

FetoGnost® Kit Control

Gebrauchsanweisung



For research use only



HUFG050



50 Reaktionen (für bis zu 15 Plasmaproben)



ingenetix GmbH
Arsenalstraße 11
1030 Wien, Österreich
T +43 (0)1 36 198 0 198
F +43 (0)1 36 198 0 199
office@ingenetix.com
www.ingenetix.com

Inhaltsverzeichnis

1. Verwendungszweck	3
2. Produktbeschreibung	3
3. Grundprinzip der real-time PCR	4
4. Inhalt, Stabilität und Lagerung	4
5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise	5
7. Grenzen des Verfahrens	5
8. Vorbereitung der Proben	6
8.1. Probennahme und Transport	6
8.2. Plasmagewinnung	6
8.3. DNA-Extraktion aus Plasma	6
8.4. Restriktionsverdau	7
9. Vorbereitung der real-time PCR	7
10. Auswertung der real-time PCR Daten	9
11. Troubleshooting	10
11.1. Kein Signal im FAM, VIC und NED Kanal mit Kontrollen und Probe	10
11.2. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im FAM, VIC und NED Kanal mit Probe	10
11.3. Signale in der Negativkontrolle der Extraktion	10
12. Performance und Leistungsmerkmale	11
12.1. Performance	11
12.1. Analytische Sensitivität - Nachweisgrenze	12
12.2. Linearität	12
12.3. Analytische Spezifität	12
13. Literatur	12
14. Änderungsindex	13

Erklärung der Symbole

 Chargen-Bezeichnung

 Bestell-Nummer

 Ausreichend für "n" Ansätze

 Ätzwirkung, GHS05

 Verwendbar bis

 Hersteller

 Aufbewahrung bei

 Ausrufezeichen, GHS07

HINWEIS AN DEN KÄUFER: BESCHRÄNKTE LIZENZ

Die in diesem Produkt enthaltene MGB-Sonde ist Gegenstand eines oder mehrerer der nachfolgenden Patente aus den USA und den jeweils entsprechenden Patenten außerhalb der USA: 5,801,155 und 6,084,102, und wird unter einer Lizenz der ELITech Group verkauft. Der Erwerb dieses Produkts beinhaltet eine Lizenz zur ausschließlichen Verwendung dieser Produktmenge für die eigene Nutzung des Käufers im Bereich der humanen *in-vitro*-Diagnose (gemäß der anwendbaren FDA- und anderer gesetzlichen Anforderungen) und darf nicht für andere kommerzielle Zwecke, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Umverpackung und Weiterverkauf, verwendet werden.

1. Verwendungszweck

FetoGnost® Kit Control ist ein real-time PCR Test für den Nachweis von zellfreier fetaler DNA (cffDNA) in mütterlichen Plasmaproben von Schwangeren.

Der Test dient ausschließlich für die Validierung geeigneter Extraktionsmethoden für die Aufreinigung von cffDNA aus mütterlichem Plasma.

Dieser Test ist für Frauen aller Altersgruppen ab der Schwangerschaftswoche (SSW) $\geq 11+0$ mit Einling- oder Mehrlingsschwangerschaften geeignet.

Der Test kann sowohl bei einer ersten Schwangerschaft als auch bei Folgeschwangerschaften angewendet werden.

Kontraindikationen:

- Der Test eignet sich nicht für Proben, die vor der SSW $\geq 11+0$ abgenommen wurden.

2. Produktbeschreibung

Bei cffDNA handelt es sich um fragmentiertes genetisches Material des Fetus (<300 bp), das im mütterlichen Blut zirkuliert. Die cffDNA macht nur einen kleinen Teil der gesamten zirkulierenden zellfreien DNA (ccfDNA) aus und steigt von ca. 3% in der frühen auf ca. 12% in der späten Schwangerschaft an. In mütterlichen Plasmaproben aus dem zweiten Trimester kann die Konzentration cffDNA 50–200 Genomequivalente cffDNA/ml Blut erreichen. Geringste Mengen von cffDNA können durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden (Lo et al., 1998).

FetoGnost® Kit Control ermöglicht einen nicht-invasiven Nachweis von cffDNA aus dem extrahierten Plasma Schwangerer mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion. Der Test dient zur Kontrolle, ob genügend fetale DNA im extrahierten mütterlichen Plasma detektierbar ist.

Für diesen Nachweis wird in einem Aliquot des Probeneluats ein Restriktionsverdau durchgeführt, um die mütterliche DNA zu entfernen. Die verdaute DNA Probe wird anschließend mit real-time PCR getestet. Sonden-spezifische Amplifikationskurven in den Fluoreszenzkanälen für VIC, FAM und NED weisen die Amplifikation zweier fetaler Marker nach und ermöglichen zusätzlich eine Kontrolle über einen maternalen Marker.

Bei Analyse der Plasmaproben in Triplikaten und der Kontrollen in Duplikaten können mit dem Inhalt eines Kits 15 Plasmaproben in einem Durchsatz analysiert werden.

Die Probenahme sollte ab der Schwangerschaftswoche (SSW) $\geq 11+0$ erfolgen.

Mit FetoGnost® Kit Control werden drei Gene nachgewiesen:

- **Maternaler Marker:** Nachweis über VIC-markierte Sonde
Der maternale Marker weist einen Abschnitt der mütterlichen DNA nach, der durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten wird. Er darf somit in der verdauten Plasmaprobe nicht nachweisbar sein. Das Fehlen des Markers in der verdauten Plasmaprobe garantiert, dass keine amplifizierbare mütterliche DNA mehr vorhanden ist.
- **Fetaler Marker 1:** Nachweis über FAM-markierte Sonde
- **Fetaler Marker 2:** Nachweis über NED-markierte Sonde
Bei den fetalen Markern 1 und 2 handelt es sich um zwei Gene, die eine Aussage über das Vorhandensein fetaler DNA im Probeneluat erlauben. Diese beiden Marker werden in der DNA mütterlichen Ursprungs durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten - die mütterliche DNA ist somit nicht mehr nachweisbar. In der fetalen DNA werden diese Gene nicht geschnitten. Der fetale Marker 1 muss daher in der verdauten Probe nachweisbar sein. Zusätzlich ist der fetale Marker 2 bei etwa 50% der Feten nachweisbar.

FetoGnost® Kit Control wurde mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific) validiert, eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM, VIC und NED Kanal messen und differenzieren können. Bei Verwendung von PCR-Plattformen, die nicht von ingenetix getestet wurden, wird eine Evaluierung der Multiplex-PCR empfohlen.

3. Grundprinzip der real-time PCR

FetoGnost® Kit Control basiert auf der Multiplex real-time Polymerase-Kettenreaktion. Dazu werden spezifische DNA-Bereiche im humanen Genom amplifiziert und die generierten PCR-Produkte mit Hilfe fluoreszenz-markierter Oligonukleotid-Sonden detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

4. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
FetoGnost® Kit Control Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonden (VIC, FAM, NED) für Detektion von maternalen, fetalen Markern	1 x 250 µl	-15°C bis -25°C
FetoGnost® Kit Control Reaction Mix (weißer Verschluss)	DNA Amplifikationsmix	1 x 750 µl	-15°C bis -25°C, nach erstem Auftauen bei +4°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-15°C bis -25°C
FetoGnost® Kit Control Restriction Enzymes (blauer Verschluss)	Enzyme für Restriktionsverdau	1 x 30 µl	-15°C bis -25°C
FetoGnost® Kit Control Restriction Buffer (blauer Verschluss)	Puffer für Restriktionsverdau	1 x 80 µl	-15°C bis -25°C
FetoGnost Kit Control Positive Control (roter Verschluss)	DNA Positivkontrolle	1 x 200 µl	-15°C bis -25°C

Die Komponenten des FetoGnost® Kit Control sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollten vermieden werden.

FetoGnost® Kit Reaction Mix: Der mitgelieferte DNA Amplifikationsmix ist für zuverlässige, hoch-sensitive real-time PCR ausgelegt. Der Master Mix enthält eine hoch gereinigte rapid hot-start Taq DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und Uracil-N Glycosylase (UNG) um eine Amplicon Verschleppung zu verhindern, ROX™ Farbstoff als passive Referenz und Pufferkomponenten – Additive optimiert auf den Umgang mit RT-PCR Inhibitoren.

5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten
- Aerosol-resistente Pipettenspitzen
- Geeignete Reagenzien und Laborgeräte für Extraktion von cffDNA (z.B. bei manueller Extraktion empfohlen: QIAamp® DSP Virus Kit oder QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, (QIAGEN) oder ein automatisiertes Extraktionsverfahren.
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße mit zugehörigem (optischen) Verschlussmaterial
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM, VIC und NED Kanal messen und differenzieren kann

6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

- Dieses Produkt sollte nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR Verfahren geschult wurde.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Verwendung von DNase/RNase-freien, aerosol-resistenten Pipettenspitzen und puderfreien Einweghandschuhen ist erforderlich.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie Laborhandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation zu verwenden. Die Geräte und Materialien müssen diesen Arbeitsbereichen zugeordnet sein. Der Arbeitsablauf muss von Prä- zu Post-PCR im Labor verlaufen.
- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach der Pipettierung der Proben und der Positivkontrolle sollten die Handschuhe gewechselt werden.
- Die Lagerung und Extraktion von positivem Material (Proben, Kontrollen und Amplicons) sollte separat von allen anderen Reagenzien erfolgen. Die Zugabe zum Amplifikationsmix soll in einem räumlich getrennten Arbeitsbereich erfolgen.
- Die Qualität der DNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete DNA-Extraktionssystem keine Kontaminationen verursacht und für die Isolierung kurzer DNA-Fragmente geeignet ist.
- Kontaminationen von Geräten und Materialien mit DNA/RNA, Nukleasen oder Amplifikationsprodukten sind durch gute Laborpraxis zu vermeiden. Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse müssen Positiv- und Negativkontrollen mit einbezogen werden, um falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können.
Eine Auswertung der Ergebnisse ist nur bei gleichzeitigem Vorliegen der Ergebnisse von Negativ- und Positivkontrollen möglich, um falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können.
- Komponenten sollten vor Licht geschützt werden und wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden.
- Bitte beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.

7. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung (abhängig vom Blutentnahmeröhrchen) und Aufarbeitung der Proben gewährleistet.
- Zellfreie fetale DNA befindet sich in sehr niedriger Konzentration im mütterlichen Plasma, daher ist die Extraktion ein kritischer Schritt in der Analyse. Es muss vom Anwender gewährleistet werden, dass mit der gewählten Extraktionsmethode genügend fetale DNA gewonnen werden kann.
- Der Test eignet sich nicht für Proben, die vor der SSW 11+0 abgenommen wurden.
- Der Test wurde **bisher** nur mit humanen Plasmaproben validiert, welche mit EDTA-Röhrchen (mit oder ohne Trenngel) abgenommen wurden.

8. Vorbereitung der Proben

Der FetoGnost® Kit Control wurde für den Nachweis zellfreier fetaler DNA validiert, die aus mütterlichem Plasma gewonnen wird. Die primäre klinische Probe ist Vollblut, aus welchem das Plasma nach Standardverfahren, siehe unten, abgetrennt wird. Bitte berücksichtigen Sie auch die Angaben der ISO 20186-3: 2019 "Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 3 Isolated circulating cell free DNA from plasma".

8.1. Probennahme und Transport

- Die Temperatur und Dauer der Probenlagerung sollten dokumentiert werden. Die Probe müssen zeitnahe an das Untersuchungslabor gesendet werden.
- Blutproben ab SSW $\geq 11+0$ können mit verschiedenen Abnahmesystemen abgenommen werden:
 - EDTA Blutentnahmeröhrchen mit oder ohne Trenngel (empfohlen)
Proben in EDTA Blutentnahmeröhrchen mit Trenngel dürfen nicht gekühlt werden, da das Trenngel dadurch brüchig wird.
 - Bei Verwendung von speziellen Blutentnahmeröhrchen für Stabilisierung zellfreier-DNA sollte dies entsprechend validiert werden.

8.2. Plasmagewinnung

Das Plasma muss innerhalb von 6 Tagen nach der Probennahme abgetrennt werden (Clausen et al., 2013; Müller et al., 2011).

8.3. DNA-Extraktion aus Plasma

- Plasmaproben können bei ca. -20°C bis zur DNA-Extraktion gelagert werden (Londero et al., 2019).
 - Bitte beachten Sie, dass pro Extraktions-Batch eine **Extraktions Negativ Kontrolle** (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mitgeführt werden muss, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit humaner DNA während der Extraktion ausschließen zu können.
 - Wichtig: Für die Analyse darf **kein Plasma aus einer hämolysierten Blutprobe** verwendet werden. Vor der Nukleinsäure Extraktion muss eine visuelle Prüfung auf Hämolyse nach Zentrifugation der Probe stattfinden. Im Falle einer hämolysierten Probe muss eine erneute Probenentnahme stattfinden.
 - Die DNA Extraktion kann manuell (z.B. mit den QIAamp® DSP Virus Kit oder QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN) oder mit automatisierten Extraktionsverfahren, die für die Isolierung kurzer DNA-Fragmente geeignet sind, erfolgen (Legler et al., 2007, Yang et al., 2019).
 - **Extrahieren Sie je 1-2 ml Plasma pro Probe** laut Anleitung des Herstellers und eluieren sie die DNA in bis zu 100 μl . Bei Proben, die vor der 16. SSW abgenommen wurden, wird eine Extraktion von mindestens 2 ml Blut empfohlen. Ab der 16. SSW ist eine Probenmenge von 0,5 ml Blut eluiert in bis zu 100 μl ausreichend.
- **Elution:** Das Elutionsvolumen sollte so gewählt werden, dass 10 μl Eluat mindestens 100 μl Plasma entsprechen.
- Extraktion von 1-2 ml Plasma: Elution in $\leq 100 \mu\text{l}$.
 - Ab der 16. SSW ist eine Probenmenge von 0,5 ml Plasma eluiert in bis zu 100 μl ausreichend.
- DNA-Proben können bei ca. -20°C oder einige Stunden bei ca. $+4^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse gelagert werden

8.4. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau (RE) wird mit 35 µl des jeweiligen Eluats und mit der FetoGnost® Kit Control Positiv Kontrolle (roter Deckel) durchgeführt.

Pipettierschema Restriktionsverdau

		Pro Reaktion	Gesamt
Puffer + Enzym Mix	Restriction Buffer (blauer Deckel)	4,0 µl	
	Restriction Enzymes (blauer Deckel)	1,5 µl	
	Gesamtvolumen	5,5 µl	
Ansetzten des Restriktionsverdau	Buffer + Enzyme Mix	5,5 µl	
	Probe	35,0 µl	
	Gesamtvolumen	40,5 µl	

Restriktionsverdau: Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren den Reaktionsverdau gut mischen (WICHTIG!) und anschließend bei 37°C für 1 Stunde in einem Thermoblock mit Heizdeckel (z. B. PCR-Gerät) inkubieren.

Enzym und Puffer reichen für 20 Restriktionsverdau. Bei Analyse der Plasmaproben in Triplikaten und der Kontrollen in Duplikaten können mit dem Inhalt eines Kits 15 Plasmaproben in einem Durchsatz analysiert werden.

9. Vorbereitung der real-time PCR

Stellen Sie sicher, dass eine RE-verdaute Extraktions Negativ Kontrolle, eine RE-verdaute Positiv Kontrolle (FetoGnost® Kit Control Positive Control, roter Verschluss), oder eine RE-verdaute Extraktions Positiv Kontrolle (optional) pro PCR Lauf mitgeführt werden.

- **Verdaute Untersuchungsproben** sollten in Triplikaten analysiert werden.
→ Setzen Sie 10 µl verdaute Probe ein.
- **Negativkontrolle der DNA-Extraktion** sollte in Duplikaten analysiert werden.
→ Setzen Sie 10 µl der verdauten Negativkontrolle der DNA-Extraktion ein.
- **Positivkontrolle** sollte in Duplikaten analysiert werden.
→ Setzen Sie 10 µl der verdauten FetoGnost® Kit Control Positive Control ein.

Pipettierschema PCR

		Pro Reaktion	Gesamt
Ansetzen des PCR Master Mixes (gut durchmischen)	FetoGnost® Kit Control Reaction Mix	15,0 µl	
	FetoGnost® Kit Control Assay Mix	5,0 µl	
	Gesamtvolumen Master Mix	20,0 µl	
Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	20,0 µl	
	Probe	10,0 µl	
	Gesamtvolumen	30,0 µl	

- Bereiten Sie den Master Mix entsprechend der Probenanzahl vor, berücksichtigen Sie dabei ein zusätzliches Volumen von ca. 10%, um eine ausreichende Menge an Master Mix sicherzustellen.
- Pipettieren Sie pro Probe jeweils 20 µl des vorbereiteten Master Mixes in das Well der optischen Reaktionsplatte.
- Geben Sie anschließend 10 µl der verdauten Probe oder der Kontrollen zu. Pipettieren Sie die Positivkontrolle zum Schluss.
- Verschließen Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Verschlussmaterial.
- Vortexen Sie die verschlossene Platte für ein 1-2 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz die Platte.

Programmierung des Temperaturprofils

Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Auswahl der Detektionskanäle: Maternaler Marker VIC-NONE
 Fetaler Marker 1 FAM-NONE
 Fetaler Marker 2 NED-NONE

Referenzfarbstoff, falls nötig: ROX (z.B. für ABI® 7500, QuantStudio™ 5/7)

Probenvolumen: 30 µl

Temperaturprofil: Ramp speed: Ohne "fast cycling" Parameter für ABI® 7500 Instrument oder QuantStudio™ 5/7

Program 1	Program 2	Program 3
Cycles: 1 Analysis: None UNG Incubation*	Cycles: 1 Analysis: None Polymerase Activation	Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60°
50°C 2 min	95°C 5 min	95°C 5 sec 60°C 1 min

*) UNG (Uracil-N-Glycosylase) ist Bestandteil des FetoGnost® Kit Control Reaction Mix wie auch dNTPs mit dUTP zur Verhinderung der Verschleppung von Amplicons.

10. Auswertung der real-time PCR Daten

Reaktionen mit positiven Cq-Werten werden positiv gewertet, jene mit negativen oder $Cq \geq 45$ (Cut-off) als negativ (Quantification cycle (Cq) = Cycle threshold (Ct) = Crossing point (Cp)).

Wichtig: Überprüfen Sie neben den Cq-Werten auch die Amplifikationskurven und passen Sie gegebenenfalls den Threshold an. Die Proben sollten sowohl in der logarithmischen als auch linearen Ansicht überprüft und mit der Negativkontrolle verglichen werden.

Die Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben sollte erst durchgeführt werden, nachdem die Positiv- und Negativkontrollen untersucht und für valid befunden worden sind. Wenn die Resultate der Kontrollen nicht valid sind, können die Probenergebnisse nicht interpretiert werden.

Maternaler Marker (Nachweis über VIC-markierte Sonde):

Verdaute Plasmaprobe: Der maternale Marker weist einen Abschnitt der mütterlichen DNA nach, der durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten wird. Er darf somit in der verdauten Plasmaprobe nicht bzw. kaum nachweisbar sein.

Das Fehlen des maternalen Markers in der verdauten Plasmaprobe validiert den Restriktionsverdau und garantiert, dass keine amplifizierbare mütterliche DNA mehr vorhanden ist.

Verdaute FetoGnost® Kit Control Positive Control: Der maternale Marker in der Positivkontrolle wird durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten und darf nicht bzw. kaum nachweisbar sein. Eine kleine nachgewiesene Restmenge ist valid, der maternale Marker sollte jedoch einen Shift der Cq-Werte >5 im Vergleich zum fetalen Marker 2 aufweisen.

Zur Information: In der unverdauten Positivkontrolle muss der maternale Marker nachweisbar sein.

Fetaler Marker 1 (Nachweis über FAM-markierte Sonde) und **Fetaler Marker 2** (Nachweis über NED-markierte Sonde):

Verdaute Plasmaprobe: Bei den fetalen Markern 1 und 2 handelt es sich um zwei Gene, deren Nachweis eine Aussage über das Vorhandensein fetaler DNA im Probeneluat erlaubt. Diese beiden Marker werden in der DNA mütterlichen Ursprungs durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten - die mütterliche DNA ist somit nicht mehr nachweisbar. In der fetalen DNA werden diese Gene nicht geschnitten. Der fetale Marker 1 muss daher in der verdauten Probe nachweisbar sein. Zusätzlich ist der fetale Marker 2 bei etwa 50% der Feten nachweisbar.

Verdaute FetoGnost® Kit Control Positive Control: Der fetale Marker 1 in der Positivkontrolle wird durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten und darf nicht bzw. kaum nachweisbar sein. Eine kleine nachgewiesene Restmenge ist valid, der fetale Marker 1 sollte jedoch einen Shift der Cq-Werte >5 im Vergleich zum fetalen Marker 2 aufweisen. Der fetale Marker 2 in der Positivkontrolle muss nachweisbar sein, da er durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme nicht geschnitten wird. Siehe auch Abbildung 1.

Für eine valide Auswertung müssen folgende Kriterien erfüllt werden:

Target (Detektionskanal)	Extraktions Negativ Kontrolle verdaut (Duplikate)	Positiv Kontrolle verdaut (Duplikate)	Plasmaprobe verdaut (Triplikate)
VIC (Maternaler Marker)	Negativ	Negativ/schwach positiv	Negativ
FAM (Fetaler Marker 1)	Negativ	Negativ/schwach positiv	Positiv
NED (Fetaler Marker 2)	Negativ	Positiv	Positiv (ca. 50 % der Föten) oder negativ

Im Fall von invaliden Daten muss die Analyse mit der restlichen oder einer frisch extrahierten DNA-Probe wiederholt werden (siehe 7. Troubleshooting).

11. Troubleshooting

11.1. Kein Signal im FAM, VIC und NED Kanal mit Kontrollen und Probe

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils oder fehlerhafte Einstellung der Detektionskanäle am real-time PCR Instrument.
- Vergleichen Sie das Temperaturprofil und die Einstellung der Detektionskanäle mit den Angaben im Protokoll.
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
- Überprüfen Sie die Pipettierschritte an Hand des Schemas und wiederholen Sie die PCR falls nötig.

11.2. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im FAM, VIC und NED Kanal mit Probe

- Falsche Einstellung der Detektionskanäle mit der Probe.
- Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
- PCR Inhibierung liegt vor.
 - DNA Extraktion ist fehlgeschlagen.
 - Die extrahierte Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion zugegeben.
 - Keine ausreichende Menge an fetaler DNA in Probe vorhanden.
- Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine geeignete DNA-Extraktionsmethode verwendet wurde und überprüfen Sie die Arbeitsschritte der DNA-Extraktion.

11.3. Signale in der Negativkontrolle der Extraktion

- Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor.
- Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und PCR unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
- Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

12. Performance und Leistungsmerkmale

12.1. Performance

Abbildung 1 zeigt die Performance von FetoGnost® Kit Control mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific).

Abbildung 2 zeigt ein Beispiel für die Analyse von mütterlichem Plasma positiv mit fetaler RHD cffDNA mit FetoGnost® Kit Control (verdaute DNA Probe) und FetoGnost® Kit RHD (unverdaute DNA Probe) mit dem QuantStudio™ 7 Pro (Thermo Fisher Scientific).

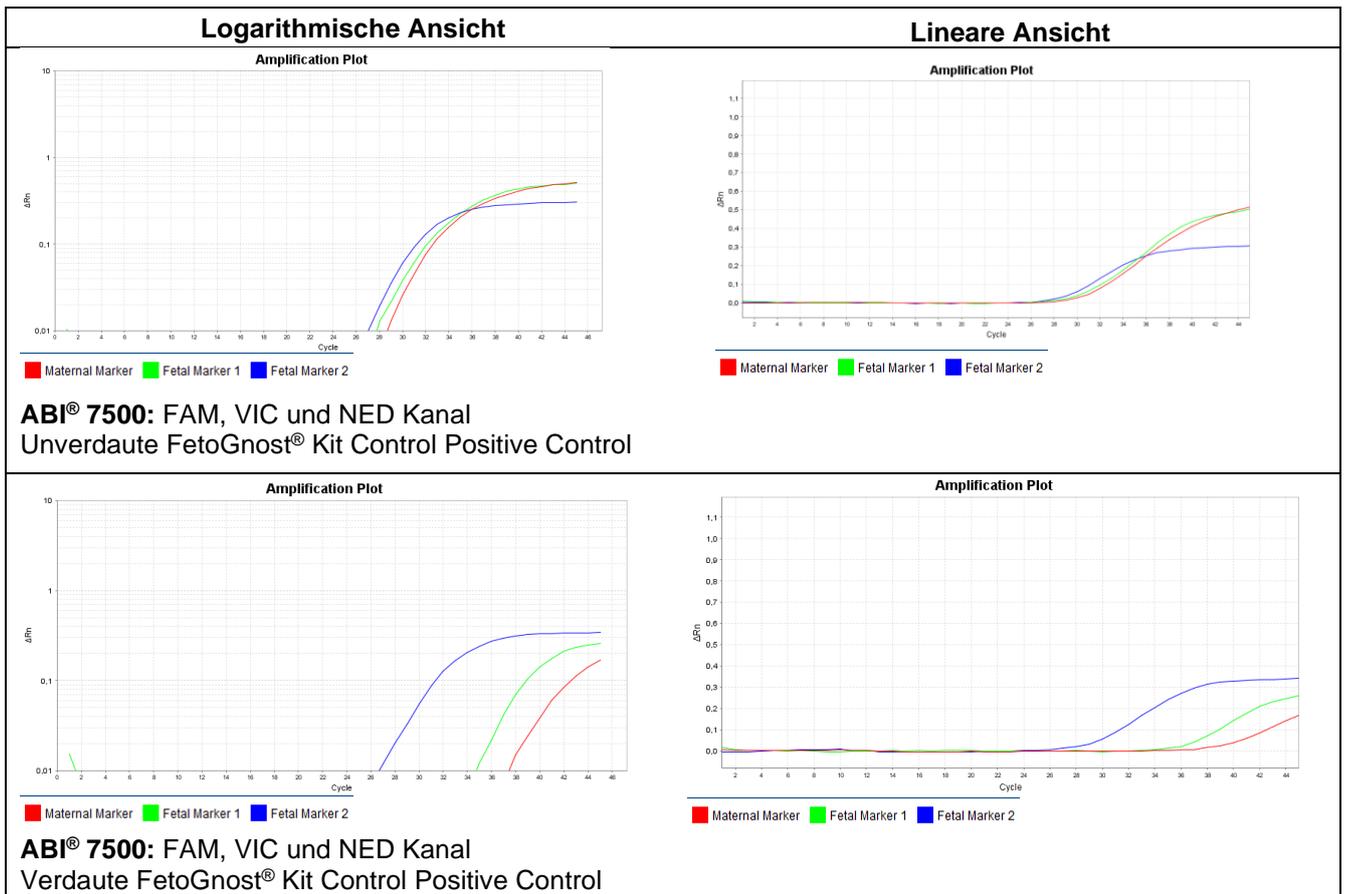


Abbildung 1

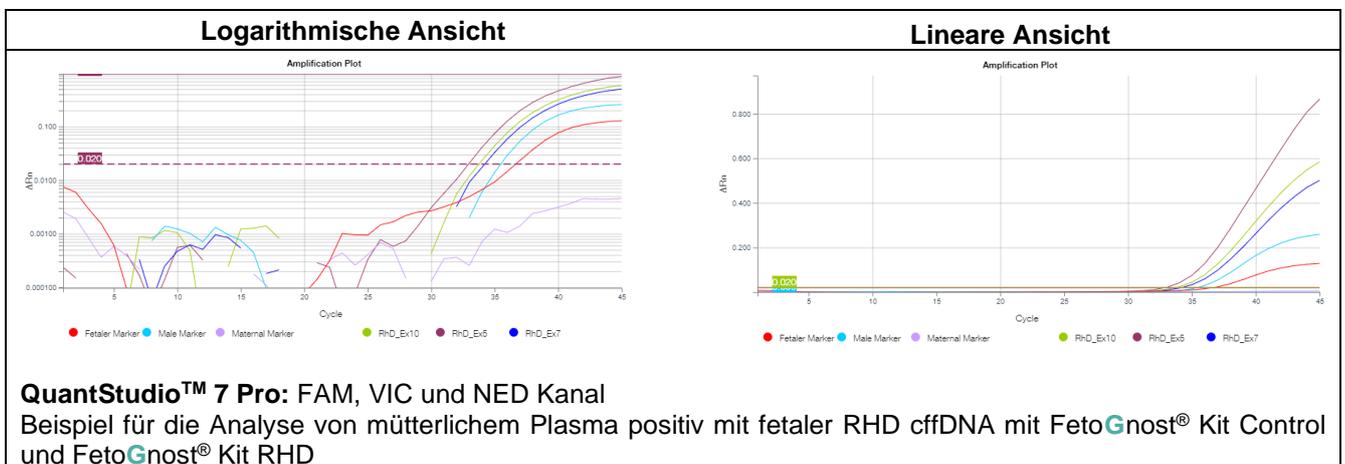


Abbildung 2

12.1. Analytische Sensitivität - Nachweisgrenze

FetoGnost® Kit Control wurde mit genomischer humaner DNA und mit 10-fach Verdünnungsserien von Plasmiden, welche Teile der drei Marker DNAs repräsentieren, getestet. Es wurde die Nachweisgrenze (LoD95: Anzahl an Target Kopien, welche in 95% der Fälle positiv detektiert werden) ermittelt.

Maternaler Marker: Es konnten in 50% mindestens 2 Target Kopien/Reaktion nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze LoD95 beträgt 15 Kopien/Reaktion.

Fetaler Marker 1: Es konnten in 50% mindestens 3 Target Kopien/Reaktion nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze LoD95 beträgt 20 Kopien/Reaktion.

Fetaler Marker 2: Es konnten in 50% mindestens 8 Target Kopien/Reaktion nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze LoD95 beträgt 8 Kopien/Reaktion.

12.2. Linearität

Die Linearität wurde mit einer 10-fachen Verdünnungsserie der Plasmide ermittelt.

Maternaler Marker: Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von - 3,4 und einem Korrelationskoeffizienten R^2 von $> 0,99$.

Fetaler Marker 1: Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von - 3,3 und einem Korrelationskoeffizienten R^2 von $> 0,99$.

Fetaler Marker 2: Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von - 3,3 und einem Korrelationskoeffizienten R^2 von $> 0,99$.

12.3. Analytische Spezifität

Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Primer und Sonden wurden auf potentielle Homologien zu derzeit publizierten Sequenzen untersucht. Diese Datenbankanalyse validierte den Nachweis der drei Marker.

13. Literatur

- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. 2005. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. Clin Chem. 51(2):312-20.
- Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, Krog GR, Nielsen LK, et al. 2013. Pre-Analytical Conditions in Non-Invasive Prenatal Testing of Cell-Free Fetal *RHD*. PLOS ONE 8(10):
- Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot CE. 2007. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. Prenat Diagn. 27(9):824-9.
- Londero D, Stampalija T, Bolzicco D, et al. 2019. Fetal RHD detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma: validation of a diagnostic kit using automatic extraction and frozen DNA. Transfus Med. 29(6):408-414.
- Müller, S.P., Bartels, I., Stein, W., Emons, G., Gutensohn, K. and Legler, T.J. 2011. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. Prenat Diagn, 31: 1300-1304.
- Yang, Huiqin, Llewellyn, Alexis, Walker, Ruth et al. (4 more authors). 2019. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. BMC Medicine. p. 17-37.
- ISO 20186-3: 2019

14. Änderungsindex

Änderung	Datum	Beschreibung
V.1.4d	16.06.2021	Siehe Punkt 10. Auswertung der real-time PCR Daten und Abbildung 1. Positivkontrolle wurde geändert: Der fetale Marker 1 in der Positivkontrolle wird durch die im Kit enthaltenen Restriktionsenzyme geschnitten und sollte daher einen Shift der Cq-Werte >5 im Vergleich zum fetalen Marker 2 aufweisen.