

DE

## GEBRAUCHSINFORMATION

# FastQ<sup>®</sup> cff control

Testkit zum Nachweis eines fetalen Markers als Kontrolle für zellfreie fetale DNA  
in maternalem Blutplasma

Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)



**REF** 728214

FastQ<sup>®</sup> cff control

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

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung des FastQ® cff control Kits ist der Nachweis zellfreier fetaler DNA (cffDNA) im mütterlichen Plasma unter Verwendung eines fetalen Markers, der in ca. 50% der Föten vorhanden ist. Dieses Kit sollte zusätzlich zum FastQ® RHD fetal Kit verwendet werden, das für die Analyse des fetalen Rhesus-D-Status vorgesehen ist.

## 2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Das FastQ® cff control Kit ermöglicht den nicht-invasiven Nachweis von cffDNA. Durch den im Kit enthaltenen Nachweis eines fetalen Markers, welcher nur in ca. 50% der Proben enthalten ist, kann die Anzahl der zu wiederholenden Tests um etwa 50% reduziert werden, da dieser als spezifische Kontrolle der fetalen DNA fungiert. Somit kann in ca. 50% der Fälle, die ein falsch-negatives oder ein fragliches Ergebnis beim Nachweis der RHD-Exone erzielen, aber ein korrekt-positives Ergebnis bei der IAC (HGH-Gen), eine zu geringe cffDNA-Menge ausgeschlossen werden. Daher wird empfohlen, neben den Nachweisen für die RHD-Exons 5, 7 und 10 sowie der internen Kontrolle zur Detektion der maternalen und fetalen Fraktion (über das HGH-Gen) mit dem FastQ® RHD fetal Kit, den Nachweis des fetalen Markers mit dem FastQ® cff control Kit als Kontrolle zu ergänzen.

Das Kit kann ab der 11. Schwangerschaftswoche (SSW) bei Einlingsschwangerschaften verwendet werden. Bei 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. Das FastQ® cff control Kit enthält alle für die PCR-Reaktion benötigten Komponenten.

## 3. TESTPRINZIP

Der Test wird mit cffDNA durchgeführt, die aus mütterlichem Plasma isoliert wurde. Die DNA wird in einer Echtzeit-PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer wurden speziell zur selektiven Amplifikation des fetalen Markers entwickelt. Die Amplikons werden mit Fluoreszenzfarbstoff-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. Dabei 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 spezifische Reaktion detektiert wird.

## 4. MATERIAL

### 4.1 Inhalt der Kits

- 1x 475 µl Q Mastermix fetal, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer. Liegt in Vials in flüssiger Form vor.
- 1x 200 µl Q Primermix cff control für die molekulargenetische Analyse des fetalen Markers. Der Reaktionsansatz enthält spezifische Primer und Sonden sowie HGH-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<br>96 Real-Time PCR<br>Detection System<br>Fa. Bio-Rad | FrameStar® Breakable Vertically<br>PCR Plate, Low Profile<br>Product No. 4ti-1201<br>Fa. Azenta Life Sciences | Strip of 8 Flat Optical Caps Crystal<br>Clear, Product No. 4ti-0755;<br>qPCR Adhesive Seal,<br>Product No. 4ti-0560<br>Fa. Azenta Life Sciences |
|  | Removable 8 Well PCR Tube Strip,<br>Product No. 4ti-0753<br>Fa. Azenta 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<br>Real-Time PCR<br>Detection System<br>Fa. Roche Molecular<br>Systems Inc. | LightCycler® 480 Multiwell Plate<br>96, white, No. 04729692001<br>Fa. Roche Molecular Systems<br>Inc. | Optical foil, included in the<br>LightCycler® 480 Multiwell Plate 96                            |
|   | Removable 8 Well PCR Tube<br>Strip, Product No. 4ti-0753<br>Fa. Azenta Life Sciences                  | Strip of 8 Flat Optical Caps<br>Crystal Clear, Product No. 4ti-0755<br>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 cff control 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
- zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (cffDNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen
- Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

### 6.2 cffDNA Isolation

Der Test wird mit zellfreier fetaler DNA (cffDNA) durchgeführt. Wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass das Blutplasma 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.  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden (Londero et al., 2019).

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

#### Validierte DNA Isolationskits:

- QIASymphonie®; DSP Circulation DNA Kit
- Qiagen QIAMP®; 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 cff control |
| 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 den 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 Touch™ & 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               | 610             | Texas Red | 1           | 10           | 1                          |

Andere Cycler benötigen möglicherweise eine andere Einstellung der Heizrate. Daher ist eine Validierung durch den Anwender erforderlich.

## 6.4 Auswertung, Bewertung, Interpretation der Ergebnisse

Alle Testansätze mit humaner cffDNA müssen ein Fluoreszenzsignal im Texas Red-Kanal der internen Kontrolle aufweisen.

Spezifisch positive Proben zeigen ein positives Farbsignal in dem korrespondierenden Farbkanal.

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

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

Das Ergebnis des fetalen Markers ist negativ, wenn 1 oder kein Signal bei Testung der Triplikate ermittelt wird. Dies ist ein Hinweis, dass entweder der fetale Marker im Fetus nicht vorhanden ist oder dass nicht genügend cffDNA für den Nachweis in der Probe vorliegt.

Das Ergebnis des fetalen Markers ist positiv, wenn 2 oder 3 Signale bei der Testung der Triplikate ermittelt werden.

In dem Kit FastQ® cff control werden die folgenden Fluorophore verwendet:

| Spezifität                            | Fluorophore | Cq-Level  | Prüfen    | Wellenlänge in nm*               |
|---------------------------------------|-------------|-----------|-----------|----------------------------------|
| Interne Amplifikationskontrolle (IAC) | Texas Red   | $\leq 30$ | $\geq 30$ | Excitation: 590<br>Emission: 610 |
| Fetale Marker                         | FAM         | $\leq 30$ | $\geq 30$ | Excitation: 495<br>Emission: 520 |

\* Angaben entsprechend des Syntheselabors

Die folgende Tabelle zeigt die Interpretation der Amplifikationsergebnisse:

| Texas Red (IAC) | FAM (Fetaler Marker)             | Interpretation   |
|-----------------|----------------------------------|--|
| Positiv         | Mind. 2 von 3 Replikaten positiv | Positiv: Nachweis des fetalen Markers.   |
| Positiv         | 1 von 3 Replikaten positiv       | Negativ, Wiederholung wird empfohlen.  |
| Positiv         | Negativ                          | Negativ: Kein fetaler Marker wurde nachgewiesen. Der Marker ist nicht vorhanden oder die Probe enthält nicht genügend Kopien der cffDNA. |
| Negativ         | Negativ                          | Invalide: Ungültiges Ergebnis aufgrund von Echtzeit-PCR-Inhibition, Reagenzienversagen bzw. ungeeignetem Untersuchungsmaterial.          |

#### Anmerkungen

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

Die Amplifikationssignale von Proben, die negativ für den fetalen Marker sind, müssen sich für den spezifischen Farbkanal außerhalb des definierten Cq-Werts 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 zur Kontrolle der humanen fetalen cffDNA aus maternalem Blutplasma 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 den fetalen Marker sind.

Linearität:

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

$$R^2 = 0.9959$$

### 8.3 Klinische Evaluation

Für den FastQ® cff control 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®<br>cff control | Positiv | 46           | 5       |
|                       | Negativ | 8            | 48      |

Diagnostische Spezifität 90,6%

Diagnostische Sensitivität: 85,2%

### 8.4 Störende Substanzen

Der Einfluss potentiell störender Substanzen wurde mit einer für den fetalen Marker 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     |
| Natriumchlorit (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 von 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 (Cq > N.A.).

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

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

## 10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots werden mit DNA Proben durchgeführt, die bei allen Untersuchungsmerkmalen positiv reagieren. Wir empfehlen, die oben genannte Referenzprobe ebenfalls hierfür zu verwenden. Eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist in jedem Reaktionsansatz 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   |
|---|---|---|
| Schlechtes bzw. kein Signal   | Vorhandensein eines Inhibitors.   | Frische Reagenzien verwenden.   |
|   | Keine oder zu geringe cffDNA-Menge im Reaktionsansatz.  | Test wiederholen.<br>Auf richtiges Pipettieren achten.<br>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.<br>cffDNA-Isolierung wiederholen.   |
|   | Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.   | Neuen Primermix verwenden.<br>Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden.<br>Lagerungsbedingungen beachten! |
|   | Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand.                                       | Vorsichtiges Pipettieren.<br>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.<br>Klebefolien sind im Randbereich auf Dichtigkeit zu Überprüfen. |   |
| Signal in Negativkontrolle  | Kontamination der Negativkontrolle mit cffDNA oder DNA.   | Wiederholung der Negativkontrolle.<br>Dekontamination des Arbeitsplatzes.   |






## 12. VERWENDETE MARKENNAMEN

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

FrameStar® ist ein Markenname der Firma 4titude® Ltd.

QIAamp®, MinElute® und QIASymphony® 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:<br>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   cff control</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

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)