

## KURZANLEITUNG

# FastQ<sup>®</sup> RHD fetal plus

Thermocycler:

Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System 96-Well Fast  
oder QuantStudio™ 5 Dx System

### PCR PROGRAMM



Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Zyklen
Initiale Aktivierung	10 min	95	2,5	1
Denaturierung	10 s	95	2,5	10
Annealing + Extension	1 min	60	2,2	
	15 s	72	2,2	
Denaturierung	10 s	95	2,5	35
Annealing + Extension	1 min	60	2,2	
	15 s + plate read	72	2,2	
Kühlen	2 min	37	2,2	1

### FLUOROPHORE

Spezifität	Exon 5	Exon 7	Exon 10	Fetale DNA-Kontrolle	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Fluorophore	FAM	VIC	Texas Red* (ROX)	TAMRA	Cyanin 5

\*Für RED kann sowohl Texas Red als auch ROX verwendet werden.

### WORKFLOW

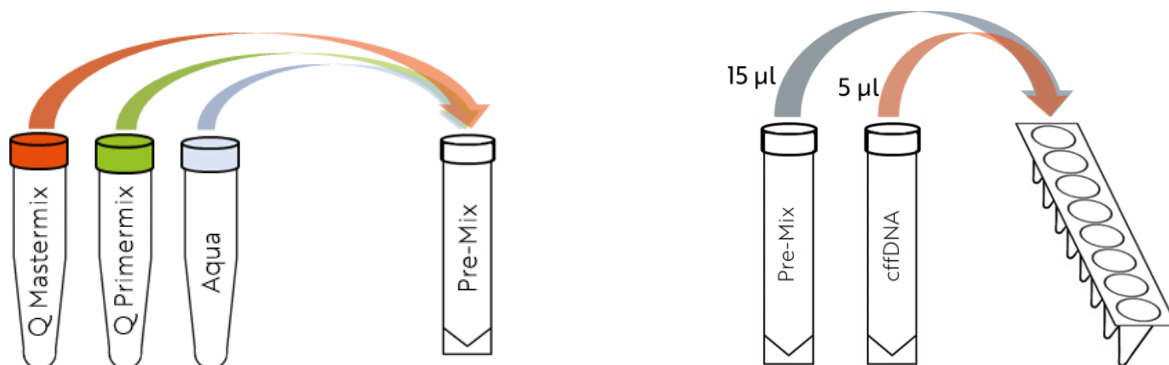
1. Schritt: Vorbereitung	
	Die 475 µl Q Mastermix fetal und die 380 µl Q Primermix RHD fetal plus bei Raumtemperatur auftauen.
	Die beiden Röhrchen vorsichtig vortexen.

## 2. Schritt: Test Setup

Testen Sie die *cell-free fetal DNA* (cffDNA) als Triplikat mit folgendem Test Setup.

Für einen Pre-Mix berechnen Sie entsprechend der Anzahl der Proben ein zusätzliches Volumen von 10%, um den Pipettierverlust zu berücksichtigen (s. Tabelle). Pipettieren Sie 15 µl des Prä-Mixes in jede Vertiefung und fügen Sie 5 µl der **cffDNA-Probe** hinzu.

Anzahl der Triplikat Tests (n)	Q Mastermix fetal [µl]	Q Primermix RHD fetal [µl]	Aqua dest. [µl]	Pre-Mix Volumen [µl]
1	40	16	4	60
2	70	28	7	105
3	100	40	10	150
4	130	52	13	195
5	160	64	16	240
6	190	76	19	285
7	220	88	22	330
8	250	100	25	375
9	280	112	28	420
10	310	124	31	465
15	470	188	47	705
20	630	252	63	945
25	780	312	78	1170
30	930	372	93	1395
32 (96 plate)	990	396	99	1485



**3. Schritt: Vorbereitung**

Reaktionsgefäße verschließen und zentrifugieren.

Legen Sie die Platte/den Streifen in den RT-Cycler und starten Sie den Lauf.

**4. Schritt: Auswertung**

Alle Signale  $C_q \leq 30$  liegen im korrekt positiven Bereich.

Für die detaillierte Auswertung bitte die Auswertetabelle beachten.

**CYCLER EINSTELLUNGEN****1. Schritt: „Experiment properties“**

Wenn Sie mit Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast oder einem QuantStudio™ 5 Dx System arbeiten, müssen folgende Grundeinstellungen vorgenommen werden:

Experiment properties*	QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast	QuantStudio™ 5 Dx Real-Time PCR-System, 96-Well, 0.2 ml
Instrument	Quantstudio™ 6 Flex System	Quantstudio™ 5 Dx
Block	Fast 96-Well (0.1ml)	96-Well 0.2-mL
Experiment Type	Comparative Ct	Comparative Ct
Chemistry	TaqMan® Reagents	TaqMan® Reagents
Run Mode	Standard	Standard
Reaction Volume	20 µL	20 µL
Heated Cover Temperature	105.0°C	105.0°C
Passive Reference	None	None

**2. Schritt: „Define“ / „Plate“ Auswahl der Reporter und Quencher**

Auf diesen RT-Cyclern können die Reporter und Quencher ausgewählt werden. Ein Reporter kann nur ausgewählt werden, wenn der Farbstoff zuvor kalibriert wurde. Die Reporter müssen kitspezifisch ausgewählt werden und sind abhängig von den Sonden, die im jeweiligen Kit detektiert werden sollen. Die Reporter Bezeichnung und Farbe wird von jedem Labor während der Kalibrierung ausgewählt. Für den Quencher sollte NFQ-MGB für alle Kits ausgewählt werden.

Cy5 (IAC)	TAMRA (Fetaler Marker)	VIC (Ex 7)	Texas Red (Ex 10)	FAM (Ex 5)	Interpretation	
Positiv	Min. 2 von 3 Replikaten positiv	Mind. 4 von 9 Replikaten positiv			●	Positiv.
Positiv	1 von 3 Replikaten positiv	1-3 von 9 Replikaten positiv			●	Negativ, Wiederholung wird empfohlen.
Positiv	2-3 Replikate 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	2-3 Replikate 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	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	●	Negativ: Kein spezifisches Exon wurde nachgewiesen. Fetus RHD negativ und der fetale Marker nicht vorhanden oder die Probe enthält keine nachweisbaren bzw. ausreichenden Kopienzahlen (LOD) der cffDNA.
Positiv	2-3 Replikate positiv	Negativ	Negativ	Negativ	●	Negativ: Es wurde ausreichend cffDNA in den Test eingetragen.
Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	●	Invalide: Ungültiges Ergebnis aufgrund von RT-PCR-Inhibition, Reagenzienversagen bzw. ungeeignetes 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).