

DE

## GEBRAUCHSINFORMATION

# FastQ<sup>®</sup> RHD fetal

Testkit für die Analyse des Rhesus-D-Status mit zellfreier fetaler DNA  
aus maternalem Blut-Plasma  
Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)



**REF** 728213

FastQ<sup>®</sup> RHD fetal

Version: 1 / 2022 / Stand: 2022-05



BAG Diagnostics GmbH  
Amtsgerichtsstr. 1-5  
35423 Lich/Germany  
A BAG Group company

**T.** +49 (0) 6404/925-100  
**F.** +49 (0) 6404/925-460  
**M.** [Info@bag-diagnostics.com](mailto:Info@bag-diagnostics.com)  
**W.** [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)

**Ordering:**  
**T.** +49 (0) 6404 / 925 - 450  
**F.** +49 (0) 6404 / 925 - 460  
**M.** [order@bag-diagnostics.com](mailto:order@bag-diagnostics.com)

**Customer Service:**  
**T.** +49 (0) 6404 / 925 - 125  
**F.** +49 (0) 6404 / 925 - 421  
**M.** [service@bag-diagnostics.com](mailto:service@bag-diagnostics.com)

## INHALT

1.	ZWECKBESTIMMUNG.....	3
2.	PRODUKTBESCHREIBUNG.....	3
3.	TESTPRINZIP.....	3
4.	MATERIAL.....	4
4.1	Inhalt der Kits.....	4
4.2	Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte.....	4
4.3	Validierte RT-PCR Cycler und Reaktionsgefäße.....	4
4.4	Empfehlungen für nicht validierte Cycler und Reaktionsgefäße.....	5
5.	LAGERUNG UND HALTBARKEIT.....	5
6.	TESTDURCHFÜHRUNG.....	5
6.1	Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise.....	5
6.2	cffDNA Isolation.....	6
6.3	Amplifikation.....	6
6.4	Auswertung, Bewertung, Interpretation der Ergebnisse.....	7
7.	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE.....	10
8.	LEISTUNGSMERKMALE.....	10
8.1	Referenzmaterial.....	10
8.2	Analytische Evaluation.....	10
8.3	Klinische Evaluation.....	11
8.4	Störende Substanzen.....	11
9.	GRENZEN DER METHODE.....	12
10.	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE.....	13
11.	PROBLEMBEHANDLUNG.....	14
12.	VERWENDETE MARKENNAMEN.....	14
13.	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN.....	15
14.	LITERATUR.....	15

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung des FastQ® RHD fetal Kits ist die molekulargenetische Analyse des fetalen Rhesus-D-Status unter Verwendung von aus mütterlichem Plasma isolierter cffDNA. Für die Analyse werden Exon 5, Exon 7 und Exon 10 verwendet.

## 2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Die schwangerschaftsbedingte Alloimmunisierung gegen das Rhesus D-Antigen (D-Immunsierung) bei D-negativen Frauen mit D-positivem Fetus ist eine Ursache für die hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen. Lange Zeit war es gängige Praxis, dass alle D-negativen schwangeren Frauen eine pränatale Prophylaxe erhielten, da ohne Voruntersuchung des Fetus der fetale Rhesus-D-Status bis zur Geburt unbekannt war. Durch das vorliegende nicht invasive Verfahren wird sichergestellt, dass die Prophylaxe nur denjenigen Rhesus D-negativen Frauen verabreicht wird, die einen D-positiven Fetus austragen (60%). Damit werden unnötige Anti-D-Behandlungen verhindert. Bis zu 40% (Clausen et al., 2014) aller Anti-D-Injektionen können so eingespart werden.

Das FastQ® RHD fetal Kit ermöglicht die Analyse des Rhesus-D-Status aus zellfreier fetaler DNA (cffDNA) in mütterlichem Blutplasma. Die Identifizierung basiert auf der SSP PCR-Technik und der Echtzeit-Detektion (Real-Time PCR) der Amplifikation. Das Kit kann für die Analyse ab der 11. Schwangerschaftswoche (SSW) bei Einlingsschwangerschaften verwendet werden. Bei RHD-negativen Ergebnissen aus Proben mit SSW  $\leq$  20 ist das Ergebnis als vorläufig zu betrachten und der Test muss ab der 20. SSW wiederholt werden. Eine Differenzierung zwischen mütterlicher zellfreier DNA und fetaler zellfreier DNA ist nicht möglich. Der FastQ® RHD fetal Kit enthält alle für die PCR-Reaktion erforderlichen Komponenten.

## 3. TESTPRINZIP

Der Test wird mit humaner cffDNA durchgeführt, die aus mütterlichem Plasma isoliert wurde. Die DNA wird in einer Echtzeit-PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer sind für die selektive Amplifikation spezifischer Sequenzen der RHD-Allele ausgelegt. Die Amplikons werden mit fluoreszierenden Farbstoff-markierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen. Wenn Amplikons vorhanden sind, binden die Sonden an die Amplikons und werden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dadurch wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Menge der Amplikons zunimmt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des Real-Time PCR-Cyclers gemessen.

Eine interne Amplifikationskontrolle (humanes HGH-Gen) ist in der Multiplex-PCR-Reaktion enthalten, die in einem anderen Farbkanal als die RHD-spezifischen Reaktionen detektiert wird.

## 4. MATERIAL

### 4.1 Inhalt der Kits

- 2x 475 µl Q Mastermix fetal, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer. Liegt in Vials in flüssiger Form vor.
- 380 µl Q Primermix RHD fetal für die molekulargenetische Analyse des fetalen Rhesus D-Status. Der Reaktionsansatz enthält spezifische Primer und Sonden zum Nachweis der Exone 5, 7 und 10 des Rhesus D-Gens, sowie HGH-Gens spezifische Kontrollprimer und Sonden.
- Elektronische Gebrauchsinformation, erhältlich vom Download-Server [www.service.bag-diagnostics.com](http://www.service.bag-diagnostics.com), weitere Informationen siehe Beileger im Kit

### 4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur cffDNA Isolation (validierte Extraktionskits siehe 6.2)
- RT-PCR-Cycler (validierte Cycler siehe 4.3)
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- RT-PCR Reaktionsgefäße und Verschlusssysteme (validierte Produkte siehe 4.3)
- Plattenzentrifuge

### 4.3 Validierte RT-PCR Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	RT-PCR Reaktionsgefäße	RT-PCR Verschlusssystem
CFX96™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System, Fa. Bio-Rad	FrameStar® Breakable Vertically PCR Plate, Low Profile Product No. 4ti-1201 Fa. Azenia Life Sciences	Strip of 8 Flat Optical Caps Crystal Clear, Product No. 4ti-0755; qPCR Adhesive Seal, Product No. 4ti-0560 Comp.
	Removable 8 Well PCR Tube Strip, Product No. 4ti-0753 Fa. Azenia Life Sciences	Fa. Azenia Life Sciences

Hinweis: Bei Verwendung von anderen Real-Time-Thermocyclern, Reaktionsgefäßen und Verschlusssystemen müssen diese vom Anwender auf Kompatibilität getestet werden.

#### 4.4 Empfehlungen für nicht validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	RT-PCR Reaktionsgefäße	RT-PCR Verschlusssystem
LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, No. 04729692001 Fa. Roche Molecular Systems Inc.	Optical foil, included in the LightCycler® 480 Multiwell Plate 96
	Removable 8 Well PCR Tube Strip, Product No. 4ti-0753 Fa. Azenta Life Sciences	Strip of 8 Flat Optical Caps Crystal Clear, Product No. 4ti-0755 Fa. Azenta Life Sciences

Hinweis: Für den genannten Cycler wurden erste Tests durchgeführt, jedoch keine vollständige Validierung. Die Tabelle enthält die empfohlenen Spezifikationen.

Bei der Verwendung des LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System ist eine Colour Compensation zu empfehlen (RHD fetal CC LC480, [REF 726323](#)).

### 5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt müssen alle Reagenzien bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  in temperaturüberwachten Geräten gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzien angegeben. Das auf dem Außenetikett angegebene Verfallsdatum bezieht sich auf den Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Die Einfrier-Auftau-Zyklen Tests haben gezeigt, dass bis zu 12 Zyklen für den Q Mastermix fetal und bis zu 15 Zyklen für den Q Primermix RHD fetal keine nachteiligen Auswirkungen auf die Qualität des Kits haben. Es wird empfohlen, die Reagenzien bei Bedarf zu aliquotieren.

Das pipettierte Reaktionsgemisch kann vor oder nach Zugabe der DNA-Probe bis zu 16 Stunden vor Licht geschützt bei  $2..8^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, bevor der PCR-Lauf gestartet wird. Sollte die Schutzverpackung beschädigt sein, wenden Sie sich bitte an den Kundenservice.

### 6. TESTDURCHFÜHRUNG

#### 6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt werden.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- wenn möglich zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (cffDNA-Isolierung und Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion)
- Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

## 6.2 cffDNA Isolation

Der Test wird mit cffDNA durchgeführt. Wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass das Blut-Plasma schwangerer Frauen geringe Mengen zellfreier fetaler DNA enthält. Der Anteil der cffDNA steigt im Laufe der Schwangerschaft an (Zhou et al., 2015). So kann die cffDNA aus dem Blutplasma von Rhesus-D-negativen Schwangeren isoliert werden, um den fetalen Rhesus-D-Status zu analysieren.

Das Probenmaterial für die Isolierung der cffDNA muss in geeigneten Blutentnahmesystemen eingesandt werden. Für den Test wird EDTA-Blut benötigt. Das Vorhandensein von Heparin hemmt potenziell die PCR; daher sind Blutentnahmesysteme mit Heparin nicht geeignet (Beutler et al., 1990) und dürfen nicht verwendet werden. Der Transport der Vollblutprobe ist unter klar definierten Bedingungen möglich, z. B. bis zu 6 Tage bei Raumtemperatur. Das Plasma muss innerhalb dieser 6 Tage nach der Probenentnahme abgetrennt werden (Clausen et al., 2013; Müller et al., 2011). Das Plasma muss anschließend direkt für die Isolierung von cffDNA verwendet werden oder die Proben können bis zur DNA-Extraktion bei ca. -20°C gelagert werden (Londero et al., 2019).

Es wird empfohlen, für die DNA-Isolierung **CE** IVD-zertifizierte Kits zu verwenden.

### Validierte DNA Isolationskits:

- QIASymphony® DSP Circulation DNA Kit
- Qiagen QIAamp® MinElute® ccfDNA Mini Kit

Wird die etablierte Standardmethode des Labors für die cffDNA-Isolierung verwendet und handelt es sich dabei nicht um einen der oben genannten validierten Kits, muss sie vom Anwender validiert werden.

## 6.3 Amplifikation

### Hinweis:

- Das Reaktionsvolumen für jeden RT-PCR-Ansatz beträgt 20 µl (pro Well).
- Für den aktuellen Test wird die cffDNA nach der Isolation unverdünnt eingesetzt.

### Pipettiervorgang:

Jede Probe muss als Triplet-Testung durchgeführt werden.

Für Einzeltestungen werden die folgenden Volumina in das Reaktionsgefäß pipettiert:

4 µl	Q Primermix RHD fetal
10 µl	Q Mastermix fetal
1 µl	Aqua dest

Bereiten Sie den Prä-Mix entsprechend der Anzahl der Proben vor und berechnen Sie ein zusätzliches Volumen von 10%, um den Pipettierverlust zu berücksichtigen. Pipettieren Sie 15 µl des Prä-Mixes in jede Vertiefung und fügen Sie 5 µl der cffDNA-Probe hinzu.

Eine Negativkontrolle (NTC) ist vorgeschrieben, hierfür muss ein Test mit Aqua dest. anstatt der cffDNA-Probe angesetzt werden.

Anschließend sollten die Reaktionsgefäße verschlossen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugiert werden. Dabei muss sichergestellt werden, dass die PCR-Platte durch die Deckel vollständig verschlossen ist und sich keine Blasen in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, wird empfohlen, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch zu klopfen, um diese zu entfernen. Anschließend kann die PCR-Reaktion mit dem folgenden Programm durchgeführt werden.

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Ramp rate [°C/s]	Anzahl Zyklen
Initiale Aktivierung	10 min	95	2,5	1
Denaturierung	10 sec	95	2,5	10
Annealing + Extension	1 min	60	2,2	
	15 sec	72	-	
Denaturierung	10 sec	95	2,5	35
Annealing + Extension	1 min	60	2,2	
	15 sec + plate read	72	-	

Hinweis:

- Beim CFX96™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System ist eine veränderte Heizrate des Gerätes (Ramp rate) zu verwenden. Diese sind in der obigen Tabelle des PCR-Programms (Spalte „Ramp rate“) aufgelistet. Vor dem Start des Laufes muss ein Haken bei „All Channels“ gesetzt werden und die Deckeltemperatur auf 105°C eingestellt sein
- Bei Verwendung des nicht validierten LightCycler® 480 II Systems ist eine Farbkompensation erforderlich. Diese wird von BAG Diagnostics GmbH zur Verfügung gestellt.

Verwenden Sie die folgende Kanaleinstellung:

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
465	510	FAM	1	10	1
533	580	VIC	1	10	1
533	610	Texas Red	1	10	1
618	660	Cy5	1	10	1

Andere Cycler benötigen möglicherweise eine andere Einstellung der Heizrate. Daher ist eine Validierung des Anwenders erforderlich.

#### 6.4 Auswertung, Bewertung, Interpretation der Ergebnisse

Alle Testansätze mit humaner cffDNA müssen Fluoreszenzsignale im Cy5- Kanal der internen Kontrolle aufweisen.

Spezifisch positive Proben zeigen ein positives Farbsignal in den korrespondierenden Farbkanälen.

Positive Ergebnisse weisen einen Cq-Wert von  $\leq 30$  auf. Dieser Wert ist abhängig von dem Anteil an cffDNA bzw. dem Abnahmezeitpunkt des Probenmaterials (SSW).

Cq-Werte von  $\geq 30$  sind als nicht eindeutiges Ergebnis zu werten und müssen überprüft und ggf. wiederholt werden.

Das Ergebnis der RHD-Merkmale ist negativ, wenn für alle RHD-Exons 5, 7 und 10 kein Signal ermittelt wird.

Das Ergebnis der RHD-Merkmale wird als positiv definiert, wenn mindestens 4 von 9 möglichen spezifischen Nachweisen (Triplikate x 3 Exons, siehe Tabelle unten) einen Cq-Wert von  $\leq 30$  besitzen. Sollte bei den getesteten Proben (Triplikate) die Nachweise der IAC, Exon 7 und Exon 10 einen Cq-Wert von  $\leq 30$  aufweisen und nur das Signal von Exon 5 nicht detektierbar sein, kann es sich um eine RHD PSI-positive Probe handeln. In diesem Fall werden weitere Untersuchungen empfohlen.

In dem Kit FastQ® RHD fetal werden die folgenden Fluorophore verwendet:

Spezifität	Fluorophore	Cq-Level	Prüfen	Wellenlänge in nm*
Interne Amplifikationskontrolle (IAC)	Cy5	$\leq 30$	$\geq 30$	Excitation 649 Emission: 670
Exon 7	VIC	$\leq 30$	$\geq 30$	Excitation: 538 Emission: 554
Exon 10	Texas Red	$\leq 30$	$\geq 30$	Excitation: 583 Emission: 603
Exon 5	FAM	$\leq 30$	$\geq 30$	Excitation: 494 Emission: 520

\*Angaben entsprechend des Syntheselabores



Die folgende Tabelle zeigt die Interpretation der Amplifikationsergebnisse.

Cy5 (IAC)	VIC (Ex 7)	Texas Red (Ex 10)	FAM (Ex 5)	Interpretation
Positiv	Mind. 4 von 9 Replikaten positiv			Positiv.
Positiv	1-3 von 9 Replikaten positiv			Negativ, Wiederholung wird empfohlen.
Positiv	Sehr frühe Cq-Werte im Vergleich zu anderen Ergebnissen			Nicht beurteilbar, eventuell Mutter mit RHD Variante -normal oder schwach exprimiertes D Antigen oder stumme Variante des RHD Gens*. Der fetale RHD Genotyp kann nicht bestimmt werden.
Positiv	Negativ	2-3 Replikate positiv	Negativ	Partial Rhesus D Genotyp. Mutter* oder Kind tragen RHD-CE-D-Hybridgene wie zum Beispiel RHD-CE (2-9)-D, RHD-CE (3-9)-D, RHD-CE (3-7)-D, RHD-CE (4-7)-D. Abschnitt von RHD wird durch den entsprechenden Abschnitt von RHCE ersetzt. Im Falle von RHD-CE-D-Hybridgenen ist nur Exon 10 positiv.
Positiv	2-3 Replikate positiv	2-3 Replikate positiv	Negativ	Es kann sich um eine PSI-positive Probe handeln. In diesem Fall werden weitere Untersuchungen empfohlen*.
Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ: Kein spezifisches Exon wurde nachgewiesen.
Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Invalide: Ungültiges Ergebnis aufgrund von Echtzeit-PCR-Inhibition, Reagenzienversagen bzw. ungeeignetem Untersuchungsmaterial.

\* Es wird empfohlen den Rhesus D Genotyp der Mutter zu bestätigen (BAG Diagnostics ERY Q® RH, [REF](#) 728405; ERY Q® Weak D, [REF](#) 728401; ERY Q® Partial D, [REF](#) 728403).

#### Anmerkungen:

Der vordefinierte Cq-Wert von  $\leq 30$  gilt nur für die Verwendung des CFX96™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System und des LightCycler® 480 II Cyclers in Kombination mit den entsprechenden PCR-Gefäßen und Verschlusssystemen (siehe Kapitel 4.3 und 4.4).

Die Amplifikationssignale von RHD negativen Proben müssen sich für die drei Farbkanäle jeweils außerhalb der definierten Cq-Werte befinden.

Eine Negativkontrolle (NTC) mit Aqua dest. entwickelt über den gesamten RT-PCR Lauf keine Fluoreszenzsignale und dient als Kontaminationskontrolle. Wenn bei der Negativkontrolle mit Aqua dest. Fluoreszenzsignale innerhalb der definierten Cq-Werte auftreten, weist dies auf eine Kontamination hin. Fluoreszenzsignale außerhalb der definierten Cq-Werte können aufgrund der sehr sensitiven Testmethode bei ungenauem Pipettieren auftreten. Eine Detailanalyse wird empfohlen, ggf. ist der Arbeitsplatz von cffDNA oder DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

## 7. WARN- UND ENTSORUNGSHINWEISE

Die Kits sollten nur von speziell ausgebildetem und qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Berücksichtigung der guten Laborpraxis durchgeführt werden.

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von cffDNA verwendet werden (z.B. Blut) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen.

Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden.

Ein Sicherheitsdatenblatt oder eine Erklärung zu Sicherheitsdatenblättern (SDS) kann heruntergeladen werden unter [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com).

## 8. LEISTUNGSMERKMALE

Die Kombination der Primer und Sonden ermöglicht eine Analyse der humanen fetalen Rhesus D-Merkmale aus maternalem Plasma entsprechend der lotspezifischen Angaben. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Testkits wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben überprüft.

### 8.1 Referenzmaterial

Als Referenzmaterial wurde das WHO Reference Reagent RHD/SRY-DNA-Sensitivitätsstandard NIBSC-Code 07/222 eingesetzt.

### 8.2 Analytische Evaluation

Nachweisgrenze:

Die analytische Nachweisgrenze wurde mit der WHO-Referenzprobe (NIBSC-Code 07/222) bestimmt. Die Probe wurde unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:2 getestet. Beide wurden in 4 Wiederholungen getestet und positiv bestimmt.

Analatische Sensitivität / Spezifität:

Die Sensitivitätstests haben gezeigt, dass das Kit eine genomische DNA-Konzentration von 0,1 ng/ml in Plasma nachweist, wobei 3 von 3 Triplikaten innerhalb der angegebenen Grenzen (Positive Ergebnisse weisen einen Cq-Wert von  $\leq 30$  auf) positiv waren.

Die Spezifität wurde durch die Untersuchung von negativen Proben nachgewiesen. Es wurde kein Hintergrundsignal beobachtet, was darauf schließen lässt, dass die Primer und Sonden so ausgewählt wurden, dass sie spezifisch für RHD Exon 5, 7 und 10 sind.

Linearität:

Der Kit zeigt lineare Reaktionen bei einer DNA-Konzentration von 100 ng/ml Plasma bis 0,1 ng/ml Plasma.

Exon 5:  $R^2 = 0.9767$

Exon 7:  $R^2 = 0.9751$

Exon 10:  $R^2 = 0.9922$

### 8.3 Klinische Evaluation

Für den FastQ® RHD fetal Kit wurde eine Leistungsbewertungsstudie mit vortypisierten Proben durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit einem **CE** IVD-zertifizierten Referenztest erzielt wurden. Die Auswertung der Ergebnisse aller Proben wurde für die Berechnung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität des Tests verwendet.

		Referenztest	
		Positiv	Negativ
FastQ® RHD fetal	Positiv	80	0
	Negativ	1	35

Diagnostische Spezifität: 100%

Diagnostische Sensitivität: 98.8%

### 8.4 Störende Substanzen

Der Einfluss potentiell störender Substanzen wurde mit einer Rhesus-D-positiven Probe ohne Störsubstanzen und mit den Störsubstanzen in den in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Konzentrationen (Konz.) getestet. Die Tests mit Störsubstanzen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Es wurde keine hemmende Wirkung beobachtet. Die Konzentration 3 wurde als Höchstkonzentration festgelegt und sollte nicht überschritten werden.

Substanzen	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3
Bovine Serum Albumin (BSA)	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml
EDTA	0,2 mM	0,6 mM	1,0 mM
Tris Puffer	2 mM	6 mM	10 mM
Natriumchlorid (NaCl)	5 mM	15 mM	25 mM
Isopropanol	0,3% v/v	0,9% v/v	1,5% v/v
Ethanol	0,3% v/v	0,9% v/v	1,5% v/v

## 9. GRENZEN DER METHODE

Da das RT-PCR Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen mit cffDNA oder DNA reagiert, ist bei der Isolation hierauf zu achten.

Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA zu vermeiden. Die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. wird vorgeschrieben.

In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden ( $C_q > N.A.$ ).

Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle ist ggf. der PCR-Laborplatz von cffDNA und DNA zu dekontaminieren und gegebenenfalls sind die Reagenzien auszutauschen.

Alle Geräte (z.B. Pipetten, Realtime-Geräte) müssen entsprechend der Herstellervorgaben kalibriert werden.

Da zellfreie fetale DNA nur in sehr niedriger Konzentration im mütterlichen Plasma enthalten ist, ist die Extraktion ein kritischer Schritt in der Analyse. Es sollte gewährleistet werden, dass mit der Extraktionsmethode genügend fetale DNA gewonnen werden kann.

Der Test ist nicht für Proben geeignet, die vor der 11 Schwangerschaftswoche entnommen wurden.

Unsachgemäße Anwendung oder PCR Inhibitoren können zu falschen Ergebnissen führen. Das Restrisiko eines negativen Testergebnisses bei einem RDH-positiven Fetus kann dann nicht ausgeschlossen werden.

Seltene klinische Subtypen können bei einzelnen Exons zur Nichtdetektion des entsprechenden Exons führen. Auf die Gesamtanalyse des Multiplexmixes der drei Exons hat dies jedoch keinen Einfluss.

Eine Trisomie 21 oder Trisomie 18 des Fetus kann die Konzentration der cffDNA beeinflussen. Eine Zwillingsschwangerschaft erhöht die cffDNA-Konzentration (Zhou et al., 2015).

In seltenen Fällen kann ein RHD-negativer Phänotyp mit einer RHD Inaktivierung durch genetische Variationen (z.B. Punktmutationen) assoziiert sein. Dadurch kann eine

serologische RHD-negative Mutter/Fetus positiv auf einzelne Exons des RHD Gens getestet werden.

Die Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

## 10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots werden mit einer Kombination von DNA Proben mit bekanntem Typ durchgeführt. Eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist in jedem Ansatz enthalten. Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen ist vorgeschrieben. Zu diesem Zweck wird ein Test ohne cffDNA angesetzt (NTC), siehe Punkt Amplifikation (6.3).

## 11. PROBLEMBEHANDLUNG

Fehler	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
<b>Schlechtes bzw. kein Signal</b>	Vorhandensein eines Inhibitors.	Frische Reagenzien verwenden.
	Keine oder zu geringe cffDNA-Menge im Reaktionsansatz.	Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren achten. Nicht geeigneter Zeitpunkt der Probennahme (SSW).
	Keine oder zu geringe cffDNA-Menge im Reaktionsansatz.	Ungeeignete Isolationsmethode.
	Falsche Amplifikationsparameter.	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen.
	Verunreinigte oder degradierte cffDNA.	cffDNA-Konzentration/Qualität überprüfen. cffDNA-Isolierung wiederholen.
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.	Neuen Primermix verwenden. Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten!
	Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand.	Vorsichtiges Pipettieren. Abzentrifugieren der PCR Platte.
	Nicht kompatible bzw. qualitativ minderwertige qPCR Plastikware.	Verwendung von kompatibler und hochwertiger Plastikware.
	Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR Gefäße.	Prüfung auf korrektes Verschließen. Klebefolien sind im Randbereich auf Dichtigkeit zu Überprüfen.
<b>Signal in Negativkontrolle</b>	Kontamination der Negativkontrolle mit cffDNA oder DNA.	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.






## 12. VERWENDETE MARKENNAMEN

TaqMan® und LightCycler® sind Markennamen der Firma Roche Molecular Systems Inc.

FrameStar® ist ein Markenname der Firma Azenta Life Sciences.

QIAamp®, MinElute® und QIAasymphony® sind Markennamen der Firma Qiagen.

### 13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Ausreichend für n Tests
	Gebrauchsinformation beachten
	Lagertemperatur / Oberer Temperaturgrenzwert
	Hersteller
	Verwendbar bis
<b>IVD</b>	In-vitro-Diagnostikum
<b>eIFU</b>	Elektronische Gebrauchsinformation
<b>FETAL TYPING</b>	Zweckbestimmung: Testkit für die Analyse von zellfreier fetaler DNA aus maternalem Blut-Plasma
<b>REF</b>	Bestell-Nummer
<b>CONT</b>	Inhalt, enthält
<b>LOT</b>	Lot-Nr.
<b>Q PRIMERMIX   RHD fetal</b>	Flüssiger Primermix (Spezifische Primer- und Sonden sowie HGH-spezifische Kontrollprimer und -Sonden).
<b>Q MASTERMIX   fetal</b>	Mastermix, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer

### 14. LITERATUR

Gemeinsamer Bundesausschuss. Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung (Mutterschafts-Richtlinie), 2020

Beutler, E., Gelbart, T., & Kuhl, W. (1990). Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 9(2), 166

Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, Krog GR, Nielsen LK, Tabor A, et al. (2013) Pre-Analytical Conditions in Non-Invasive Prenatal Testing of Cell-Free Fetal RHD. *PLoS ONE* 8(10): e76990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076990>

Clausen, F. B., Damkjær, M. B., & Dziegiel, M. H. (2014). Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 50(2), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.008>

Londero, D., Stampalija, T., Bolzicco, D., Castro Silva, E., Candolini, M., Cortivo, C., Dreossi, C., Fantasia, I., Pecile, V. and De Angelis, V. (2019), Fetal RHD detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma: validation of a diagnostic kit using automatic extraction and frozen DNA. *Transfusion Med*, 29: 408-414. <https://doi.org/10.1111/tme.12605>

Müller, S. P., Bartels, I., Stein, W., Emons, G., Gutensohn, K., & Legler, T. J. (2011). Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenatal diagnosis*, 31(13), 1300–1304. <https://doi.org/10.1002/pd.2889>

Zhou, Y., Zhu, Z., Gao, Y., Yuan, Y., Guo, Y., Zhou, L., Liao, K., Wang, J., Du, B., Hou, Y., Chen, Z., Chen, F., Zhang, H., Yu, C., Zhao, L., Lau, T. K., Jiang, F., & Wang, W. (2015). Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 22(11), 1429–1435. <https://doi.org/10.1177/1933719115584445>

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com) oder kontaktieren Sie uns direkt über [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com)