

# FetoGnost<sup>®</sup> Kit RHD

## Gebrauchsanweisung



CE

IVD

*In-vitro*-Diagnostikum

REF

HUFG100



100 (für bis zu 30 Plasmaproben)

REF

HUFG500



500 (für bis zu 150 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. Hintergrundinformation .....	4
4. Grundprinzip der real-time PCR .....	4
5. Inhalt, Stabilität und Lagerung .....	5
6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte .....	5
7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise .....	5
8. Grenzen des Verfahrens .....	6
9. Vorbereitung der Proben .....	7
9.1. Probennahme und Transport .....	7
9.2. Plasmagewinnung .....	7
9.3. DNA-Extraktion aus Plasma .....	7
10. Vorbereitung der real-time PCR .....	9
10.1. Pipettierschema .....	9
10.2. Programmierung des Temperaturprofils .....	9
11. Auswertung der real-time PCR Daten .....	10
12. Troubleshooting .....	11
12.1. Kein Signal im FAM, VIC, NED Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe .....	11
12.2. RHD-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion .....	11
12.3. IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle .....	11
12.4. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im Cy5 Kanal mit Probe .....	11
13. Testperformance und Leistungsmerkmale .....	12
13.1. Testperformance .....	12
13.2. Analytische Sensitivität - Nachweisgrenze .....	12
13.3. Linearität und dynamischer Messbereich .....	13
13.4. Analytische Spezifität und Kreuzreaktivität .....	13
13.5. Inter-Assay-Präzision .....	13
13.6. Intra-Assay-Präzision .....	14
13.7. Inter-Lot-Präzision .....	14
13.8. Validierung mit Plasma .....	14
13.9. Testung des WHO-Referenzmaterials .....	15
13.10. Klinische Sensitivität .....	15
14. Literatur .....	18
15. Änderungsindex .....	18

## Erklärung der Symbole

 <b>LOT</b>	Chargen-Bezeichnung		Verwendbar bis
 <b>REF</b>	Bestell-Nummer		Hersteller
	Ausreichend für "n" Ansätze		Aufbewahrung bei
 <b>CE</b>	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für <i>in-vitro</i> Diagnostika	 <b>IVD</b>	<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Ätzwirkung, GHS05		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 RHD ist ein nicht automatischer *in-vitro* Diagnostik real-time PCR Test für den qualitativen Nachweis fetaler RHD DNA aus mütterlichem Plasma nicht-immunisierter RhD negativer Frauen (nicht-invasive pränatale Bestimmung des fetalen RHD-Status, NIPT-RHD).

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. Er ermöglicht eine gezielte Anti-D-Prophylaxe bei RhD-negativen Schwangeren ohne Anti-D Alloimmunisierung.

Kontraindikationen:

- Schwangere mit Anti-D Alloimmunisierung. Der Immunisierungsstatus der Schwangeren sollte daher vor Testbeginn bekannt sein.
- Der Test eignet sich nicht für Proben, die vor der SSW 11+0 abgenommen wurden. Auf dem Befund ist auf die beschränkte Leistungsfähigkeit des Tests vor der SSW  $\geq 11+0$  hinzuweisen.
- Der Test ist nicht für die Rhesus-D-Bestimmung beim Transfusionsempfänger und Blutspendern vorgesehen.

## 2. Produktbeschreibung

FetoGnost® Kit RHD ermöglicht eine schnelle, sensitive und nicht-invasive Detektion des fetalen Rhesusfaktor D (RHD) Gens aus dem extrahierten Plasma von RhD-negativen Schwangeren mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion. Sonden-spezifische Amplifikationskurven im Fluoreszenzkanal für VIC, FAM und NED weisen die Amplifikation der Exons 5, 7 und 10 des RHD Gens von RHD-positiven Feten nach. Die Interne Positivkontrolle (IPC) wird im Cy5 Kanal detektiert, überprüft die Integrität der Kit Reagenzien und dient als Kontrolle der DNA-Extraktion und möglicher real-time PCR Inhibition. Das Target für die IPC wird während der Probenextraktion zugegeben.

Bei einer voll belegten 96-Well Reaktionsplatte können 30 Plasmaproben inklusive Kontrollen in Triplikaten analysiert werden.

Das sensitive und robuste Multiplex Testformat des FetoGnost® Kit RHD für die Detektion von drei Exons des RHD Gens in Triplikaten minimiert falsch-negative Ergebnisse.

FetoGnost® Kit RHD wurde mit dem Applied Biosystems 7500® Instrument und QuantStudio™ 7 Pro (Thermo Fisher Scientific) validiert (Fast Cycle Parameter werden nicht unterstützt), ist aber auch mit anderen real-time PCR Geräten kompatibel, die Fluoreszenz im FAM, VIC, NED und Cy5 Kanal messen und differenzieren können.

Bei Verwendung von PCR-Plattformen, die nicht von ingenetix getestet wurden, wird eine Evaluierung der Multiplex-PCR empfohlen.

Es wird empfohlen, vor Verwendung des FetoGnost® Kit RHD eine Evaluierung der Extraktion fetaler DNA aus mütterlichem Plasma durchzuführen, um zu gewährleisten, dass mit der gewählten Extraktionsmethode genügend fetale DNA gewonnen werden kann. Der Nachweis fetaler DNA kann mit dem FetoGnost® Kit Control (Bestell-Nr. HUGG050, 50 Reaktionen für bis zu 30 Plasmaproben) evaluiert werden.

Fragmentierte DNA (<300 bp) fetalen Ursprungs macht nur einen kleinen Teil der zirkulierenden zellfreien DNA (ccfDNA) aus, die im Plasma der Mutter vorkommt und während der Schwangerschaft zunimmt. In mütterlichen Plasmaproben von Schwangeren aus dem zweiten Trimester kann die Konzentration cffDNA 50-200 Genomequivalente cffDNA/ml Blut erreichen (Birch et al., 2005).

Bitte richten Sie sich bei der Evaluierung des FetoGnost® Kit RHD auch nach den aktuellen offiziellen und länderspezifischen Empfehlungen oder Richtlinien (z.B. Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DGTI).

Die Probenentnahme für die Detektion des fetalen RHD Gens sollte ab der SSW  $\geq 11+0$  erfolgen.

### 3. Hintergrundinformation

Rhesusfaktor D (RhD) oder RhD-Antigen ist das häufigste der fünf Rhesus Antigene (C, c, D, E und e) von insgesamt 54 Antigenen auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen. Das dominante RHD Gen bestimmt, ob ein Mensch RhD-positiv oder –negativ ist. Zirka 85% der europäischen Bevölkerung, ungefähr 95% in Subsahara Afrika und mehr als 99.5% der Bevölkerung in Ostasien sind RhD-positiv. Beim Großteil RhD-negativer Kaukasier liegt eine komplette Deletion des RHD Gens vor. In anderen Populationen wie Asiaten, Japaner und Schwarzafrikaner, kann der negative Phänotyp mit kleineren genetischen Veränderungen (z.B. Punktmutationen, Insertionen und Gen-Rearrangements) assoziiert sein, die ein nicht-funktionales RHD Gen zur Folge haben.

Die Vorhersage des fetalen RhD-Status ist für die Verhinderung des Morbus haemolyticus neonatorum von großer Bedeutung, da eine RhD-negative Mutter auf einen RhD-positiven Fetus sensibilisiert wird und IgG Anti-D Antikörper bildet.

### 4. Grundprinzip der real-time PCR

FetoGnost® Kit RHD basiert auf der Multiplex real-time Polymerase-Kettenreaktion mittels 5'-Nuklease-Assay Technologie. Dazu werden spezifische DNA-Bereiche im RHD-Gen amplifiziert und die generierten PCR-Produkte gleichzeitig mit Hilfe fluoreszenz-markierten Oligonukleotid-Sonden (VIC, FAM und NED) detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Während der PCR werden Primer mittels *Taq*-Polymerase verlängert und die mit dem Target hybridisierten Sonden durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase gespalten. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz der Sonde mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird im real-time PCR Gerät im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus bei verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen erfasst.

Der Ct-Wert (Cycle threshold, Ct = Quantification cycle, Cq = Crossing point, Cp) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

## 5. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	HUFG100	HUFG500	Lagerung
FetoGnost® Kit RHD Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonden (VIC, FAM, NED, Cy5 markiert) für Detektion von RHD Exon 5, 7, 10 und IPC	1 x 500 µl	5 x 500 µl	-15°C bis -25°C
FetoGnost® Kit RHD IPC Target (oranger Verschluss)	Target für IPC (internes DNA Positivkontrollsystem, 60.000 Kopien/µl)	1 x 200 µl	5 x 200 µl	-15°C bis -25°C
FetoGnost® Kit RHD Reaction Mix (weißer Verschluss)	DNA Amplifikationsmix	2 x 750 µl	5 x 1500 µl	<b>-15°C bis -25°C, nach erstem Auftauen bei +4</b>
FetoGnost® Kit RHD Positive Control (roter Verschluss)	DNA Positivkontrolle (Mischung von vier DNA Target Sequenzen für Exon 5, 7 und 10, jeweils ca. 1.000 Targetkopien/µl)	1 x 100 µl	1 x 500 µl	-15°C bis -25°C

Die Komponenten des FetoGnost® Kit RHD sind nach Anbruch bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Schützen Sie die Komponenten des Kits vor Licht.

**FetoGnost® Kit RHD 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.

## 6. 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, NED und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann

## 7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

- *In vitro*-Diagnostikum: Dieses Produkt sollte nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose 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.
- **Vorsicht:** Das DNA IPC Target wird in Stabilizer aufbewahrt, welcher DTT/Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält (siehe MSDS, [www.ingenetix.com](http://www.ingenetix.com)).

## 8. 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.
- Es besteht das Restrisiko, dass negative Testergebnisse einen RHD-positiven Fetus nicht ausschließen, da durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder fetale DNA im mütterlichen Plasma unterhalb der Nachweisgrenze die Testergebnisse beeinträchtigt werden können. PCR Inhibitoren können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.
- Seltene klinische Subtypen bzw. der weak D Genotyp können in einzelnen Exons zur Nichtdetektion des entsprechenden Exons führen, was jedoch auf die Gesamtanalyse basierend auf der Multiplex-Detektion von drei Exons keinen Einfluss hat.
- Bitte beachten Sie, dass in seltenen Fällen ein RhD-negativer Phänotyp mit einer RHD Gen Inaktivierung durch kleinere genetische Variationen (z.B. Punktmutationen, Insertionen, Gen-Rearrangements) assoziiert sein kann und deshalb eine serologisch RhD-negative Mutter bzw. der Fetus oder ein weak D Genotyp der Mutter bzw. des Fetus positiv auf einzelne Exons des RHD Gens getestet wird.
- Der fetale Haplotyp kann auch einer stummen RHD Variante entsprechen.
- Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

## 9. Vorbereitung der Proben

Der FetoGnost® Kit RHD 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".

### 9.1. 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.

### 9.2. Plasmagewinnung

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

### 9.3. DNA-Extraktion aus Plasma

- Plasmaproben können bei ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur DNA-Extraktion gelagert werden (Londero et al., 2019).
- Bei einer voll belegten 96-Well Reaktionsplatte können 30 Plasmaproben inklusive Kontrollen in Triplikaten analysiert werden. Bitte beachten Sie, dass pro Extraktions-Batch eine **Extraktions Negativ Kontrolle** (z.B. Extraktion von RHD-negativ getesteten Plasma oder Wasser anstelle von Probenmaterial) mitgeführt werden muss, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit RHD-positiver 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  $\mu\text{l}$ . 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  $\mu\text{l}$  ausreichend.

→ Das **FetoGnost® Kit IPC Target** wird während der Extraktion zugesetzt (Extraktionskontrolle und Kontrolle auf potentielle PCR-Inhibierung):

Geben Sie 1  $\mu\text{l}$  FetoGnost® Kit IPC Target zur Plasmaprobe, nachdem der Lysepuffer zugegeben wurde. Bei Verwendung eines automatisierten Extraktionsverfahrens muss 1  $\mu\text{l}$  FetoGnost® Kit IPC Target pro Probe zur Menge an Lysepuffer zugegeben werden. Das IPC Target im Lysepuffer bleibt stabil.

Es muss durch eine vorangegangene Evaluierung des Extraktionssystems sichergestellt worden sein, dass die IPC einen Cq-Wert von ca. 28 -33 erreicht. Falls die IPC frühere Cq-Werte aufweist, muss die Menge des Targets entsprechend verringert werden.

**Achtung:** Das FetoGnost® Kit IPC Target darf nicht direkt zum Probenmaterial pipettiert werden, sondern muss zum Lysepuffer bzw. zur Probe in Lysepuffer zugegeben werden.

- **Elution:** Das Elutionsvolumen sollte so gewählt werden, dass 10 µl Eluat mindestens 100 µl Plasma entsprechen.
- Extraktion von 1-2 ml Plasma: Elution in ≤100 µl.
  - Ab der 16. SSW ist eine Probenmenge von 0,5 ml Blut eluiert in bis zu 100 µl ausreichend.
- DNA-Proben können bei ca. -20°C oder einige Stunden bei ca. +4°C bis zur Analyse gelagert werden



## 10. Vorbereitung der real-time PCR

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

**Jede Probe und alle Kontrollen müssen in Triplikaten mit je 10 µl Probe/Well analysiert werden.**

### 10.1. Pipettierschema

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

- 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 extrahierten 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.

### 10.2. 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:**

RHD Ex5	VIC-NONE
RHD Ex7	FAM-NONE
RHD Ex10	NED-NONE
IPC	Cy5-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

<b>Program 1</b>	<b>Program 2</b>	<b>Program 3</b>
Cycles: 1 Analysis: None <b>UNG Incubation*</b>	Cycles: 1 Analysis: None <b>Polymerase Activation</b>	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 Reaction Mix wie auch dNTPs mit dUTP zur Verhinderung der Verschleppung von Amplicons.

## 11. 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.

**Tabelle 1** Kriterien für valide Kontrollen

Kontrollen (in Triplikaten)	VIC Kanal Exon 5	FAM Kanal Exon 7	NED Kanal Exon 10	Cy5 Kanal IPC	Interpretation	Aktion
Positivkontrolle	Cq<31	Cq<31	Cq<31	Negativ	Valid	-
Positivkontrolle	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1.
NTC	Negativ	Negativ	Negativ	28-33	Valid	-
NTC	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1.

NTC = Negativkontrolle der Extraktion

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 Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

**Tabelle 2** Interpretation der Untersuchungsproben

Probe (in Triplikaten)	VIC Kanal Exon 5	FAM Kanal Exon 7	NED Kanal Exon 10	Cy5 Kanal* IPC	Interpretation des fetalen RHD Genotyps
Probe	Mindestens 4 von 9 Replikaten positiv			Positiv	I. Positiv
Probe	3 von 9 Replikaten positiv			Positiv	II. Nicht beurteilbar, WH
Probe	Sehr frühe Cq Werte im Vergleich zu anderen Ergebnissen			Positiv	III. Nicht beurteilbar, eventuell Mutter RHD Variante
Probe	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	IV. Partial RHD D
Probe	Maximal 2 von 9 Replikaten positiv			Positiv	V. Negativ
Probe	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	VI. Invalid, siehe 12.4.

\*Die IPC Cq-Werte im PCR-Lauf sollten vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Cq-Werte kann auf eine partielle Inhibierung der PCR Reaktion hindeuten.

- **I. RHD-positiver Fetus:** Mindestens 4 der 9 Replikate sind positiv. Je nach Fortschritt der Schwangerschaft sind Cq-Werte zwischen 28-40 je nach SSW zu erwarten. Der fetale Haplotyp kann auch einer stummen RHD Variante entsprechen. Falls nur ein oder zwei Exons amplifiziert werden, könnte ein fetaler partial D RHD Genotyp vermutet werden, oder es liegt eine zu geringe Menge an cff DNA vor.
- **II. RHD-Status des Fetus nicht beurteilbar:** Falls nur maximal 3 der 9 Replikate positiv waren, kann der fetale RHD Genotyp nicht bestimmt werden und die Analyse sollte wiederholt werden.
- **III. RHD-Status des Fetus nicht beurteilbar:** Falls Cq-Werte im Bereich der Positivkontrollen vorliegen, wurde entweder fetale RHD DNA oder mütterliche RHD DNA (Mutter mit normal oder schwach exprimierten D Antigen oder stumme Variante des RHD Gens) nachgewiesen. In diesem Fall kann der fetale RHD Genotyp nicht bestimmt werden.
- **IV. Partial D RHD Genotyp.** Bei RHD-CE-D-Hybridgenen der Mutter oder des Kindes wie zum Beispiel RHD-CE (2-9)-D, RHD-CE (3-9)-D, RHD-CE (3-7)-D, RHD-CE (4-7)-D wird ein Abschnitt von RHD durch den entsprechenden Abschnitt von RHCE ersetzt. Im Falle von RHD-CE-D-Hybridgenen ist nur Exon 10 positiv.
- **V. RHD-negativer Fetus:** Exons 5, 7 und 10 sind nicht nachweisbar (mind. 7 der 9 Replikate negativ).
- **VI. Im Fall von invaliden Daten:** Siehe 12. Troubleshooting.

## 12. Troubleshooting

### 12.1. Kein Signal im FAM, VIC, NED Kanal und Cy5 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.
- Es wurde keine Positivkontrolle zugegeben.  
→ Falls alle klinischen Proben ebenfalls negativ sind, wiederholen Sie die PCR.
- Zur Kontrolle der DNA-Extraktion und real-time PCR muss das IPC Target während der Extraktion zum Lysepuffer (nicht direkt zur Probe) zugegeben werden. Falls das IPC Target vergessen wurde:  
→ Wiederholen Sie die Extraktion.

### 12.2. RHD-Signal 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.

### 12.3. IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle

- IPC Target wurde während der Extraktion zugegeben, aber es gibt IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle: Kontamination mit dem IPC Target.  
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

### 12.4. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im Cy5 Kanal mit Probe

- Falsche Einstellung der Detektionskanäle mit der Probe  
→ Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
- Falls das FetoGnost® Kit IPC Target während der Extraktion zugegeben wurde:
  - PCR Inhibierung liegt vor.
  - DNA-Extraktion ist fehlgeschlagen.
  - Das DNA IPC Target wurde nicht zum Lysepuffer der Probe pipettiert.
  - Die extrahierte Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion zugegeben.  
→ Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine geeignete DNA-Extraktionsmethode verwendet wurde und überprüfen Sie die Arbeitsschritte der DNA-Extraktion.

## 13. Testperformance und Leistungsmerkmale

### 13.1. Testperformance

FetoGnost® Kit RHD wurde mit dem Applied Biosystems® 7500 instrument (Thermo Fisher Scientific) und QuantStudio™ 7 Pro (Thermo Fisher Scientific) evaluiert. Für weitere Validierungsdaten kontaktieren Sie bitte ingenetix GmbH.

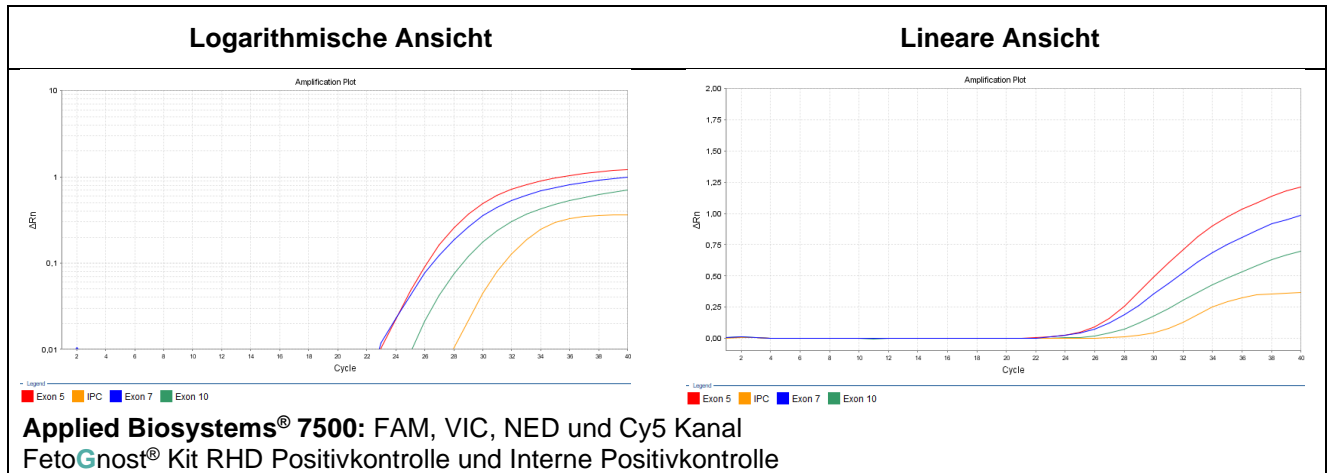


Abbildung 1 Performance des FetoGnost® Kit RHD

### 13.2. Analytische Sensitivität - Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD95 = kleinste Kopienzahl der Ziel-DNA, die in 95% der Fälle nachgewiesen werden kann) wurde durch Testen der AmpFI STR® Control DNA 007 (Stockkonzentration 100 pg/µl, Thermo Fisher Scientific) ermittelt. Es wurden zwölf Replikate in acht verschiedenen Konzentrationen um die Nachweisgrenze getestet (50, 34, 28, 20, 14, 4, 2,8, 1,4 Kopien). Die Berechnung erfolgte mit einer nichtlinearen (logistischen) Kurvenanpassung unter Verwendung der Graph Pad Prism Software. Die 95% LOD für den Nachweis von Exon 5, 7 und 10 beträgt jeweils 13, 8 und 7 Zielkopien/Reaktion (Tabelle 3).

Tabelle 3

	Exon 5	Exon 7	Exon 10
50 RHD Kopien	12/12 positiv	12/12 positiv	12/12 positiv
34 RHD Kopien	12/12 positiv	12/12 positiv	12/12 positiv
28 RHD Kopien	12/12 positiv	12/12 positiv	12/12 positiv
20 RHD Kopien	12/12 positiv	12/12 positiv	12/12 positiv
14 RHD Kopien	11/12 positiv	12/12 positiv	11/12 positiv
4 RHD Kopien	11/12 positiv	8/12 positiv	10/12 positiv
2,8 RHD Kopien	10/12 positiv	7/12 positiv	7/12 positiv
1,4 RHD Kopien	10/12 positiv	5/12 positiv	6/12 positiv

### 13.3. Linearität und dynamischer Messbereich

Die Linearität wurde mit einer 10-fachen Verdünnungsreihe von Plasmid DNA ermittelt.

**Exon 5:** Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von  $-3,786 \pm 0,06449$  und einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,98$  (Abbildung 3).

**Exon 7:** Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von  $-3,827 \pm 0,07239$  und einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,98$  (Abbildung 3).

**Exon 10:** Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von  $-3,820 \pm 0,05859$  und einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,98$  (Abbildung 3).

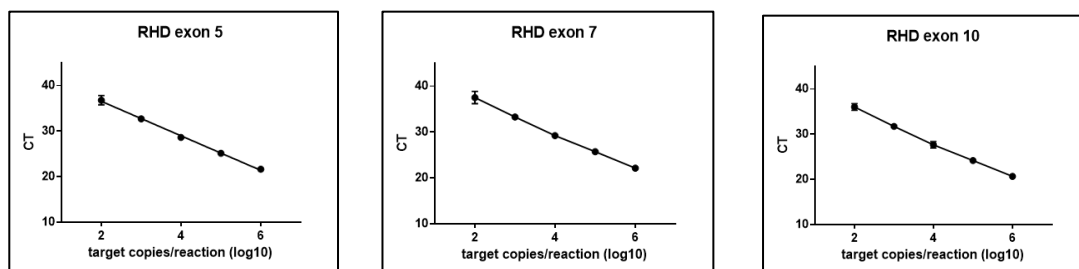


Abbildung 3

### 13.4. Analytische Spezifität und Kreuzreaktivität

Analytische Spezifität wird durch die sorgfältige Selektion von Primern und Sonden gewährleistet. *In silico* Analysen in der NCBI Datenbank und auf [http://rhesusbase.info/l\\_RHD.htm](http://rhesusbase.info/l_RHD.htm) validierte das Vorliegen von Allelvarianten bzw. das Vorliegen von Single Nukleotid Polymorphismen (SNP) in den Amplifikations-Targets. Wenige seltene klinische Subtypen in einzelnen Exons können zur Nichtdetektion des entsprechenden Exons führen, was jedoch auf die Gesamtanalyse basierend auf der Multiplex-Detektion von drei Exons keinen Einfluss hat.

Zur Untersuchung von möglicher Kreuzreaktivität wurden Primer und Sonden auf potentielle Homologien zu derzeit publizierten Sequenzen untersucht. Diese Datenbankanalyse (BLAST Analyse) validierte den spezifischen Nachweis der RHD Exons 5, 7 und 10. Es gibt keine Kreuzreaktivität zum nahe verwandten RHCE Gen.

### 13.5. Inter-Assay-Präzision

Die Inter-Assay-Präzision ist definiert als die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Probe zwischen PCR-Läufen an verschiedenen Tagen. Die Inter-Assay-Präzision des FetoGnost® Kit RHD wurde mit 10-fach Verdünnungen einer Plasmid DNA ( $1,00E+06$  bis  $1,00E+00$  Zielkopien/Reaktion) in drei unabhängigen Experimenten, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, in Triplikaten (zwei Experimente) bzw. Quadruplikaten (ein Experiment) bestimmt.

Für Exon 5 lagen die Inter-Assay Variationskoeffizienten im Bereich 0,43% bis 3,03%, mit einer mittleren Gesamt-Inter-Assay-Präzision von 1,56%.

Für Exon 7 lagen die Inter-Assay Variationskoeffizienten im Bereich 0,73% bis 2,88%, mit einer mittleren Gesamt-Inter-Assay-Präzision von 1,58%.

Für Exon 10 lagen die Inter-Assay Variationskoeffizienten im Bereich 0,61% bis 3,72%, mit einer mittleren Gesamt-Inter-Assay-Präzision von 1,89%.

Die Inter-Assay-Präzision wurde weiters mit 9 Replikaten eines Schwangeren-Pools an 6 verschiedenen Tagen analysiert. Die Testung der 9 Replikate an 6 verschiedenen Tagen zeigte zu 100% positive Ct-Werte für Exon 5, 7 und 10. Aus dem gemeinsamen Mittelwert 36,14 und einer Standardabweichung von 1,16, ergab sich ein CV von 3,2%.

### 13.6. Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision ist definiert als die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Probe innerhalb eines PCR-Laufs. Die Intra-Assay-Präzision des FetoGnost® Kit RHD wurde aus den Wiederholungsläufen von Punkt 11.3 bestimmt.

Für Exon 5 lagen die Intra-Assay Variationskoeffizienten im Bereich 0,74% bis 1,98%, mit einer mittleren Gesamt-Intra-Assay-Präzision von 1,01%.

Für Exon 7 lagen die Inter-Assay Variationskoeffizienten im Bereich 0,33% bis 5,03%, mit einer mittleren Gesamt-Intra-Assay-Präzision von 1,89%.

Für Exon 10 lagen die Intra-Assay Variationskoeffizienten im Bereich 0,05% bis 2,72%, mit einer mittleren Gesamt-Intra-Assay-Präzision von 0,81%.

Die Intra-Assay-Präzision wurde weiters mit einem Testlauf in 8 Replikaten mit einem Plasma-Pool von Schwangeren bestimmt. Für Exon 5, 7 und 10 gemeinsam betrachtet ergab sich ein Ct-Mittelwert von 36,05 und eine Standardabweichung von 1,48, woraus ein Variationskoeffizient (CV) von 4,1% bestimmt wurde.

### 13.7. Inter-Lot-Präzision

Die Inter-Lot-Präzision beschreibt die Leistungsübereinstimmung zwischen verschiedenen hergestellten Kitchargen. Die Inter-Lot-Präzision wird als prozentuale Übereinstimmung der Ergebnisse dargestellt. Die Inter-Lot-Variabilität wurde aus zwei verschiedenen Kit-Chargen mit 10-fachen Plasmid-DNA-Verdünnungen (1,00E+05 bis 1,00E+03 Zielkopien/Reaktion) ermittelt.

Für Exon 5 lagen die Inter-Lot-Variationskoeffizienten im Bereich von 2,01 % bis 0,15 %, mit einer mittleren Gesamtpräzision zwischen den Lots von 0,80 %.

Für Exon 7 lagen die Inter-Lot-Variationskoeffizienten im Bereich von 1,48% bis 0,41%, mit einer mittleren Gesamtpräzision zwischen den Lots von 0,89%.

Für Exon 10 reichten die Inter-Lot-Variationskoeffizienten von 0,88 % bis 0,55 %, mit einer mittleren Gesamtpräzision zwischen den Lots von 0,73 %.

### 13.8. Validierung mit Plasma

Unterschiedliche Volumina von Plasmaproben (400 µl, 267 µl, 200 µl) von zwei Frauen in der zwölften Schwangerschaftswoche wurden extrahiert und in 100 µl Elutionspuffer eluiert (60 µl Eluat). Die Extraktion wurde mit dem automatisierten Nukleinsäure-Extraktionsgerät EZ1 (Qiagen) mit dem EZ1 DSP Virus Kit durchgeführt. Verschiedene Volumina des DNA-Extrakts (10 µl, 6,7 µl und 5 µl) wurden in Triplikaten mit QuantStudio™ 6 (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die Probe wurde bei Vorliegen von mindestens 4 von 9 positiven Replikaten RHD positiv bewertet.

Der fetale RHD-Status wurde bei allen Proben mit Ausnahme von Probe 5 korrekt bestimmt (Tabelle 4).

Tabelle 4:

Probe (Anzahl pos. Replikate)		Cq $\bar{x}$ (Anzahl pos. Replikate)			
		Exon 5	Exon 7	Exon 10	IPC
Nr. 1 (Patientin 1) (7/9)	400 $\mu$ l Plasma extrahiert 10 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	35.78 (3/3)	36.89 (2/3)	36.60 (2/3)	28.56 (3/3)
Nr. 4 (Patientin 1) (7/9)	400 $\mu$ l Plasma extrahiert 6.7 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	35.62 (3/3)	37.48 (3/3)	36.18 (1/3)	28.99 (3/3)
Nr. 5 (Patientin 1) <b>(3/9)</b>	400 $\mu$ l Plasma extrahiert 5 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	36.49 (2/3)	38.01 (1/3)	Neg (3/3)	29.61 (3/3)
Nr. 2 (Patientin 1) (5/9)	267 $\mu$ l Plasma extrahiert 10 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	36.28 (2/3)	37.59 (1/3)	35.88 (2/3)	28.49 (3/3)
Nr. 3 (Patientin 2) (5/9)	200 $\mu$ l Plasma extrahiert 10 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	36.26 (1/3)	37.34 (2/3)	36.22 (2/3)	28.27 (3/3)
Nr. 6 (Patientin 2) (9/9)	400 $\mu$ l Plasma extrahiert 10 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	35.72 (3/3)	37.05 (3/3)	37.34 (3/3)	28.61 (3/3)
Nr. 9 (Patientin 2) (5/9)	400 $\mu$ l Plasma extrahiert 6.7 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	35.14 (1/3)	38.57 (2/3)	35.81 (2/3)	29.06 (3/3)
Nr. 10 (Patientin 2) (5/9)	400 $\mu$ l Plasma extrahiert 5 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	35.94 (2/3)	36.73 (1/3)	36.82 (2/3)	29.53 (3/3)
Nr. 7 (Patientin 2) (7/9)	267 $\mu$ l Plasma extrahiert 10 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	36.79 (2/3)	38.16 (3/3)	36.94 (2/3)	28.15 (3/3)
Nr. 8 (Patientin 2) (5/9)	200 $\mu$ l Plasma extrahiert 10 $\mu$ l DNA Extrakt in real-time PCR	36.80 (2/3)	38.00 (2/3)	38.28 (1/3)	28.60 (3/3)

### 13.9. Testung des WHO-Referenzmaterials

Der WHO-Standard RhD/SRY Plasma DNA (code 07/222, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Hertfordshire, UK) wird als internationale Referenz für den Nachweis von RHD DNA in Plasma verwendet. Laut Herstellerangaben wurden in einer Studie der WHO Verdünnungsreihen von unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 angesetzt, um die höchstmögliche Verdünnung auszutesten, bei der RHD noch nachweisbar ist. Die meisten an der Studie teilgenommenen Labore konnten RHD bei 1:2 in der real-time PCR gerade noch nachweisen.

Mit dem FetoGnost® Kit RHD war die Verdünnungsstufe 1:2 in 4 von 4 Replikaten in allen Exons positiv für RHD.

### 13.10. Klinische Sensitivität

Eine retrospektive Studie zur Zuverlässigkeit der pränatalen Bestimmung des fetalen RHD-Status aus fetaler DNA im mütterlichen Plasma wurde an der Universitätsklinik Göttingen, Abteilung für Transfusionsmedizin, Deutschland und der Abteilung für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Universität Wien, Österreich durchgeführt (**Legler et al., 2021**).

FetoGnost® Kit RHD ist das Nachfolgeprodukt von FetoGnost RhD-Assay, welcher keine Interne Positiv Kontrolle und keinen DNA-Reaktionsmix beinhaltet. Aufgrund der gleichen Bestandteile zur Detektion von RHD Exon 5, 7 und 10 sind die vorliegenden Ergebnisse auch für den FetoGnost® Kit RHD zutreffend.

Ziel der Studie war es, die diagnostische Genauigkeit des FetoGnost RhD-Assay (Ingenetix, Wien, Österreich) zur nicht-invasiven pränatalen Bestimmung des fetalen RHD-Status (NIPT-RHD) mit dem Fokus auf frühe Schwangerschaften und Mehrlingsschwangerschaften zu evaluieren.

Der FetoGnost RhD-Assay wurde routinemäßig an der Medizinische Universität Wien zur klinischen Entscheidungsfindung bei Frauen mit Anti-D-Aloimmunisierung oder zur gezielten Anwendung der routinemäßigen antenatalen Anti-D-Prophylaxe (RAADP) bei Frauen mit einem RHD-positiven Fetus eingesetzt. Basierend auf den vorhandenen Daten im Laborinformationsmanagementsystem wurde der serologische RhD-Status des Neugeborenen mit den Ergebnissen des NIPT RHD verglichen.

Seit 2009 wurde der Test bei 2.968 schwangeren Frauen zwischen der 5+6 und 40+0 Schwangerschaftswoche (Median 12+6) durchgeführt und in 2.888 (97,30%) Fällen wurden eindeutige Ergebnisse erzielt. Die diagnostische Genauigkeit wurde aus jenen 2244 (77,70%) Fällen berechnet, bei denen der serologische RhD-Status des Neugeborenen angegeben wurde. **Die Sensitivität des FetoGnost RhD Assay lag bei 99,93% (95% CI 99,61% - 99,99%) und die Spezifität bei 99,61% (95% CI 98,86% - 99,87%).** Bei 203 Mehrlingsschwangerschaften wurde kein falsch positives oder falsch negatives NIPT RHD Ergebnis beobachtet.

Als Schlussfolgerung sind die NIPT RHD-Ergebnisse zuverlässig, wenn sie mit dem FetoGnost RhD Assay erhalten werden. Eine gezielte routinemäßige Anti-D-Prophylaxe kann bei Einlings- und Mehrlingsschwangerschaften bereits in der 11+0 Schwangerschaftswoche durchgeführt werden.



**Tabelle 5:** Übersicht über die Leistungsdaten

Leistungsparameter	Leistungsdaten
LoD95	<b>Resultate mit Verdünnungen genomischer DNA:</b> RHD exon 5: 13 Kopien/Reaktion RHD exon 7: 8 Kopien/Reaktion RHD exon 10: 7 Kopien/Reaktion
LoD50	RHD exon 5: 2 Kopien/Reaktion RHD exon 7: 4 Kopien/Reaktion RHD exon 10: 3 Kopien/Reaktion
Linearität und dynamischer Meßbereich	R <sup>2</sup> : 0,98 Slope: -3,8 Der Test zeigt Linearität in einem Bereich von 100 bis 1.000.000 Zielkopien/Reaktion.
Cut-off Cq Wert	Cq≥45
Inter-Lot-Präzision	<b>Resultate mit Verdünnungen von Target Plasmid DNA:</b> Exon 5: 0,80% Exon 7: 0,89% Exon 10: 0,73%
Intra-Assay-Präzision	<b>Resultate mit Verdünnungen von Target Plasmid DNA:</b> Exon 5: 1,01% Exon 7: 1,89% Exon 10: 0,81% <b>Resultate mit gepoolten Plasmaproben:</b> Ct Durchschnitt: 36,05 Standardabweichung: 1,48 Variationskoeffizient (CV): 4,1%
Inter-Assay-Präzision	<b>Resultate mit Verdünnungen von Target Plasmid DNA:</b> Exon 5: mittlere Gesamt-Inter-Assay-Präzision = 1,56% Exon 7: mittlere Gesamt-Inter-Assay-Präzision = 1,58% Exon 10: mittlere Gesamt-Inter-Assay-Präzision = 1,89% <b>Resultate mit gepoolten Plasmaproben:</b> Ct Durchschnitt: 36,14 Standardabweichung: 1,16 Variationskoeffizient (CV): 3,2%
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität mit RHCE oder anderen humanen Genen
Analytische Spezifität	100% spezifisch, einige wenige klinische Subtypen (SNPs) von Exons werden nicht erfasst, kein Einfluss auf Gesamtanalyse, da insgesamt drei Exons erfasst werden.
Real-time PCR System Vergleiche: <ul style="list-style-type: none"> <li>ABI® 7500 instrument</li> <li>QuantStudio™ 7 Pro</li> </ul>	100% vergleichbar
Stability	FetoGnost® Kit RHD ist bis zu 37 Monate stabil
Robustheit	Der Test ist robust gegenüber Schwankungen der Annealingtemperaturen +/1 1°C und der Reagenzienkonzentrationen
Testing of WHO reference material (07/222)	100% positiv in der 1:2 Verdünnung (4 von 4 Replikaten positiv für alle drei Exons)
Diagnostische Sensitivität	99,93% (95% CI 99,61% - 99,99%)
Diagnostische Spezifität	99,61% (95% CI 98,86% - 99,87%)

## 14. 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-Hausseis 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.
- **Legler, T.J., Lührig, S., Korschineck, I. and Schwartz, D. 2021. Diagnostic performance of the noninvasive prenatal FetoGnost RhD assay for the prediction of the fetal RhD blood group status. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2021 Apr 9 (doi:10.1007/s00404-021-06055-1. Epub ahead of print).**
- 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

## 15. Änderungsindex

Änderung	Datum	Beschreibung

### Hinweis:

Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und / oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

### Technischer Support:

ingenetix GmbH, Arsenalstr. 11, 1030 Wien, Österreich

**Telefon:** +43 (0)1 36 198 0 198; **E-Mail:** office@ingenetix.com