

DE

Gebrauchsinformation

FastQ[®] RHD fetal

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com

Testkit zur Analyse von Rhesus D-Merkmalen auf zellfreier fetaler DNA aus maternalem Blut-Plasma

RUO

For research use only –Nicht für Diagnosezwecke

REF 728210 FastQ[®] RHD fetal

Inhalt

1. Applikation	1
2. Hintergrund	1
3. Produktbeschreibung	1
4. Testprinzip	1
4. Material	2
4.1 Inhalt der Kits	2
4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte	2
4.3 Empfohlene Cycler und Reaktionsgefäße	2
5. Lagerung und Haltbarkeit	2
6. Testdurchführung	3
6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	3
6.2 Amplifikation	3
6.3 Auswertung, Bewertung, Interpretation der Ergebnisse	4
7. Warn- und Entsorgungshinweise	5
8. Leistungsmerkmale	6
9. Grenzen der Methode	6
10. Interne Qualitätskontrolle	6
11. Problembehandlung	7
12. Verwendete Markennamen	7
13. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	8
14. Literatur	8

Version: 01/2021 / Stand: 2021-08

1. Applikation

Das FastQ® RHD fetal Kit ermöglicht die Analyse von Rhesus D-Merkmalen auf zellfreier fetaler DNA (cffDNA) im mütterlichen Blut-Plasma. Die Identifizierung erfolgt auf molekulargenetischer Basis mit Hilfe der SSP PCR-Technik und Echtzeit-Nachweis (Realtime-PCR) der Amplifikation. Das Kit kann ab der 11 Schwangerschaftswoche (SSW) bei Einlingsschwangerschaften zur Analyse eingesetzt werden. Bei RHD-negativem Ergebnis ist dies als vorläufiges Ergebnis zu betrachten und der Test muss ab der 20. SSW wiederholt werden.

Eine Unterscheidung zwischen mütterlicher zellfreier DNA und fetaler zellfreier DNA findet dabei nicht statt.

For research use only – Nicht für Diagnosezwecke

2. Hintergrund

Die schwangerschaftsbedingte Alloimmunisierung gegen das D-Antigen (D-Immunsierung) bei D-negativen Frauen ist eine Ursache für die hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen. Lange Zeit war es gängige Praxis, dass allen D-negativen schwangeren Frauen eine pränatale Prophylaxe erhielten, da ohne Voruntersuchung des Fetus der fetale Rhesus D-Status bis zur Geburt unbekannt blieb und durch invasive Verfahren mit einem erhöhten Fehlgeburtenrisiko erfolgten. Durch ein nicht invasives Verfahren wird sichergestellt, dass die Prophylaxe nur denjenigen D-negativen Frauen verabreicht wird, die einen D-positiven Fetus austragen (60 %). Damit werden unnötige Anti-D-Behandlungen verhindert. Bis zu 40 % ^[2] aller Anti-D-Injektionen können so eingespart werden.

3. Produktbeschreibung

Das FastQ® RHD fetal Kit ermöglicht die molekulargenetische Analyse von drei unterschiedlichen fetalen Rhesus D-Merkmalen aus maternalem Plasma. Das FastQ® RHD fetal Kit enthält alle für die PCR-Reaktion benötigten Komponenten.

4. Testprinzip

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. ^[3] So kann aus dem Blut-Plasma von RhD-negativen Schwangeren die cffDNA isoliert werden und so das fetale RHD-Gen identifiziert werden, sofern der Fetus über dieses verfügt.

Das fetale RHD-Gen wird mittels RT-PCR über drei verschiedene Exone des RHD-Gens nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um die Exons 5, 7 und 10. Die cffDNA wird in einer PCR mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer wurden speziell zur selektiven Amplifikation von Abschnitten spezifischer Rhesus D-Merkmale entwickelt. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen (Realtime-PCR; RT-PCR), wodurch die Sensitivität und Spezifität des Tests den Nachweis geringer Kopienzahlen in der cffDNA gegenüber klassischen Verfahren ermöglicht (SSP-PCR).

Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq Polymerase hydrolysiert und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge des PCR-Produkts ansteigt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des RT-PCR-Cyclers gemessen. Der Test wird in einer PCR-Reaktion durchgeführt, in der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen auch die interne Kontrolle (humanes HGH-Gen), nachgewiesen wird.

4. Material

4.1 Inhalt der Kits

- **2x 500 µl Q Mastermix fetal**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer. Liegt in Vials in flüssiger Form vor.
- **380 µl Oligomix FastQ® RHD fetal** für die molekulargenetische Bestimmung von fetalen Rhesus D-Merkmalen. Der Reaktionsansatz enthält spezifische Primer und Sonden zum Nachweis der Exone 5, 7 und 10 des Rhesus D-Gens sowie HGH-spezifische Kontrollprimer und Sonden (Oligomix).

4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur cffDNA Isolation
- RT-PCR-Cycler (empfohlene Cycler siehe 4.3)
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Geeignete Plastikware
- Plattenzentrifuge

4.3 Empfohlene Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	RT-PCR Reaktionsgefäße	RT-PCR Verschlusssystem
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate 96 white wells, black frame/Product No. 4ti-1201 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences	Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Optically clear adhesive film, Product No. 4ti-0560 Comp. Fa. 4titude / Brooks Life Sciences
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

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

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. Es wird empfohlen, die Reagenzien ggf. zu aliquotieren.

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 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:

Für jede Probe (Triplet-Testung) wird ein Prä Mix erstellt:

12 µl Q Oligomix RHD fetal
30 µl Q Mastermix fetal
15 µl Proben cffDNA
3 µl Aqua dest.

Aus diesem Prä Mix werden in jedes der 3 Wells 20 µl pipettiert.

Für Einzeltestungen werden 4 µl Q Oligomix RHD fetal, 10 µl Q Mastermix fetal, 5 µl Proben cffDNA und 1 µl Aqua dest. in das Reaktionsgefäß pipettiert.

Wenn eine **Negativkontrolle (NTC)** mitgeführt werden soll, ist ein Test mit Aqua dest. anstatt der Proben-cffDNA anzusetzen.

Anschließend sollten die Reaktionsgefäße verschlossen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugiert werden. Dabei muss sichergestellt werden, dass die PCR-Platte durch die Deckel **vollständig verschlossen** 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 [s]	Temperatur [°C]	Ramp rate [°C/s]	Plate read	Anzahl Zyklen
Initiale Aktivierung	600	95	2,5	-	1
Denaturierung	10	95	2,5	-	45
Annealing +	60	60	2,2	-	
Extension	15	72	-	ja	

Die folgenden Realtime-Geräte werden für die Testungen verwendet:

Bio-Rad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System

Roche: LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

Hinweis:

- Beim CFX96™ 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 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.

6.3 Auswertung, Bewertung, Interpretation der Ergebnisse

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

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

Positive Ergebnisse weisen einen Cq-Wert von ≤ 40 auf. Dieser Wert ist abhängig von dem Anteil an cffDNA bzw. dem Abnahme Zeitpunkt des Probenmaterials (SSW).

Cq-Werte von ≥ 40 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 alle drei Exons einen Cq-Wert ≤ 40 besitzen. Ausnahme: Die fehlende Amplifikation von Exon 5 (Cy5-Kanal) dient dem Nachweis des RHD-Pseudogens (PSI). Sollte bei den getesteten Proben (Triplikat) die Nachweise der IAC, Exon 7 und Exon 10 einen Cq-Wert von ≤ 40 aufweisen und nur das Signal von Exon 5 nicht detektierbar

sein, kann es sich um eine PSI-positive Probe handeln. In diesem Fall werden weitere Untersuchungen empfohlen.

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

Spezifität	Fluorophore	Wellenlänge in nm*
Interne Amplifikationskontrolle (IAC)	FAM	Excitation: 494 Emission: 520
Exon 7	VIC	Excitation: 538 Emission: 554
Exon 10	Texas Red	Excitation: 583 Emission: 603
Exon 5	Cy5	Excitation 649 Emission: 670

* Angaben entsprechend des Syntheselabores

Anmerkungen

Der vordefinierte Cq-Wert von ≤ 40 gilt nur für die Verwendung des CFX96 und des LightCycler® 480 II Cyclers in Kombination mit den entsprechenden PCR-Gefäßen (siehe 4.3).

Die Amplifikationssignale von Negativkontrollen (RHD-Merkmale negativ) 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. Detailanalyse wird empfohlen - ggf. ist der Arbeitsplatz von cffDNA oder DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

7. Warn- und Entsorgungshinweise

Die Kits sollten nur von speziell ausgebildetem Personal und qualifizierten 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 bzw. eine Erklärung zu Sicherheitsdatenblättern (SDB) kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden.

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 jede Lot anhand von Kontrollproben überprüft werden.

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 empfohlen.

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.

10. Interne Qualitätskontrolle

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots werden mit einer Kombination von DNA Proben mit bekannten Typ durchgeführt werden. Eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation sowie die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird ein Test ohne cffDNA angesetzt (NTC), siehe Punkt Amplifikation.

11. Problembehandlung










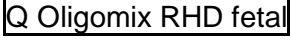
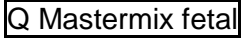
Fehler	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
Schlechtes bzw. kein Signal	Vorhandensein eines Inhibitors.	Frische Reagenzien verwenden.
	Keine oder zu geringe cffDNA-Menge im Reaktionsansatz.	Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren achten. Nicht geeigneter Zeitpunkt der Probennahme (SSW).
	Keine oder zu geringe cffDNA-Menge im Reaktionsansatz.	Ungeeignete Isolationsmethode
	Falsche Amplifikations-parameter.	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen.
	Verunreinigte oder degradierte cffDNA.	cffDNA-Konzentration/Qualität überprüfen. cffDNA auf einem Gel überprüfen. cffDNA-Isolierung wiederholen.
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.	Neuen Oligomix 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 Plastik-ware.	Verwendung von kompatibler und hochwertiger Plastikware.
Signal in Negativkontrolle	Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR Gefäße.	Prüfung auf korrektes Verschließen. Klebefolien sind im Randbereich auf Dichtigkeit zu Überprüfen.
	Kontamination der Negativkontrolle mit cffDNA oder DNA.	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

12. Verwendete Markennamen

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

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

13. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Hersteller
	Verwendbar bis
	Nur für Forschungszwecke / RUO / Nicht für in vitro Diagnostik
	Gebrauchsinformation
	Elektronische Gebrauchsinformation
	Artikelnummer
	Lot-Nr.
	Flüssiger Oligomix (Spezifische Primer- und Sonden sowie HGH-spezifische Kontrollprimer und -Sonden).
	Mastermix, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer

14. Literatur

1. Gemeinsamer Bundesausschuss. *Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung (Mutterschafts-Richtlinie)*, 2020
2. F. B. Clausen, M. B. Damkjær, M. H. Dziegiel et al. *Noninvasive fetal RhD genotyping*, 2014
3. Y. Zhou, Z. Zhu, Y. Gao et al. *Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma*, 2015.

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website www.bag-diagnostics.com oder kontaktieren Sie uns direkt über info@bag-diagnostics.com