



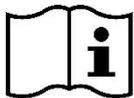
# M371-Test

In-vitro-Diagnostikum – Gebrauch nur durch Fachanwender

**REF** MCS0105

**REF** MCS0115HT

Bitte lesen Sie diese Gebrauchsanweisung vor Gebrauch des Tests aufmerksam durch und befolgen Sie sie genauestens, um die Zuverlässigkeit der Testergebnisse sicherzustellen.



Version 12, © mir|detect GmbH, Stand 11.04.2024.



mir|detect GmbH, Fischkai 1,  
27572 Bremerhaven, Deutschland  
[www.mirdetect.de](http://www.mirdetect.de)

# Inhalt

1. Name und Verwendungszweck des Produkts .....	4
2. Technologische Grundlagen des Testverfahrens .....	4
3. Im Kit enthaltene Reagenzien .....	6
3.1. Komponenten.....	6
3.2. Reaktive Komponenten des M371-Tests .....	7
3.3. Informationen und Dokumente zum M371-Test .....	7
3.4. Optionales Zubehör zum M371-Test.....	7
3.5. Gefahrstoffe und tierische Bestandteile im M371-Test-Kit .....	7
4. Transport, Lagerung und Stabilität.....	8
5. Zusätzlich benötigtes Equipment .....	9
5.1. Allgemeine Laborausstattung.....	9
5.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien .....	9
5.3. Geräteanforderungen .....	10
6. Vorsichtsmaßnahmen .....	10
6.1. Vorsichtsmaßnahmen im Labor .....	10
6.2. Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor Infektionen .....	10
6.3. Meldung von Ereignissen im Zusammenhang mit dem Produkt .....	11
6.4. Entsorgung der Arbeitsmaterialien und Reagenzien .....	11
7. Qualitätskontrolle.....	12
8. Probenentnahme und Probenprozessierung .....	12
8.1. Blutentnahme und Blutlagerung .....	12
8.2. Serumgewinnung, -lagerung und -transport.....	12
8.3. Vorsichtsmaßnahmen bei der Serumgewinnung.....	13
8.4. miRNA-Extraktion .....	13
9. Durchführung M371-Test.....	14
9.1. Generelle Durchführung des Tests.....	14
9.2. Durchführung der cDNA-Synthese .....	15
9.3. Durchführung der Präamplifikation .....	17
9.4. Vorbereitung der präamplifizierten Proben.....	18
9.5. Belegung der qPCR-Platte .....	18
9.6. Laden der qPCR-Platte.....	19
10. Ergebnisanalyse .....	20
10.1. M371-Test-Auswertdatei und Daten-Import .....	20
10.2. Ergebnisanalyse .....	21

10.2.1. Negativkontrolle.....	22
10.2.2. Referenz-miR.....	22
10.2.3. Beurteilung der Proben.....	22
11. Leitfaden zur Fehlerbehebung (Troubleshooting Guide).....	23
12. Grenzen des Verfahrens.....	24
13. Spezifische Leistungsdaten.....	25
13.1. Analytische Leistung.....	25
13.1.1. Analytische Sensitivität.....	25
13.1.2. Analytische Spezifität.....	25
13.1.3. Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LoD, LoQ).....	25
13.1.4. Linearität.....	26
13.2. Präzision.....	26
13.2.1. Wiederholungspräzision.....	26
13.2.2. Vergleichspräzision.....	26
13.3. Klinische Leistungsfähigkeit.....	26
13.4. Interferenz.....	29
13.4.1. Hämolyse.....	29
13.4.2. Andere medizinische Zustände.....	29
13.4.3. Cross-Reactivity.....	29
13.5. Summary of Safety and Performance (Kurzbericht für Sicherheit und Leistung).....	30
14. Bedeutung von Symbolen.....	30
15. Änderungen zu vorherigen Gebrauchsanweisungen.....	31
15.1. Änderungen zu Version 10.....	31
15.2. Änderungen zu Version 11.....	31
16. Referenzen.....	32
17. Informationen für den Käufer.....	33
17.1. Hersteller.....	33
17.2. Trademarks.....	33
17.3. Distributor.....	33
18. Anhang.....	34
18.1. Vorlagen für die Herstellung des cDNA-Synthese-Mastermixes (MM).....	34

## 1. Name und Verwendungszweck des Produkts

Der M371-Test ist ein nach VO (EU) 2017/746 IVDR zertifiziertes In-vitro-Diagnostikum (IVD), das auf der Messung der relativen Häufigkeit (RQ) des Tumormarkers miR-371a-3p basiert. Dazu werden miR-371a-3p und eine endogene Kontrolle in 200 µl Blutserum mittels qPCR quantifiziert.

Der M371-Test ist ein nicht-automatischer Test mit einer qualitativen Ergebnisinterpretation, der das Vorhandensein testikulärer Keimzelltumoren (KZT, Typ II, engl. Germ Cell Neoplasia in situ derived testicular germ cell tumor (GCNIS-derived TGCT)) nachweist und zur Diagnose und Verlaufskontrolle (englisch „follow-up monitoring“) dieses Tumors durch fachkundige Anwender eingesetzt werden kann. Die Testpopulation umfasst männliche, erwachsene Patienten mit Verdacht oder Bestätigung eines testikulären Keimzelltumors (Typ II, GCNIS-derived TGCT). Das Testergebnis kann nicht zur alleinigen Primärdiagnose eines testikulären Keimzelltumors oder zum Rezidivnachweis verwendet werden. Jeder positive M371-Test sollte durch ein geeignetes Verfahren der klinischen Diagnostik bestätigt werden.

## 2. Technologische Grundlagen des Testverfahrens

Das M371-Test-Kit enthält alle Reagenzien, die zur Durchführung des Bluttests zum Nachweis von Keimzelltumoren des Hodens aus bereits extrahierter miRNA erforderlich sind. Zur Beurteilung der Proben wird die optionale M371-Test-Auswertdatei zur Verfügung gestellt.

Das Nachweisverfahren basiert auf dem fluoreszenzbasierten Nachweis der MicroRNA (miRNA) miR-371a-3p mittels quantitativer Real-Time PCR. Um diesen Tumormarker zu messen, muss die RNA, einschließlich der miRNA, aus der Patientenprobe (Serum) isoliert werden. Die Reagenzien für diesen ersten Isolationschritt sind **nicht** im Kit enthalten.

Im nächsten Schritt werden der Tumormarker miR-371a-3p, sowie eine zusätzliche miRNA, die als endogene Kontrolle dient (nachfolgend: Referenz-miR), mit spezifischen Primern in cDNA transkribiert. Im folgenden Voramplifikationsschritt wird die cDNA in einer PCR amplifiziert (Präamplifikation). Im Anschluss wird mittels quantitativer PCR die relative Häufigkeit des Tumormarkers miR-371a-3p bestimmt und über die Referenz-miR normalisiert. Je früher ein Fluoreszenzsignal während der qPCR detektiert werden kann, desto mehr Moleküle des Tumormarkers bzw. der Referenz-miR waren in der Probe vorhanden. Diese Werte werden als „Ct“ Werte wiedergegeben. Die relative Häufigkeit (RQ) von miR-371a-3p wird nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) durch die Referenz-miR und einen festen Wert (Kalibrator) berechnet. Dabei wird zunächst für jede Probe der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{miR-371a-3p}) - \text{Ct}(\text{Referenz-miR})$ . Anschließend wird die Differenz des  $\Delta\text{Ct}$ -Werts der Probe zu dem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert des Kalibrators gebildet, dessen relative Expression der miR-371a-3p mit 1 gleichgesetzt wird:  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Probe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kalibrator})$ . Die relative Expression wird jeweils durch folgende Formel berechnet:  $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Der RQ-Wert ist ein Vielfaches der Expression des Kalibrators. Diese Berechnungen kann die optional zur Verfügung gestellte Auswertdatei („M371-Test Evaluation file“ siehe Kapitel 3.4. Optionales Zubehör zum M371-Test) nach dem korrekten Übertragen der gemessenen Ct-Werte ausführen.

Die Ergebnisse des M371-Tests müssen unter Berücksichtigung des klinischen Szenarios bewertet werden, je nachdem, ob der Test zur Stellung einer Primärdiagnose oder zur Erkennung von Rezidiven in der Nachsorge von Hodentumorpatienten eingesetzt wird (Tabelle 1). Im Rahmen einer Primärdiagnose ist eine klare Aussage für Proben mit einer relativen Häufigkeit zwischen 5 und 10 nicht

möglich (INDETERMINATE), da sich hier der Bereich der Quantifizierungsgrenze des Tests befindet. In diesem Fall sollte ein weiterer M371-Test mit einer frischen Probe nach einigen Wochen erfolgen.

Tabelle 1: Interpretation der M371-Testergebnisse in Abhängigkeit vom klinischen Szenario.

<b>Primärdiagnose (Erkennung von Primärtumoren)</b>	
RQ < 5	Negativ, geringe Tumorwahrscheinlichkeit
$5 \leq \text{RQ} < 10$	Unbestimmt (INDETERMINATE), Wiederholung nach einigen Wochen
RQ $\geq 10$	Positiv, hohe Tumorwahrscheinlichkeit
<b>Nachsorge (Erkennung von Rezidiven)</b>	
RQ < 15	Negativ, geringe Rezidivwahrscheinlichkeit
RQ $\geq 15$	Positiv, hohe Rezidivwahrscheinlichkeit

Für weitere Erläuterungen zur wissenschaftlichen Evidenz siehe Kapitel „13. Spezifische Leistungsdaten“ dieser Gebrauchsanweisung.

Jeder Lauf wird mit einer Negativkontrolle (NC) durchgeführt. Zur Auswertung und der Validität von Kontrollen siehe Kapitel „10. Ergebnisanalyse“ dieser Gebrauchsanweisung.

### 3. Im Kit enthaltene Reagenzien

#### 3.1. Komponenten

Der M371-Test wird in zwei Varianten angeboten (Artikelnummer MCS0105 und Artikelnummer MCS0115HT).

**Artikelnummer MCS0105** – enthält Reagenzien für fünf Patientenproben und fünf Negativkontrollen. Der Anwender kann jede Probe einzeln mit einer Negativkontrolle messen (siehe Tabelle 2).

VORSICHT: Dabei wird die Negativkontrolle in der Präamplifikation und qPCR jeweils nur **einmal** gemessen!

Tabelle 2: Inhalt des M371-Test-Kits MCS0105.

Reagenz	Behälter	Volumen [µl]
cDNA Solution (schwarz)	1 Röhrchen	<b>135</b>
Reverse Transcriptase (gelb)	1 Röhrchen	<b>19,68</b>
RNase Inhibitor (durchsichtig)	1 Röhrchen	<b>3,74</b>
PreAmp Solution (grün)	1 Röhrchen	<b>418</b>
Target Solution (blau)	1 Röhrchen	<b>410</b>
Control Solution (violett)	1 Röhrchen	<b>410</b>
PCR-grade water (weiß)	1 Röhrchen	<b>1000</b>

**Artikelnummer MCS0115HT** – enthält Reagenzien für fünfzehn Patientenproben und eine Negativkontrolle. Der Anwender muss dabei alle Proben in **einem** Durchgang messen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Inhalt des M371-Test-Kits MCS0115HT.

Reagenz	Behälter	Volumen [µl]
cDNA Solution (schwarz)	1 Röhrchen	<b>153</b>
Reverse Transcriptase (gelb)	1 Röhrchen	<b>22,30</b>
RNase Inhibitor (durchsichtig)	1 Röhrchen	<b>4,24</b>
PreAmp Solution (grün)	1 Röhrchen	<b>786</b>
Target Solution (blau)	1 Röhrchen	<b>770</b>
Control Solution (violett)	1 Röhrchen	<b>770</b>
PCR-grade water (weiß)	1 Röhrchen	<b>1000</b>

### 3.2. Reaktive Komponenten des M371-Tests

#### **cDNA Solution (schwarz)**

- miRNA-spezifische Stemloop-Primer für die Ziel- und Referenz-miRNA

#### **Reverse Transcriptase (gelb)**

- Reverse Transkriptase

#### **PreAmp Solution (grün)**

- miRNA-spezifische Primer für die Ziel- und Referenz-miRNA
- DNA-Polymerase

#### **Target Solution (blau)**

- miRNA-spezifische Primer und Sonde für die Ziel-miRNA
- DNA Polymerase

#### **Control Solution (violett)**

- miRNA-spezifische Primer und Sonde für die Referenz-miRNA
- DNA Polymerase

### 3.3. Informationen und Dokumente zum M371-Test

Die Gebrauchsanweisung, Sicherheitsdatenblätter sowie Video-Tutorials zur Durchführung des Tests sind auf der mir|detect-Website unter <https://www.mirdetect.de/download> verfügbar. Bei Veröffentlichung einer überarbeiteten Gebrauchsanweisung werden die Kunden per E-Mail auf die neue Version hingewiesen.

### 3.4. Optionales Zubehör zum M371-Test

Die M371-Test-Auswertdatei („M371-Test Evaluation File“; nur in englischer Sprache erhältlich) ist eine optionale Tabellenkalkulationssoftware mit hinterlegten Formeln für die Beurteilung von Proben und wird in elektronischer Form übermittelt (via E-Mail). Aktualisierte Versionen werden ebenfalls via E-Mail zugestellt.

### 3.5. Gefahrstoffe und tierische Bestandteile im M371-Test-Kit

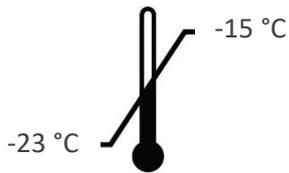
Die Komponenten PreAmp Solution, Target Solution und Control Solution enthalten Formamid in sehr geringen Konzentrationen. Alle Komponenten des M371-Tests sind nicht gesundheitsschädlich. Zu genaueren Informationen zu den Konzentrationen kann das Sicherheitsdatenblatt zum M371-Test hinzugezogen werden (<https://www.mirdetect.de/download>).

Ein Rohstoff, welcher zur Herstellung der Target Solution und Control Solution verwendet wird, enthält tierische Gelatine. Der Hersteller des Rohstoffs versichert, dass das Risiko durch BSE/TSE-Kontamination vernachlässigbar ist. Zusätzlich wird das Risiko durch die Verwendung von Arbeitsschutzkleidung (Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille siehe Kapitel „6. Vorsichtsmaßnahmen“) und dem Arbeiten unter einer PCR-Werkbank während der Durchführung des M371-Tests minimiert. Der M371-Test darf nur von Fachanwendern durchgeführt werden.

## 4. Transport, Lagerung und Stabilität

Der Versand des M371-Tests erfolgt < 0 °C via Express-Versand. **Bei einem Transportschaden wenden Sie sich bitte unverzüglich sowohl an das Transportunternehmen als auch an mir|detect GmbH bzw. Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH.** Die Kontaktdaten sind in Kapitel „17.

Informationen für den Käufer“ angegeben. Beschädigte Reagenzien-Röhrchen sind nicht zu verwenden, sondern sofort zu entsorgen. Komponenten unterschiedlicher Kit-Lots sollten nicht miteinander vermischt werden.



Lagern Sie alle Reagenzien des Kits vor und nach dem ersten Öffnen bei -23 °C bis -15 °C. Schützen Sie die Target Solution (blau) und Control Solution (violett) vor Lichteinfall. Jede Komponente kann bis zu acht Mal aufgetaut und wieder eingefroren werden.



Bei Einhaltung der Lagerbedingungen maximal bis zum außen am Kit angegebenen Verfallsdatum verwendbar (Maximal mögliche Haltbarkeit: zehn Monate). Verwenden Sie keine Materialien nach Ablauf des Verfallsdatums.

## 5. Zusätzlich benötigtes Equipment

### 5.1. Allgemeine Laborausstattung

Die folgende Laborausstattung wird benötigt, um den M371-Test durchzuführen.

- Optionales Zubehör: M371-Test Auswertdatei („M371-Test Evaluation file“)\*
- PCR-Werkbank
- Standard-PCR-Instrument
- Kühlblock für die verwendeten Reaktionsgefäße
- Vortex Mixer
- Pipette mit veränderbarem Volumen in geeigneten Größen
- Optional: Elektronischer Dispenser
- Tischzentrifuge mit einem Rotor für 0,2/1,5 ml Reaktionsgefäße
- Plattenzentrifuge für PCR-Platten
- Real-time PCR-Instrument\*\*

\* Die Auswertdatei für den M371-Test wurde mit Microsoft Excel für Microsoft 365 MSO validiert.

\*\* Der M371-Test wurde mit den folgenden Real-Time PCR-Cyclern validiert:

- LightCycler® 480 II qPCR Instrument (Roche Diagnostics) mit 96-Well Heizblock und Software-Version 1.5.x
- QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) mit 96-Well Heizblock und „Design and Analysis“ Software, Version 1.4.x
- AriaDx (Agilent) mit Software-Version 2.0

### 5.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien sollten aus Polypropylen und müssen frei von RNasen, DNasen, DNA und PCR-Inhibitoren sein.

- Blutentnahmeröhrchen\*
- Kryoröhrchen, selbststehend
- miRNA Extraktions-Kit\*\*
- 1,5 ml Reaktionsgefäße mit konischem Boden und Sicherheitsdeckel (PP)
- 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (z.B. 8er-Streifen)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Optional: Aufsatz für elektronischen Dispenser
- PCR-Platten mit Klebefolie
- Applikator für das Aufkleben von Klebefolien

\* notwendig für die Serumgewinnung. Empfohlen mit Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® Serum-Gel (7,5 ml bzw. 9 ml Z-Gel); genauere Informationen zur Serumgewinnung in Kapitel „8. Probenentnahme und Probenprozessierung“.

\*\* notwendig für die Extraktion von miRNA. Empfohlen wird der Test mit QIAGEN GmbH miRNeasy Serum/Plasma Kit.

### 5.3. Geräteanforderungen

Die Installation, Kalibrierung, Funktionsqualifizierung und Wartung aller verwendeten Geräte und Gerätschaften muss entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt werden und obliegt dem Anwender des Tests. Ihm obliegt ebenfalls das Festlegen entsprechender Qualitätskontrollverfahren.

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Der Fachanwender ist verantwortlich für das Einhalten anwendbarer Laborvorschriften. Tragen Sie bei der Arbeit mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einweghandschuhe und eine Schutzbrille.

### 6.1. Vorsichtsmaßnahmen im Labor

Vorschriften wie z.B. die DIN EN ISO 17025 oder DIN EN ISO 15189 sollten eingehalten werden, um das Risiko einer Kreuzkontamination von Patientenproben vor, während und nach der RNA-Extraktion zu vermeiden. Verhindern Sie während der Extraktion das Einbringen von Nukleasen in die Proben. Verwenden Sie ausschließlich Einmal-Pipettenspitzen mit Filter, um eine Kreuzkontamination zwischen Patientenproben zu vermeiden.

Messergebnisse können durch stark erhöhte Außentemperaturen beeinflusst werden. Lagern Sie Reagenzien und Proben außerhalb der Gefrierschränke immer in Kühlblocks.

Die Reagenzien für die qPCR (Control Solution (violett) und Target Solution (blau)) sind lichtempfindlich und daher lichtgeschützt zu lagern. Übermäßige Lichtexposition kann die Fluoreszenz-Sonden beeinträchtigen.

Die Reagenzien des M371-Tests können bis zu acht Mal aufgetaut werden. Darüber hinaus sollten die Reagenzien nicht wiederverwendet werden.

Der M371-Test darf nur von professionellen Anwendern durchgeführt werden, die mit Methoden der Serum-Gewinnung, RNA-Extraktion und qPCR vertraut sind.

### 6.2. Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor Infektionen

Humane Blut- und Serumproben, die mit diesem Test untersucht werden, sollten grundsätzlich als potenziell infektiös behandelt und alle Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, wie sie in der Richtlinie für mikrobiologische und biologische Sicherheit für Laboratorien, „Directive 2000/54/EC über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit“, oder anderen Vorschriften zur biologischen Sicherheit vorgeschrieben sind.

### 6.3. Meldung von Ereignissen im Zusammenhang mit dem Produkt

Alle schwerwiegenden Zwischenfälle oder Ereignisse, die in Verbindung mit dem Produkt stehen, müssen umgehend an mir|detect GmbH ([info@mirdetect.de](mailto:info@mirdetect.de)) und die zuständigen Behörden gemeldet werden.

Bitte treffen Sie keine medizinisch relevanten Entscheidungen, ohne vorher einen Gesundheitsexperten zu kontaktieren.

### 6.4. Entsorgung der Arbeitsmaterialien und Reagenzien

Alle Reagenzien des M371-Tests sind nicht gesundheitsschädlich. Abgelaufene Reagenzien bzw. leere Reagenzien-Behälter können im Restmüll entsorgt werden. Örtliche Bestimmungen sind hierbei zu beachten. Bitte **entfernen Sie niemals die Folie von benutzten qPCR-Platten** und achten Sie auf eine beschädigungsfreie Entsorgung.

Für den Umgang mit Serumproben und ihre Entsorgung bzw. den zur RNA-Extraktion verwendeten Arbeitsmaterialien und -reagenzien lesen Sie bitte aufmerksam die Hinweise in den Gebrauchsanweisungen der entsprechenden Kits und befolgen Sie diese strikt.

## 7. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO 13485-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem der mir|detect GmbH wird jede Charge des M371-Tests anhand vorgegebener Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität sicherzustellen. Dies hält die Batch-to-Batch-Variabilität gering. Chargenzertifikate sind auf Anfrage vom Hersteller erhältlich.

## 8. Probenentnahme und Probenprozessierung

### 8.1. Blutentnahme und Blutlagerung

Die Blutentnahme sollte zur Reduzierung einhergehender Risiken für den Patienten von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden und die anschließende Blutlagerung und Serumgewinnung, wie nachfolgend beschrieben, erfolgen:

- S-Monovette® Serum-Gel Röhrchen sollten für die Blutentnahme entsprechend den Herstellerangaben verwendet werden. Keine Plasma-, EDTA-, Heparin- oder PAXgene-Röhrchen verwenden.
- Das Serum sollte möglichst sofort nach der Blutentnahme von den Blutzellbestandteilen getrennt werden (siehe 8.2. Serumgewinnung, -lagerung und -transport).
- **Vollblutproben dürfen nicht eingefroren werden**, da dies zu Hämolyse führt.

### 8.2. Serumgewinnung, -lagerung und -transport

- Das Blut im Blutröhrchen einige Male invertieren und aufrecht für 30 Min. bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) inkubieren.
- Das Blutröhrchen für 10 Min. bei 2500 g zentrifugieren.
- Blutröhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entnehmen.
- Serum in ein beschriftetes Kryoröhrchen pipettieren. Es sollten in etwa 3-5 ml Serum aus insgesamt 10 ml Vollblut gewonnen werden.
- Das Serum kann für bis zu 6 Stunden bei 2 – 8 °C gelagert werden, wenn die RNA-Extraktion noch am selben Tag durchgeführt wird.
- Für eine längerfristige Lagerung ist das Serum zu aliquotieren und bei -20 °C oder -80 °C zu lagern.
- Das Serum sollte in einem geeigneten Gefäß gefroren transportiert werden. Stabilität kann aufrecht erhalten werden für folgende Dauer:
  - 90 Stunden bei < -1 °C
  - 16 Tage bei < -20 °C

### 8.3. Vorsichtsmaßnahmen bei der Serumgewinnung

Bei einer auffälligen Rotfärbung des Serums ist eine photometrische Messung bei einer Absorption von 414 nm empfohlen. Ein Wert über 0,3 deutet auf einen unter Umständen problematischen Grad an Hämolyse hin, der das Messergebnis des M371-Tests negativ beeinflusst (Myklebust *et al.*, 2019). In diesem Fall ist eine erneute Blutprobenentnahme ratsam und das hämolytische Serum zu entsorgen.

Ein sehr niedriger Ct-Wert <12 der Referenz-miR kann ebenfalls auf eine vorliegende Hämolyse hinweisen und das Ergebnis verfälschen (siehe Kapitel „10.2.2. Referenz-miR“).

Sollte es Hinweise darauf geben, dass das Serum besonders fetthaltig ist, lassen Sie es eine Weile bei Raumtemperatur ruhen. Hierbei bildet sich eine Fettschicht, die anschließend vorsichtig entfernt werden kann.

Achten Sie darauf, dass die Schicht des Buffy Coats (Leukozytenfilm) nach dem Zentrifugationsschritt oberhalb der roten Blutkörperchen nicht zerstört oder mittransferiert wird. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da ein Übertrag die größtmögliche Kontaminationsquelle mit zellulärer miRNA bzw. RNA darstellt.

### 8.4. miRNA-Extraktion

Materialien zur Extraktion von RNA bzw. miRNA aus Patientenserum sind nicht Bestandteil des M371-Tests.

Zur Vermeidung von Degradationen des Probenmaterials während der RNA-Extraktion ist auf die Verwendung von RNase-, DNase-, sowie DNA-freien Arbeitsmitteln und persönliche Schutzausrüstung zu achten. Zusätzlich sind Kreuzkontaminationen zwischen den Patientenproben zu vermeiden.

**Achtung:** Vermeiden Sie ausgedehnte Inkubationen und mehrmaliges Auftauen, da dies zu Degradationen führen kann!

Die RNA-Extraktion erfolgt laut entsprechender Gebrauchsanweisung. mir|detect GmbH empfiehlt, die RNA-Extraktion aus **200 µL Serum** durchzuführen. Zur Gewährleistung einer gleichbleibend effizienten Extraktion sind die Herstellerangaben für das Extraktions-Kit strikt zu befolgen.

- Die extrahierte miRNA kann direkt für die Durchführung des M371-Tests verwendet werden.
- Die Lagerung von miRNA sollte bei -20 °C oder -80 °C erfolgen.
- **Achtung:** Wiederholte Einfrier- und Auftau-Zyklen von miRNA sind zu vermeiden, da sie zu Degradationen führen können!

## 9. Durchführung M371-Test

Alle Reagenzien des M371-Test-Kits sind „ready-to-use“ und direkt für die Durchführung des Tests einsatzbereit.

### 9.1. Generelle Durchführung des Tests

Vor dem erstmaligen Einsatz des M371-Tests empfiehlt es sich, einen Probedurchlauf mit bekannten Proben durchzuführen. Für Unterstützung und Beratung kontaktieren Sie **mir|detect GmbH** (Kontaktformular über <https://www.mirdetect.de/Service/>) bzw. **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** (17.3. Distributor).

Für die Überwachung und gleichwertige Durchführung des M371-Tests in allen Laboren empfiehlt mir|detect GmbH die Teilnahme an regelmäßigen Laborvergleichen (Kontaktformular über <https://www.mirdetect.de/Service/>).

Eine Negativkontrolle (NC) aus PCR-grade water muss für dessen Gültigkeit in jedem Lauf mit prozessiert werden. Die Kontrolle wird hierbei in der cDNA-Synthese umgeschrieben, aber - anders als bei einer Patientenprobe - nur einfach in der abschließenden miR-371a-3p- und Referenz-miR-Messung analysiert.

#### **Wichtige Hinweise:**

- Die Komponenten Reverse Transcriptase (gelb) und RNase Inhibitor (durchsichtig) sollten **nicht** mit einem Vortex-Mixer gemixt werden. Stattdessen das Röhrchen mit dem Finger anschnippen. Die restlichen Komponenten vor ihrer Verwendung für ca. 3 Sek. bei ca. 2,800 U/Min. auf einem Vortex-Mixer mixen, um eine homogene Lösung zu gewährleisten.
- Zentrifugieren Sie alle Lösungen des Kits - vor ihrer Verwendung für ca. 3 Sek. bei 2000 g, um Tropfen am Deckel zu entfernen.
- Entnehmen Sie alle Lösungen des Kits nur für die Durchführung des M371-Tests aus ihren Lagerbedingungen. Verwenden Sie den cDNA-Synthese Mastermix (MM) direkt nach seiner Herstellung. Nach Benutzung sind alle Lösungen sofort wieder einzufrieren bzw. leere Behältnisse zu entsorgen.
- Es wird empfohlen, für alle Reaktionsgefäße inkl. der 8er-Streifen und der 96-well-Platte entsprechende Kühlblöcke / Cooling racks zu verwenden. Diese erleichtern die Handhabung und gewährleisten eine kontinuierliche Kühlung der Reagenzien.
- Die Temperaturprogramme (Tab. 6, 8 und 9) geben die für die jeweiligen Reaktionen erforderlichen Bedingungen an. Darüber hinaus muss der Heizdeckel aktiviert werden (empfohlen: 105 °C). Bitte beachten Sie die Bedienungsanleitung Ihres Geräts.

## 9.2. Durchführung der cDNA-Synthese

- cDNA Solution (schwarz) und PCR-grade water (weiß) kurz bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank auftauen.
- cDNA Solution auf dem Vortex-Mixer für ca. 3 Sek. mixen, abzentrifugieren und im Kühlblock lagern.
- Reverse Transcriptase (gelb) und RNase Inhibitor (durchsichtig) durch Anschnipsen mischen (nicht vortexen), abzentrifugieren und im Kühlblock lagern.

Führen Sie die nächsten Schritte unter einer sauberen PCR-Bank durch.

- Mastermix (MM) für die cDNA-Synthese aus cDNA Solution, Reverse Transcriptase und RNase Inhibitor entsprechend der Anzahl an Proben in einem geeigneten Reaktionsgefäß zusammen pipettieren. Dabei das Verhältnis aus Tabelle 4 beachten.
- Mastermix (MM) durch Anschnipsen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen und abzentrifugieren. Mastermix (MM) im Kühlblock lagern.
- Jeweils 9 µl des cDNA-Synthese Mastermixes (MM) je Patientenprobe und Kontrolle in einen 8er-PCR-Streifen pipettieren (siehe Tabelle 5).
- Jeweils 6 µl Probe oder Kontrolle hinzufügen.

Tabelle 4: Pipettierschema für die Herstellung eines cDNA-Synthese-Mastermixes (MM)

Rxn = Reaktionen.

Reagenz	Mastermix (MM)	Einzelansatz	MM (2 Proben)
		1 Rxn [µl]	3 Rxn (inkl. NC und 10 % Überschuss) [µl]
cDNA Solution (schwarz)		7,81	25,77
Reverse Transcriptase (gelb)		1,00	3,3
RNase Inhibitor (durchsichtig)		0,19	0,63
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>9,00</b>	<b>29,7</b>

Tabelle 5: Verteilung des cDNA-Synthese-Mastermixes (MM) und der Proben in die PCR-Reaktionsgefäße (8er-Streifen). Darstellung der Durchführung für zwei Proben und eine Negativkontrolle (NC).

PCR-Reaktionsgefäße
MM + Probe 1
MM + Probe 2
---
---
MM + NC
---
---
---

- cDNA-Synthese-Ansätze durch Anschnipsen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen und abzentrifugieren.
- cDNA-Synthese Ansätze für mindestens 5 Min. im Kühlschrank bzw. auf Eis bei +4 °C inkubieren.

- cDNA-Synthese entsprechend Tabelle 6 durchführen. Auf die Aktivierung des Heizdeckels achten.
- Fertige cDNA kann über Nacht im Kühlschrank (+4 °C) gelagert werden. Für längere Lagerung bei -20 °C einfrieren.

Tabelle 6: Parameter des cDNA-Synthese-Programms für ein Standard-PCR-Instrument.

<b>Zieltemperatur [°C]</b>	<b>Dauer [hh:mm:ss]</b>	<b>Segment</b>
16	00:30:00	Annealing
42	00:30:00	Reverse Transkription
85	00:05:00	Enzyminaktivierung
≥ 4 bis ≤ 10	∞	Abkühlen

### 9.3. Durchführung der Präamplifikation

- PreAmp Solution (grün) kurz bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank auftauen, anschließend für ca. 3 Sek. auf dem Vortex-Mixer mischen, abzentrifugieren und im Kühlblock lagern.

Führen Sie die nächsten Schritte unter einer sauberen PCR-Bank durch.

- Je Patientenprobe **drei** Ansätze aus 16 µl PreAmp Solution in PCR 8er-Streifen vorlegen und je 4 µl der neu synthetisierten cDNA hinzugeben (siehe Tabelle 7).
- Für die Negativkontrolle genügt **einmal** 16 µl PreAmp Solution und 4 µl cDNA-Ansatz.
- Präamplifikations-Ansätze durch Anschneiden oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen und abzentrifugieren.
- Präamplifikation entsprechend der Tabelle 8 durchführen. Auf die Aktivierung des Heizdeckels achten.
- Fertige Präamplifikate können über Nacht im Kühlschrank (+4 °C) gelagert werden. Für längere Lagerung bei -20 °C einfrieren.

Tabelle 7: Darstellung der Durchführung einer Präamplifikation für zwei Proben und eine Negativkontrolle (NC).

PCR-Reaktionsgefäße	
	Probe 1
	Probe 1
	Probe 1
	Probe 2
	Probe 2
	Probe 2
	---
	NC

Tabelle 8: Parameter des Präamplifikations-Programms für ein Standard-PCR-Instrument.

Zyklen	Zieltemperatur [°C]	Dauer [hh:mm:ss]	Segment
1	95	00:01:00	Enzymaktivierung
15	95	00:00:15	Denaturierung
	60	00:04:00	Annealing + Elongation
1	≤10	∞	Abkühlen

**Hinweis:** Es ist zu beachten, dass die korrekte Anzahl an Zyklen einprogrammiert wird, da die Eingabe der Zyklen in verschiedenen PCR-Cycler-Systemen variieren kann (Gesamtanzahl der Zyklen oder Anzahl der Zyklus-Wiederholungen).

## 9.4. Vorbereitung der präamplifizierten Proben

- Target Solution (blau) und Control Solution (violett) lichtgeschützt im Kühlschrank oder kurz bei Raumtemperatur, ebenfalls lichtgeschützt, auftauen. PCR-grade water (weiß) bei Raumtemperatur auftauen. Reagenzien in Kühlblock lagern.
- Ggf. Präamplifikate kurz bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank auftauen, abzentrifugieren und im Kühlblock bis zur weiteren Verwendung lagern.

Führen Sie die nächsten Schritte unter einer sauberen PCR-Werkbank durch.

- Für jede Patientenprobe 60 µl PCR-grade water (weiß) in einem Reaktionsgefäß vorlegen.
- Alle drei Ansätze jeder Probe zu dem PCR-grade water hinzufügen (3 × 20 µl Präamplifikat = 60 µl + 60 µl PCR-grade water).
- Für die Negativkontrolle 20 µl PCR-grade water in einem Reaktionsgefäß vorlegen und jeweiliges Präamplifikat hinzufügen.

## 9.5. Belegung der qPCR-Platte

- Target Solution (blau) und Control Solution (violett) für ca. 3 Sek. auf dem Vortex-Mixer mischen, abzentrifugieren und im Kühlblock lagern.
- Für jede Patientenprobe werden sechs Wells benötigt (drei für die Target Solution, drei für die Control Solution). Für jede Negativkontrolle je zwei Wells (siehe Abb. 1).
- 15 µl der Target Solution bzw. Control Solution in die entsprechenden Positionen der qPCR-Platte pipettieren.
- Die verdünnten Präamplifikate vor Verwendung ca. 3 Sek. auf dem Vortex-Mixer mischen, abzentrifugieren und im Kühlblock lagern
- 5 µl der verdünnten Präamplifikate in die entsprechenden Positionen der qPCR-Platte pipettieren.
- qPCR-Platte mit einer optischen Abdeckfolie verschließen und blasenfrei mit einem Applikator für Folien glattstreichen.
- PCR-Platte mit einer Plattenzentrifuge abzentrifugieren (z. B. 2 × 30 Sek. bei 500 g).

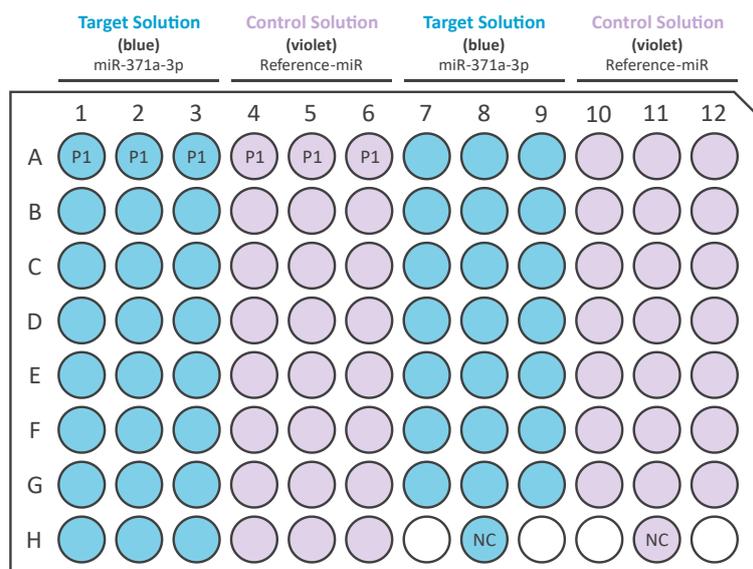


Abb. 1: Empfohlene Plattenbelegung der qPCR-Platte für die Messung einer Probe (P1) und einer Negativkontrolle (NC).

## 9.6. Laden der qPCR-Platte

Bezüglich der Programmierung Ihres Real-Time PCR-Cyclers beachten Sie bitte die Informationen des Herstellers.

- In der qPCR-Cycler-Software ein qPCR-Programm entsprechend Tabelle 9 anlegen.
- Die gerätespezifischen maximalen Heiz- und Kühlraten können beibehalten werden (Tabelle 10).
- Folgende allgemeine Einstellungen sind vorzunehmen:  
Reaktionsvolumen: 20 µl  
Detektionskanal: FAM
- Ladeklappe des qPCR-Instruments öffnen und die qPCR-Platte in den Rahmen legen. Stellen Sie sicher, dass die Platte genau in den Rahmen passt. Schließen Sie die Ladeklappe.
- Den qPCR-Lauf starten und einen eindeutig zu identifizierenden Namen einfügen.
- Nach Beendigung des Laufs die qPCR-Platte aus dem qPCR-Instrument entnehmen und entsorgen, ohne die Schutzfolie zu entfernen.

**Besonderheit LightCycler® 480II (Roche):** Bei den Plattenbelegungsschemata müssen die Proben in den parallel ablaufenden Messungen der miR-371a-3p und Referenz-miR als Triplikate zueinander definiert werden.

- Unter dem Punkt „Sample Editor“ müssen die drei Ansätze für jede Patientenprobe und jede miRNA als Replikate gekennzeichnet werden. Dazu je drei Positionen auswählen und auf den Button „Make Replicates“ klicken
- Bsp.: A1-A3 = ein Replikat, A4-A6 = ein Replikat (siehe Abb. 1)

Tabelle 9: Temperaturprofil der qPCR.

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [mm:ss]	Detektion
1	Aktivierung Polymerase	95	10:00	
40	Denaturierung	95	00:15	
	Annealing/Elongation	60	01:00	Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus
1	Abkühlen	37	01:00	

Tabelle 10: Gerätespezifische Heiz- und Kühlraten validierter qPCR-Cycler

qPCR-Cycler	Maximale Heiz- bzw. Kühlrate [°C/s]
LightCycler® 480 II	4,4 (Heizen), 2,2 (Kühlen)
QuantStudio™ 5	3,66
AriaDx	6,0

## 10. Ergebnisanalyse

**Hinweis:** Cp (= Crossing point) und Ct (= Cycle threshold) sind identisch und austauschbar. In dieser Gebrauchsanweisung wird der Begriff Ct verwendet.

### 10.1. M371-Test-Auswertdatei und Daten-Import

Die M371-Test-Auswertdatei ist eine optionale Zubehör-Software und wird nach Erwerb des Kits in elektronischer Form **via E-Mail** übermittelt. Die Datei mit der Bezeichnung „M371-Test Evaluation File“ ist nur in englischer Sprache verfügbar. Für eine zuverlässige und sichere Auswertung sollte immer die aktuelle Version der M371-Test-Auswertdatei verwendet werden. Um einen sicheren Gebrauch zu gewährleisten, enthält die M371-Test-Auswertdatei gesperrte Bereiche, **welche nicht verändert werden können und nicht verändert werden dürfen**. Beschreibbare Zellen sind farblich in Hellgrün hervorgehoben, wie z. B. die Bezeichnung der Proben und der Bereich zum Einfügen von Daten aus der qPCR. Nach Einfügen der Daten aus dem qPCR-Lauf in die M371-Test-Auswertdatei wird die relative Häufigkeit (RQ) der miR-371a-3p automatisch berechnet und das Testergebnis angezeigt.

## 10.2. Ergebnisanalyse

### Analyseeinstellungen:

Tabelle 11: Gerätespezifische Analyseeinstellungen.

qPCR-Cycler	Schwellwert	Basislinie
LightCycler® 480 II	Abs Quant/2nd Derivative Max	Start- und Endzyklus sind so zu wählen, dass ein initiales Rauschen des Signals nicht berücksichtigt wird und die Basislinie vor Detektion einer signifikanten Fluoreszenz endet.
QuantStudio™ 5	Auto threshold	
Aria Dx	Auto threshold	

Nachfolgend wird die Ergebnisanalyse mit der optionalen M371-Test-Auswertdatei beschrieben. Das hier beschriebene Verfahren bezieht sich auf das Roche Diagnostics LightCycler® 480 II qPCR Instrument mit 96-Well Heizblock und Software-Version 1.5.x. Bei Verwendung anderer validierter qPCR-Cycler ist auf eine korrekte Übertragung der Median Ct-Werte in die Eingabemaske der M371-Test-Auswertdatei zu achten. Die gerätespezifischen Analyseeinstellungen der validierten qPCR-Cycler-Systeme sind in Tabelle 11 einzusehen.

- In der LightCycler® 480 Software das vorherige Experiment auswählen und auf den Reiter „Analysis“ klicken.
- „Abs Quant/2nd Derivative Max“ für alle Proben auswählen und auf „OK“ klicken.
- „Median“ anstelle von „Mean“ im Dropdown-Menü auf der unteren rechten Seite auswählen und durch „Calculate“ auf der unteren linken Seite berechnen.
- Der Median der Ct-Werte der miR-371a-3p und der Referenz-miR wird für jede Probe automatisch berechnet und in der Ergebnistabelle „Replicate Statistics“ unten links angezeigt.
- Alle Ergebnisse aus der Ergebnistabelle „Replicate Statistics“ müssen in die M371-Test-Auswertdatei übertragen werden. Dafür in das Feld „Replicate Statistics“ klicken, mit Strg + A alle Daten markieren und anschließend mit Strg + C die Daten kopieren.
- Zur M371-Test-Auswertdatei wechseln und den dortigen Anweisungen zur Datenübertragung folgen.
- Die Ergebnisse der Negativkontrolle für die miR-371a-3p und Referenz-miR-Messung müssen manuell in die Auswertdatei eingetragen werden. Durch Halten des Cursors (Mauszeiger) über die entsprechende Well-Position in der LightCycler® Software wird der gemessene Ct-Wert angezeigt.
- Die Auswertdatei enthält separate Ergebnisspalten für die Primärdiagnostik und die Nachsorge. Wegen unterschiedlicher Schwellwerte können sich die Ergebnisse in diesen Spalten unterscheiden. **Es ist darauf zu achten, das Ergebnis aus der dem jeweiligen Szenario entsprechenden Spalte abzulesen.**

### 10.2.1. Negativkontrolle

In jedem qPCR-Lauf muss eine Negativkontrolle (NC, PCR-grade water) sowohl für die miR-371a-3p und die Referenz-miR-Messung eingesetzt werden, um die erfolgreiche Durchführung des Tests zu bestätigen.

Ein qPCR-Lauf ist **GÜLTIG**, wenn die Negativkontrolle für die miR-371a-3p und die Negativkontrolle für die Referenz-miR-Messung **NEGATIV** ist. Die Negativkontrolle ist negativ, wenn der Ct-Wert für beide gemessenen miRNA mindestens 10 Zyklen später als der höchste Wert der entsprechenden miRNA einer Probe liegt oder bei einem Wert von 35 oder mehr liegt.

Ein qPCR-Lauf ist **UNGÜLTIG**, wenn die Negativkontrolle **POSITIV** ist. Die Negativkontrolle für die miR-371a-3p und die Referenz-miR-Messung ist positiv, wenn der Ct-Wert für die jeweils spezifisch gemessene miRNA weniger als 10 Zyklen später als der höchste Wert einer Probe liegt.

Wenn die Negativkontrollen **POSITIV** sind, können die Proben, die zusammen mit den Kontrollen prozessiert wurden, **nicht** bewertet werden. Der M371-Test muss in solch einem Fall für alle Proben wiederholt werden.

Die M371-Test-Auswertdatei zeigt an, ob alle Kontrollen bestanden wurden (M371-Test-Auswertdatei → Controls: NC miR-371a und NC Reference-miR).

### 10.2.2. Referenz-miR

Die Referenz-miR gibt Aufschluss darüber, ob von jeder Probe eine ausreichende miRNA-Menge im jeweiligen Ansatz vorhanden war. Das Ergebnis der miR-371a-3p qPCR ist vom Ergebnis der Referenz-miR abhängig.

Der Normalbereich für den Ct-Wert der Referenz-miR liegt mit dem LightCycler® 480 II Instrument zwischen 12 und 22. In diesem Fall ist ausreichend miRNA vorhanden und die Ergebnisse sind valide.

Ist der Ct-Wert der Referenz-miR einer Probe **höher als 22** weist dies auf sehr geringe Ausgangsmengen nach der RNA-Extraktion hin und gefährdet unter Umständen eine eindeutige Diagnose.

Ist der Ct-Wert der Referenz-miR einer Probe **niedriger als 12**, lag möglicherweise eine Hämolyse der Probe vor und eine klare Aussage über den Tumorstatus ist anhand dieser Probe nicht möglich.

**Patientenproben, deren Ct-Wert der Referenz-miR unter 12 oder über 22 liegen, sollten neu abgenommen und mit dem M371-Test prozessiert werden.**

### 10.2.3. Beurteilung der Proben

Die Beurteilung der Testergebnisse in Abhängigkeit vom klinischen Szenario wird in Kapitel „2. Technologische Grundlagen des Testverfahrens“ beschrieben.

## 11. Leitfaden zur Fehlerbehebung (Troubleshooting Guide)

- Ist für einen qPCR-Lauf eine Negativkontrolle nicht bestanden, so ist der gesamte Lauf zu wiederholen (Proben inklusive Negativkontrolle für die miR-371a-3p und die Referenz-miR-Messung).
- Unerwünschte Signale in den Negativkontrollen können auf einen nicht aktivierten Heizdeckel in der cDNA-Synthese oder Präamplifikation zurückgehen. Aufgrund einer Kondensation an den Deckeln der Reaktionsgefäße treten unerwünschte Konzentrationsverschiebungen auf. Um dies zu vermeiden, sollte eine Heizdeckeltemperatur von 105 °C einprogrammiert werden.
- Liegt für eine Probe der Ct-Wert der Referenz-miR über 22, sollte die Probe neu genommen und mit dem M371-Test prozessiert werden, da die Menge an Ausgangsmaterial nicht ausreichend war.
- Liegt für eine Probe der Ct-Wert der Referenz-miR unter 12, sollte die Probe neu genommen und mit dem M371-Test prozessiert werden, da die ursprüngliche Probe wahrscheinlich hämolytisch war.
- Liegt für eine Probe aus der **Primärdiagnostik** der RQ zwischen 5 und 10 (unbestimmter Bereich), bitte dem Patienten nach einigen Wochen erneut Blut abnehmen und die Messung anschließend wiederholen.
- LightCycler®-Software: Wenn die Tabelle „Replicate Stats“ fehlt, prüfen Sie, ob die Replikate einer Patientenprobe einander als Replikate zugeordnet sind.

## 12. Grenzen des Verfahrens

- Der Test ist nur für die In-vitro-Diagnostik geeignet.
- Der Test ist ausschließlich ausgelegt auf die Detektion von testikulären Keimzelltumoren Typ II (Germ Cell Neoplasia *in situ* derived GCTs).
- Der Test hat keine prognostische Funktion (Vorhersage von Rezidiven nach Intervention) gezeigt, kann aber zum Follow-up Monitoring von Hodentumor-Patienten verwendet werden.
- Es wurden nur die in Kapitel „5.1. Allgemeine Laborausstattung“ genannten qPCR-Cycler validiert.
- Dieses Produkt wurde für die Analyse von Serum entwickelt. Es wurden ausschließlich die S-Monovette® Serum-Gel Blutentnahmeröhrchen 7,5 und 9 ml Z-Gel der Firma Sarstedt AG & Co. KG validiert.
- Andere Arten von Patientenproben und andere Blutentnahmeröhrchen wurden nicht validiert.
- Die Hinweise zur Probenentnahme und Probenprozessierung in Kapitel „8. Probenentnahme und Probenprozessierung“ sind zu beachten
- Dieses Produkt darf nur von Personen mit Erfahrung in der Durchführung von PCR-Tests verwendet werden.
- Das Testergebnis kann nicht zur alleinigen Primärdiagnose eines testikulären Keimzelltumors oder zum Rezidivnachweis verwendet werden. Jeder positive M371-Test sollte durch ein geeignetes Verfahren der klinischen Diagnostik bestätigt werden.
- Das Testergebnis des M371-Tests muss im Zusammenhang mit anderen klinischen Parametern beurteilt werden.
- Reine Teratome zeigen so gut wie keine erhöhte Expression des Tumormarkers miR-371a-3p, weshalb diese Tumorentität nicht nachweisbar ist (Dieckmann et al., 2017; 2019).
- Die Referenz-miR ist im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten erhöht exprimiert (Song et al., 2019). Derzeit ist nicht bekannt, ob dies auch auf die Konzentration der Referenz-miR im Serum dieser Patienten zutrifft. In diesem Fall könnten falsch-negative Testergebnisse auftreten.
- Positive Testergebnisse wurden bei schwangeren Frauen beobachtet, die jedoch nicht zur Zielgruppe der zu analysierenden Patienten mit dem M371-Test gehören (Gu et al., 2013).
- Eine erhöhte Hämolyse führt zu einer vermehrten Freisetzung der im Test detektierten Referenz-miR. Daraus resultiert eine erhebliche Verminderung der Ct-Werte der Referenz-miR, die zu verfälschten RQ-Werten und im ungünstigsten Fall zu einem falsch-negativen Testergebnis führen kann (Myklebust et al., 2019).
- Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Covid-19-Patienten die miR-371a-3p erhöht exprimiert wird (Goebel et al., 2022).

## 13. Spezifische Leistungsdaten

### 13.1. Analytische Leistung

#### 13.1.1. Analytische Sensitivität

Der kleinste messbare Unterschied in RQ-Werten und Ct-Werten wurde anhand drei Verdünnungsstufen von mimic-miRNA-Proben, bestehend aus miR-371a-3p und Referenz-miR, gemessen. Jede Verdünnung wurde in 10 Replikaten mit einer Kit-Charge gemessen. Daraus resultierte, dass der kleinste messbare Unterschied bei 0,52 pmol/l liegt.

#### 13.1.2. Analytische Spezifität

Drei verschiedene patientensimulierende Proben (hohe, mittlere, keine miR-371a-3p-Expression) wurden mit starker, geringer sowie ohne Verunreinigung (DNA, Protein-Kontamination) gemessen. Für alle Messungen wurde die gleiche M371-Test-Kit-Charge verwendet. Die Ergebnisse wurden durch eine Regressionsanalyse untersucht.

Der Ct-Wert der miR-371a-3p stieg bei stark exprimierenden Proben durch die Verunreinigung an. Dies kann zu einem niedrigeren RQ führen ( $p=0,005$ ,  $R^2=0,698$ ).

Bei moderat exprimierenden Proben führte die Verunreinigung mit DNA/Protein zu signifikant höheren Ct-Werten von miR-371a-3p und Referenz-miR sowie RQ-Werten ( $p=0,001$ ,  $R^2=0,798$ ;  $p=0,004$ ,  $R^2=0,711$ ;  $p=0,001$ ,  $R^2=0,812$ ).

In Anbetracht der Ergebnisse sollte besonders auf eine korrekte miRNA-Extraktion gemäß Herstellerprotokoll geachtet werden, um eine mögliche Kontamination einer Patientenprobe zu vermeiden.

#### 13.1.3. Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LoD, LoQ)

Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (Limit of Detection (LoD) & Limit of Quantification (LoQ)) des M371-Tests wurde in einer Verdünnungsreihe der miR-371a-3p mit sechs Verdünnungsstufen sowie der Referenz-miR in konstanter Konzentration mit je sechs Replikaten bestimmt. Alle Messungen wurden mit einer M371-Test-Kit-Charge durchgeführt.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde vorab so definiert, dass mindestens 5/6 Verdünnungen detektierbar sein müssen. Dies war im Versuch bis zu einer Konzentration von 7,575 fM der Fall. Der Variationskoeffizient betrug 77,33 %.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurde vorab so definiert, dass der Variationskoeffizient höchstens 50 % betragen sollte. Dies war bis zu einer Konzentration von 30,3 fM der Fall. Für diese Konzentration liegt der Variationskoeffizient bei 44,07 %. Der mittlere RQ am LoD liegt bei 1,05; der mittlere RQ am LoQ liegt bei 8,71. Dies bedeutet, dass das LoQ knapp über dem Cut-off-Wert von  $RQ = 5$  liegt. Da Werte unter 8,71 nicht genau quantifiziert werden können, wurde der Cut-off-Wert für die Primärdiagnose zu einem Cut-off-Bereich erweitert, der RQ-Werte von 5 bis 10 umfasst. Werte innerhalb dieses Bereichs können nicht genau gemessen werden und gelten als unbestimmt (INDETERMINATE).

#### 13.1.4. Linearität

Für die Messung der Linearität wurde eine mimic-miRNA-Probe in einer Konzentration von 500 pM sechsmal 1:10 verdünnt. Jede Verdünnung wurde dreimal unabhängig vom selben Operator mit einer M371-Test-Kit-Charge an unterschiedlichen Tagen gemessen. Daraus ergab sich eine Effizienz der PCR von durchschnittlich 90 %, der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) lag bei 0,993-0,997. Bei Betrachtung der miR-371a-3p-Ct-Werte befanden sich Konzentrationen von 5 fM bis 500 fM im linearen Bereich. Bei einer Konzentration von 0,5 fM war die miR-371a-3p nicht detektierbar.

### 13.2. Präzision

#### 13.2.1. Wiederholungspräzision

Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse wurde durch wiederholtes Testen von Proben mit vier unterschiedlichen Konzentrationen (hohe, mittlere, geringe und keine miR-371a-3p-Expression) ermittelt. Jede Probe wurde in 30 Replikaten mit einer Charge des M371-Test-Kits von einem Operator prozessiert. Der Variationskoeffizient für Proben mit hoher und mittlerer Expression beträgt ca. 14 %. Für niedrig exprimierende Proben beträgt der Variationskoeffizient bis zu 85 %, aus diesem Grund muss die Quantifizierungsgrenze bei der Auswertung beachtet werden. Proben, die tumorfreie Patienten repräsentieren, können einen Variationskoeffizienten von 127 % aufweisen. Dies wurde bei einer Konzentration von 5 fM beobachtet. Da diese Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze (7,575 fM) liegt, ist ein höherer Variationskoeffizient unproblematisch.

#### 13.2.2. Vergleichspräzision

Für die Vergleichspräzision wurden folgende Parameter untersucht:

- Unterschiedliche Operatoren
- Unterschiedliche Verbrauchsmaterialien (qPCR-Platten)
- Unterschiedliche Labore (unterschiedliche PCR-Cycler und qPCR-Cycler-Instrumente (LightCycler® 480II))

Pro Operator wurden vier unterschiedliche Konzentrationen an Proben in zwei Replikaten gemessen (hohe, mittlere, niedrige und keine miR-371a-3p-Expression). Pro Plattentyp wurden vier Konzentrationen (hohe, mittlere, niedrige und keine miR-371a-3p-Expression) mit je vier Replikaten gemessen. Pro Labor wurden vier Konzentrationen (hohe, mittlere, niedrige und keine miR-371a-3p-Expression) mit je vier Replikaten gemessen.

Operatoren und Verbrauchsmaterialien wie qPCR-Platten hatten keinen signifikanten Einfluss auf den RQ der untersuchten Proben ( $p= 0,09 - 0,33$ , Kruskal Wallis bzw.  $p= 0,25 - 0,81$ , Mann-Whitney U). Beim Vergleich zweier Labore ergab sich im höheren Bereich des RQ ein signifikanter Unterschied ( $p=0,014$ , Mann-Whitney U im RQ-Bereich 200-2000). Dieser betraf allerdings nicht den Bereich der klinischen Entscheidungsgrenze ( $RQ= 10$ ) und bewegte sich für den Variationskoeffizient in einem Bereich von 21-22 %.

### 13.3. Klinische Leistungsfähigkeit

Die klinische Leistungsfähigkeit des M371-Tests wurde unter anderem in einer multizentrischen Studie an 37 Kliniken aus Deutschland, Österreich, der Schweiz, Ungarn und Italien nachgewiesen (Dieckmann et al., 2019). Für die Studie wurden Serumproben von 616 Patienten mit Keimzelltumoren und von 258 Kontrollpatienten mit dem M371-Test gemessen. Zur Bestimmung der klinischen Leistungsfähigkeit für

die Primärdiagnostik wurden Proben von 522 Tumorpatienten, davon 323 Seminome und 199 Nichtseminome, mit Proben von 258 Kontrollpatienten verglichen.

In der Primärdiagnose von Keimzelltumoren wies der M371-Test eine Sensitivität von 91,8 % und eine Spezifität von 96,1 % auf. Die AUC (Fläche unter der ROC-Kurve) betrug 0,970 und der positive Vorhersagewert lag bei 97,2 % (Tabelle 12).

Tabelle 12: Klinische Leistungsmerkmale des M371-Tests (aus Dieckmann et al. 2019).

Gruppe	AUC	Sensitivität	Spezifität	PPW*	NPW*	LR+	LR-
KZT (n=522) vs. Kontrollen (n=258)	0.970 (0.958 – 0.981)	91.8 (89.1 – 94.0)	96.1 (93.0 – 98.1)	97.2 (92.9 – 99.2)	82.7 (74.0 – 89.45)	23.675 (12.89 – 43.49)	0.086 (0.06 – 0.11)
Seminome (n=323) vs. Kontrollen (n=258)	0.964 (0.949 – 0.979)	89.8 (85.9 – 92.8)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-
Nichtseminome (n=199) vs. Kontrollen (n=258)	0.978 (0.962 – 0.994)	95.0 (91.0 – 97.6)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-
CS I (n=371) vs. Kontrollen (n=258)	0.958 (0.942 – 0.974)	88.9 (85.3 – 92.0)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-
CS II/III (n=151) vs. Kontrollen (n=258)	0.998 (0.995 – 1.0)	98.7 (95.3 – 99.8)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-
Rezidive (n=46) vs. Kontrollen (n=258)	0.921 (0.862 – 0.981)	82.6 (68.6 – 92.2)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-

\*Die klinischen Leistungsmerkmale für den PPW und NPW basieren auf n = 155 KZT und n = 90 Kontrollen. AUC: Area under the curve (Fläche unter der Kurve), CS: Clinical stage (klinisches Stadium), KZT: Keimzelltumor, LR+: Positiver likelihood-ratio, LR-: Negativer likelihood-ratio, PPW: Positiv prädiktiver Wert, NPW: Negativ prädiktiver Wert. Werte in Klammern = 95 % Konfidenzintervall.

Rezidive von KZT-Patienten konnten in 10 von 10 bzw. 4 von 4 Rezidiven mittels erhöhter miR-371a-3p Expression korrekt bestimmt werden (Dieckmann et al., 2017; van Agthoven et al., 2017). Eine andere Gruppe zeigte bei Proben von 10 TGCT-Patienten einen Anstieg der miR-371a-3p-Expression während eines Rückfalls (Terbuch et al., 2018).

Dieckmann et al. zeigten eine Sensitivität von 83 % bei n = 46 TGCT-Rezidiven mit einer Normalisierung der miR-371a-3p-Serumwerte nach erfolgreicher Rezidivtherapie (Dieckmann et al., 2019). Ein Anstieg von miR-371a-3p beim Rezidiv wurde auch von Rosas Plaza et al. festgestellt (Rosas Plaza et al., 2019).

In einer Serie von n = 151 klinischen TGCT-Patienten im Stadium 1 fanden Lobo und Kollegen n = 34 Fälle von Rückfällen. Davon konnten sie n = 32 (94 %) mit der miR-371a-3p-Messung nachweisen, während der klassische Goldstandard (AFP und bHCG) nur in 38 % der Fälle erhöht war (Lobo et al., 2020).

Die Zuverlässigkeit, mit der die miR-371a-3p-Expression Rezidive nachweist, konnte weiterhin von Fankhauser et al. bekräftigt werden. In einer Studie mit 30 Patienten konnte eine erhöhte miR-371a-

3p-Expression in 10/10 Patienten mit Rezidiven festgestellt werden, wohingegen miR-371a-3p nur in einem Patienten ohne Rezidiv erhöht war (Fankhauser et al., 2022). Diese Erhöhung normalisierte sich bereits bei der nächsten Messung, was darauf hindeutet, dass auch nach einer erhöhten Expression der Anstieg der miR-371a-3p verfolgt werden sollte. Rezidive konnten im Median zwei Monate früher als mit den herkömmlichen Methoden gemessen werden, bei einem Patienten allerdings sogar über fünf Monate früher (Fankhauser et al., 2022).

Die aktuell umfangreichste Studie zur Leistungsfähigkeit des M371-Tests in der Nachsorge von Patienten mit testikulären Keimzelltumoren im klinischen Stadium I schloss 258 Patienten ein und beobachtete diese über einen medianen Zeitraum von 18 Monaten. Der Test war bei allen 39 Patienten, die in diesem Zeitraum ein Rezidiv entwickelten, positiv. Rezidive wurden mit einer Sensitivität von 100 % erkannt, gleichzeitig wurde eine Spezifität von 96,3 % erzielt (Belge et al., 2024). Zu beachten ist hierbei, dass in dieser Nachsorgestudie eine relative Expression von RQ = 15 als Cut-off zur Erkennung von Rezidiven verwendet wurde, der sich von dem in der Primärdiagnose verwendeten Cut-off (RQ = 5, Dieckmann et al., 2019) unterscheidet (siehe auch „2. Technologische Grundlagen des Testverfahrens“). Mit den klassischen Serummarkern bHCG und AFP konnten Rezidive zwar mit einer Spezifität von 91,8 % detektiert werden, allerdings erzielten sie eine Sensitivität von lediglich 45,2 %. Weitere Details zu Sensitivität, Spezifität sowie positiven und negativen Vorhersagewerten des M371-Tests im Vergleich zu den klassischen Serummarkern in der Nachsorge von Patienten mit Keimzelltumoren im klinischen Stadium I sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13. Klinische Leistungsmerkmale des M371-Tests in der Nachsorge von CS I KZT-Patienten im Vergleich mit den klassischen Serummarkern (aus Belge et al., 2024).

Marker	Klin. bestätigte Rezidive			Rezidivfreie Fälle				PPW [%]	NPW [%]	
	n	WP	FN	Sensitivität [%]	n	WN	FP			Spezifität [%]
M371, alle KZT	39	39	0	100,0 (100,0 – 100,0)	219	211	8	96,3 (93,9 – 98,8)	83,0 (72,2 – 93,7)	100,0 (100,0 – 100,0)
M371, S	17	17	0	100,0 (100,0 – 100,0)	172	166	6	96,5 (93,8 – 99,3)	73,9 (56,9 – 91,8)	100,0 (100,0 – 100,0)
M371, NS	22	22	0	100,0 (100,0 – 100,0)	47	45	2	95,7 (92,9 – 100,0)	91,7 (80,7 – 100,0)	100,0 (100,0 – 100,0)
bHCG	31	11	20	35,5 (19,2 – 54,6)	196	192	4	98,0 (94,9 – 99,4)	73,3 (51,0 – 95,7)	90,6 (86,6 – 94,5)
AFP	32	8	24	25,0 (11,5 – 43,4)	196	184	12	93,9 (89,5 – 96,8)	40,0 (18,5 – 61,5)	88,5 (84,1 – 92,8)
bHCG / AFP	31	14	17	45,2 (27,3 – 64,0)	196	180	16	91,8 (87,1 – 95,3)	46,7 (28,8 – 64,5)	91,4 (87,4 – 95,3)

KZT: Keimzelltumor, S: Seminom, NS: Nichtseminom, bHCG/AFP: Fälle mit mindestens einem positiven Serummarker bHCG und/oder AFP, n: erfasste Fallzahl, WP: Wahr-positiv, FN: Falsch-negativ, WN: Wahr-negativ, FP: Falsch-positiv, NPW: Negativ prädiktiver Wert, PPW: Positiv prädiktiver Wert. Werte in Klammern = 95 % Konfidenzintervall.

## 13.4. Interferenz

### 13.4.1. Hämolyse

Eine erhöhte Hämolyse führt zu einer vermehrten Freisetzung der im Test detektierten Referenz-miR. Daraus resultiert eine erhebliche Verminderung der Ct-Werte der Referenz-miR, die zu verfälschten RQ-Werten und im ungünstigsten Fall zu einem falsch-negativen Testergebnis führen kann. Zwanzig Seren von Patienten wurden auf Hämolyse anhand der Verfärbung und durch photometrische Messung (414 nm) untersucht. Jede Probe wurde mit dem M371-Test einfach gemessen. Der Grad an Hämolyse hatte einen signifikanten Einfluss auf die Messung der Referenz-miR ( $p=0,002$ ). Ein höherer Grad an Hämolyse hat einen niedrigeren Ct-Wert der Referenz-miR zur Folge ( $R^2=0,437-0,743$ ).

### 13.4.2. Andere medizinische Zustände

Bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung wurden erhöhte Konzentrationen der Referenz-miR im Hirngewebe beobachtet (Song et al., 2019). Ob auch im Serum dieser Patienten erhöhte Konzentrationen der Referenz-miR vorliegen, die das Testergebnis verfälschen könnten, ist derzeit nicht bekannt. Positive Testergebnisse wurden bei schwangeren Frauen beobachtet, die jedoch nicht zur Zielgruppe der zu analysierenden Patienten gehören. Neueste Studien deuten an, dass die miR-371a-3p bei Patienten mit Covid-19 Erkrankung erhöht sein könnte (Goebel et al., 2022). Sollten sich diese Studien bestätigen, wird im Verdachtsfall empfohlen, den Covid-19-Status der Patienten parallel zu untersuchen.

### 13.4.3. Cross-Reactivity

Folgende Substanzen wurden auf eine Interferenz mit dem M371-Test getestet: DNA-Verunreinigung, Proteine, EDTA, Citrate, Heparin, ähnliche miR-Sequenzen (miR-372-3p).

Für die Interferenztestung wurde CLSI Interference Testing in Clinical Chemistry 3rd ed. genutzt. Initial wurde eine Serumprobe für jeden Interferenten in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen eine mit einer dreimal höheren Konzentration an Interferent angereichert wurde, als normalerweise zu erwarten wäre. Die andere Gruppe wurde nicht mit Interferenten angereichert und diente als Kontrolle. Jede Gruppe wurde in 7 Replikaten gemessen. Überstieg der Unterschied des Ergebnisses ein vorher festgelegtes Maß (50 %) der Test-Gruppe zur Kontrollgruppe, wurde ein Dose-Response Experiment durchgeführt.

Bei Verunreinigungen mit DNA, Protein und Heparin zeigte sich ein Einfluss auf den RQ und das Ergebnis des Tests bereits bei sehr geringen Verunreinigungen.

Obwohl die empfohlene miRNA-Isolierung und ähnliche Methoden DNA und Protein aus den Serumproben entfernen, kann ein Nicht-Beachten des Herstellerprotokolls eine Kontamination der Patientenproben mit DNA oder Protein nach sich ziehen. Diese Kontamination kann zu verfälschten Ergebnissen führen. Die mir|detect GmbH empfiehlt deshalb dringend, den Herstellerprotokollen strikt zu folgen.

Da bereits geringe Mengen Heparin die Ergebnisse der Patientenproben beeinflussen können, empfiehlt mir|detect GmbH die Verwendung von Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® Serum-Gel zur Blutabnahme bzw. Serumgewinnung.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Zukunft weitere mögliche Interferenzen detektiert werden.

## 13.5. Summary of Safety and Performance (Kurzbericht für Sicherheit und Leistung)

Der aktuelle Kurzbericht für Sicherheit und Leistung („Summary of Safety and Performance“) kann über EUDAMED eingesehen (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>) oder über das Kontaktformular auf [www.mirdetect.de/Service](http://www.mirdetect.de/Service) angefordert werden.

## 14. Bedeutung von Symbolen

Die Verwendung von Symbolen erfolgt anhand der DIN EN ISO 15223-1:2021 (Medizinprodukte - Bei Aufschriften von Medizinprodukten zu verwendende Symbole, Kennzeichnung und zu liefernde Informationen - Teil 1: Allgemeine Anforderungen (ISO 15223-1:2016, korrigierte Fassung 2017-03); Deutsche Fassung EN ISO 15223-1:2016).

Im Folgenden sind die Symbole mit ihren Bedeutungen dargestellt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Darstellung von Symbolen und ihren Bedeutungen.

	CE-Kennzeichnung + Code der Benannten Stelle (XXXX)
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Artikelnummer
	Chargennummer
	Hersteller
	Distributor
	Ausreichend für <n> Prüfungen
	Vor Sonnenlicht schützen
	Temperaturbegrenzung
	Verwendbar bis
	Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden

## 15. Änderungen zu vorherigen Gebrauchsanweisungen

### 15.1. Änderungen zu Version 10

- Aktualisierung des Distributor-Firmennamens
- Hinzufügen einer Tabelle für die Interpretation der M371-Testergebnisse in Abhängigkeit vom klinischen Szenario in Kapitel 2 Technologische Grundlagen des Testverfahrens
- Erläuterung zur RQ-Berechnung in Kapitel 2 Technologische Grundlagen des Testverfahrens
- Hinweis auf die zum Download verfügbaren Dokumente auf der mirdetect Website in Kapitel 3.3 Accessoires
- Hinzufügen des Kapitels 3.4 Gefahrstoffe und tierische Bestandteile im M371-Test-Kit
- Korrektur der Transporttemperatur in Kapitel 4
- Neue Abbildung für die qPCR-Plattenbelegung in Kapitel 9.5
- Entfernung des Symbols „non-sterile“ aus der Tabelle in Kapitel 14
- Aktualisierung Kapitel 10.2 Ergebnisanalyse (LightCycler® Instrument)
- Aktualisierung von Kapitel 12 Grenzen des Verfahrens
- Aktualisierung Kapitel 13 Spezifische Leistungsdaten

### 15.2. Änderungen zu Version 11

- Korrektur von Formulierungs- und Rechtschreibfehlern
- Hinzufügen des Codes der Benannten Stelle neben dem CE-Symbol auf dem Deckblatt
- Hinweis auf IVDR-Zertifizierung des M371-Tests in Kapitel 1
- Auflistung der reaktiven Komponenten des M371-Tests in Kapitel 3.2
- Aufnahme der Real-Time PCR-Cycler QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) mit 96-Well Heizblock und „Design and Analysis“ Software, Version 1.4.x und Aria Dx (Agilent) mit Software-Version 2.0 in Kapitel 5.1
- Entfernung der optionalen Positivprobe aus Kapitel 3 und 9, den zugehörigen Tabellen sowie Kapitel 18.1 zur Mastermix-Ansatz-Berechnung
- Ersatz des Kapitels „Accessoires“ durch Kapitel „3.3 Informationen und Dokumente zum M371-Test“ und „3.4 Optionales Zubehör“
- Hinweis zur optionalen M371-Test-Auswertdatei, welche nur als englische Version „M371-Test Evaluation File“ verfügbar ist in Kapitel 3.4 und 10.1
- Darstellung der wichtigen Hinweise in Kapitel 9.1 in Unterpunkten zur besseren Übersichtlichkeit sowie Hinzufügen zwei neuer Hinweise zur Verwendung von Kühlblöcken / Cooling Racks und dem Aktivieren des Heizdeckels bei PCR-Cyclern.
- Änderung der Bezeichnung „Primer Hybridisierung“ zu „Annealing“ in Tabelle 6 und 8
- Hinweis zur Aktivierung des Heizdeckels in Kapitel 9.2, 9.3 und 11
- Neuer Hinweis zur Mischung und Zentrifugation von Präamplifikaten in Kapitel 9.5
- Hinzufügen einer Tabelle für die Heiz- und Kühlraten der validierten Cycler-Systeme sowie Vereinfachung der Tabelle zum qPCR-Cycler-Temperaturprofil in Kapitel 9.6
- Hinweis auf die zwei separaten Ergebnisspalten in der M371-Test Auswertdatei und Hinzufügen einer Tabelle für die gerätespezifischen Analyseinstellungen von validierten Cycler-Systemen in Kapitel 10.2
- Detailliertere Beschreibung der erhöhten Expression der Referenz-miR bei Alzheimer-Patienten in Kapitel 12 und 13.4.2
- Korrektur der analytischen Sensitivität zu 0,52 pmol/l in Kapitel 13.1.1
- Zusätzliche Auflistung der Änderungen zu Version 10 in Kapitel 15.1
- Aktualisierung der E-Mail-Adresse des Distributors in Kapitel 17.3

## 16. Referenzen

Belge G, Dumlupinar C, Nestler T, Klemke M, Törzsök P, Trenti E, Pichler R, Loidl W, Che Y, Hiester A, Matthies C, Pichler M, Paffenholz P, Kluth L, Wenzel M, Sommer J, Heinzlbecker J, Schriefer P, Winter A, Zengerling F, Kramer MW, Lengert M, Frey J, Heidenreich A, Wülfing C, Radtke A, Dieckmann KP. Detection of recurrence through microRNA-371a-3p serum levels in a follow-up of stage I testicular germ cell tumors in the DRKS-00019223 study. *Clin Cancer Res.* 2024; 30: 404-412. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-23-0730](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-0730).

Dieckmann KP, Radtke A, Spiekermann M, Balks T, Matthies C, Becker P, Ruf C, Oing C, Oechsle K, Bokemeyer C, Hammel J, Melchior S, Wosniok W, Belge G. Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. *Eur Urol.* 2017; 71: 213-220. doi: [10.1016/j.eururo.2016.07.029](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.07.029).

Dieckmann KP, Radtke A, Geczi L, Matthies C, Anheuser P, Eckardt U, Sommer J, Zengerling F, Trenti E, Pichler R, Belz H, Zastrow S, Winter A, Melchior S, Hammel J, Kranz J, Bolten M, Krege S, Haben B, Loidl W, Ruf CG, Heinzlbecker J, Heidenreich A, Cremers JF, Oing C, Hermanns T, Fankhauser CD, Gillissen S, Reichegger H, Cathomas R, Pichler M, Hentrich M, Eredics K, Lorch A, Wülfing C, Peine S, Wosniok W, Bokemeyer C, Belge G. Serum Levels of MicroRNA-371a-3p (M371-Test) as a New Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Results of a Prospective Multicentric Study. *J Clin Oncol.* 2019; 37: 1412-1423. doi: [10.1200/JCO.18.01480](https://doi.org/10.1200/JCO.18.01480).

Fankhauser, C.D., Christiansen, A.J., Rothermundt, C. et al. Detection of recurrences using serum miR-371a-3p during active surveillance in men with stage I testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2022; 126: 1140–1144. doi: [10.1038/s41416-021-01643-z](https://doi.org/10.1038/s41416-021-01643-z).

Goebel H, Koeditz B, Huerta M, Kameri E, Nestler T, Kamphausen T, Friemann J, Hamdorf M, Ohrmann T, Koehler P, Cornely OA, Montesinos-Rongen M, Nicol D, Schorle H, Boor P, Quaas A, Pallasch C, Heidenreich A, von Brandenstein M. COVID-19 Infection Induce miR-371a-3p Upregulation Resulting in Influence on Male Fertility Biomedicines. 2022; 10: 858. doi: [10.3390/biomedicines10040858](https://doi.org/10.3390/biomedicines10040858).

Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 304: E836-E843. doi: [10.1152/ajpendo.00660.2012](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00660.2012).

Lobo J, Leão R, Gillis AJM, van den Berg A, Anson-Cartwright L, Atenafu EG, Kuhathaas K, Chung P, Hansen A, Bedard PL, Jewett MAS, Warde P, O'Malley M, Sweet J, Looijenga LHJ, Hamilton RJ. Utility of Serum miR-371a-3p in Predicting Relapse on Surveillance in Patients with Clinical Stage I Testicular Germ Cell Cancer. *Eur Urol Oncol.* 2020; S2588-9311(20)30180-2. doi: [10.1016/j.euo.2020.11.004](https://doi.org/10.1016/j.euo.2020.11.004).

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408. doi: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).

Myklebust MP, Rosenlund B, Gjengstø P, Bercea BS, Karlsdottir Á, Brydøy M, Dahl O. Quantitative PCR Measurement of miR-371a-3p and miR-372-p Is Influenced by Hemolysis. *Front. Genet.* 2019; 10: 463. doi: [10.3389/fgene.2019.00463](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00463).

Rosas Plaza X, van Agthoven T, Meijer C, van Vugt MATM, de Jong S, Gietema JA, Looijenga LHJ. miR-371a-3p, miR-373-3p and miR-367-3p as Serum Biomarkers in Metastatic Testicular Germ Cell Cancers Before, During and After Chemotherapy. *Cells.* 2019; 8: 1221. doi: [10.3390/cells8101221](https://doi.org/10.3390/cells8101221).

Song Y, Hu M, Zhang J, Teng ZQ, Chen C. A novel mechanism of synaptic and cognitive impairments mediated via microRNA-30b in Alzheimer's disease. EBioMedicine. 2019; 39: 409-421. doi: [10.1016/j.ebiom.2018.11.059](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.059).

Terbuch A, Adiprasito JB, Stiegelbauer V, Seles M, Klec C, Pichler GP, Resel M, Posch F, Lembeck AL, Stöger H, Szkandera J, Pummer K, Bauernhofer T, Hutterer GC, Gerger A, Stotz M, Pichler M. MiR-371a-3p Serum Levels Are Increased in Recurrence of Testicular Germ Cell Tumor Patients. Int J Mol Sci. 2018; 19: 3130. doi: [10.3390/ijms19103130](https://doi.org/10.3390/ijms19103130).

van Agthoven T, Eijkenboom WMH, Looijenga LHJ. microRNA-371a-3p as informative biomarker for the follow-up of testicular germ cell cancer patients. Cell Oncol (Dordr). 2017; 40: 379-388. doi: [10.1007/s13402-017-0333-9](https://doi.org/10.1007/s13402-017-0333-9).

## 17. Informationen für den Käufer

### 17.1. Hersteller



mir|detect GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven, Deutschland

Für weitere Informationen und Hilfestellungen besuchen Sie unsere Internetpräsenz oder senden Sie uns bitte eine E-Mail bzw. rufen Sie uns an:

Website: <https://www.mirdetect.de>  
E-Mail: [info@mirdetect.de](mailto:info@mirdetect.de)  
Telefon: +49 (0) 421 / 40 89 37 11-0

### 17.2. Trademarks

Alle in diesem Dokument genannten Warenzeichen, Marken und Namen sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

### 17.3. Distributor



**Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH**  
Waldstraße 23 A6  
63128 Dietzenbach

E-Mail: [Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com)  
Phone: +49 6074 23698-0

## 18. Anhang

### 18.1. Vorlagen für die Herstellung des cDNA-Synthese-Mastermixes (MM)

Tabelle 15: Pipettierschema für die Herstellung eines cDNA-Synthese-Mastermixes für 2, 3, 4 und 5 Proben (inkl. 10 % Überschussvolumen), Rxn = Reaktionen.

Reagenz \ Mastermix (MM)	MM (2 Proben)	MM (3 Proben)	MM (4 Proben)	MM (5 Proben)
	3 Rxn (inkl. NC & Überschuss) [µl]	4 Rxn (inkl. NC & Überschuss) [µl]	5 Rxn (inkl. NC & Überschuss) [µl]	6 Rxn (inkl. NC & Überschuss) [µl]
cDNA Solution (schwarz)	25,77	34,36	42,96	51,55
Reverse Transcriptase (gelb)	3,3	4,4	5,5	6,6
RNase Inhibitor (durchsichtig)	0,63	0,84	1,05	1,25
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>29,7</b>	<b>39,6</b>	<b>49,5</b>	<b>59,4</b>