE deltagerne er opbrugt, detekteres referencegenerne Chr3 og gCYC short, som findes i rask- og tumor-DNA.

Materiale og metode: Til projektet var der på forhånd indsamlet prøver fra 24 frivillige, som var oprenset på QIASymphony. Prøverne blev analyseret med anvendelse af ddPCRTM Supermix for probes (No dUTP) og ddPCRTM Multiplex Supermix. Til analyseringen blev følgende apparater fra Bio-Rad benyttet; Automated Droplet Generator til droplet dannelse, S1000TM Thermal cycler til PCR amplifikation og QX100TM Droplet Reader til aflæsning af droplets, samt softwaren Quantasoft til beregning af koncentration. I et parret forsøgsdesign blev prøverne analyseret med 2, 5 og 9 µl cirkulerende frit DNA, ved begge reagensmix og 14,5 µl ved det nye reagensmix. Efterfølgende blev de sammenlignet ift. droplet counts, fluorescensintensitet og total DNA, samt økonomiske omkostninger.

Resultater: Alle resultater levede op til kravene ved droplet count og min. fluorescensintensitet, med undtagelse af ddPCRTM Multiplex Supermix ved 14,5 µl cirkulerende frit DNA, hvis 95% konfidensinterval ikke opfyldte kravene til droplet count. Der blev påvist signifikant forskel på droplet count og fluorescensintensitet difference, hvor ddPCRTM Supermix for probes (No dUTP) opnåede højere værdier. Der var ikke signifikant forskel på total DNA koncentration.

Konklusion: Implementering af ddPCRTM Multiplex Supermix kan ikke anbefales. Foruden at have en dyrer brønd pris, er der signifikant lave droplet count og fluorescensintensitet ved anvendelse. Da resultaterne er behæftet med en usikkerhed, bør dette dog verificeres gennem yderligere undersøgelser, før endelig beslutningstagen.

Indstilling

Betydningen ved implementering af ddPCRTM Multiplex Supermix” Droplet digital PCR (ddPCR), bruges bl.a. ved detektion af cirkulerende tumor-DNA i plasma (ctDNA). Colorektal-cancer er den hyppigste diagnosticerede cancerform i Danmark, og derfor et højaktuelt emne. For de patienter er det uhyre vigtigt, at der efter radikal operation findes en metode til sikkert at kunne fastslå, om der stadig findes tumor-DNA i plasma og derved øget risiko for tilbagefald. På MOMA anvendes ddPCR til projektet IMPROVE, hvor det undersøges om detektion af ctDNA i plasma fra Colorektal-cancer patienter kan erstatte CT-scanningerne. Gevinsten er tidligere monitorering og målrettet kemoterapi til gavn for patienterne, da der er mange og betydelige bivirkninger forbundet med kemoterapi. De studerende har afprøvet et nyt reagens til ddPCR, hvor de sammenlignede med det eksisterende reagens på mange parametre. De har selvstændigt betjent flere udstyr med tilhørende software til behandling af data. Derudover er ddPCR en ny teknik, som de håndterede i laboratoriet med høj faglig sikkerhed. Deres bachelor-rapport er velskrevet på et fagligt højt niveau og resultaterne vil blive brugt af afdelingen og delt med producenten. De studerende har været ambitiøse og arbejdsomme og fortjener indstillingen for deres arbejdsindsats på et område med stor klinisk relevans.