



M371-Test

Diagnóstico in-vitro – utilização apenas por parte de utilizador experiente

REF MCS0105

REF MCS0115HT

Leia com atenção e cumpra este manual de instruções antes de usar o teste, para garantir a eficácia dos resultados do teste.



Versão 12, © mir|detect GmbH, versão 11.04.2024.



mir|detect GmbH, Fischkai 1,
27572 Bremerhaven, Deutschland
www.mirdetect.de

Índice

1.	Nome e finalidade do produto	4
2.	Bases tecnológicas do processo de teste	4
3.	Reagentes incluídos no kit.....	6
3.1.	Componentes	6
3.2.	Componentes reativos do M371-Test.....	7
3.3.	Informações e documentos sobre o M371-Test	7
3.4.	Acessórios opcionais para o M371-Test.....	7
3.5.	Substâncias perigosas e componentes de origem animal no kit do M371-Test.....	7
4.	Transporte, armazenamento e estabilidade	8
5.	Equipamento adicionalmente necessário	9
5.1.	Equipamento geral de laboratório	9
5.2.	Consumíveis gerais e reagentes	9
5.3.	Requisitos do aparelho.....	10
6.	Medidas preventivas	10
6.1.	Medidas preventivas no laboratório	10
6.2.	Medidas preventivas para proteger contra infeções	10
6.3.	Comunicação de eventos relacionados com o produto	11
6.4.	Eliminação de materiais de trabalho e reagentes.....	11
7.	Controlo de qualidade.....	12
8.	Recolha e processamento de amostras	12
8.1.	Recolha e armazenamento de sangue	12
8.2.	Obtenção, armazenamento e transporte de soro.....	12
8.3.	Medidas preventivas na obtenção de soro	13
8.4.	Extração miRNA.....	13
9.	Realização do M371-Test	14
9.1.	Realização geral do teste.....	14
9.2.	Realização da síntese cDNA.....	15
9.3.	Realização da pré-amplificação	17
9.4.	Preparação das amostras pré-amplificadas	18
9.5.	Disposição da placa qPCR.....	18
9.6.	Carregar a placa qPCR	19
10.	Análise de resultados	20
10.1.	Ficheiro de avaliação do M371-Test e importação de dados.....	20
10.2.	Análise de resultados	21

10.2.1. Controlo negativo.....	22
10.2.2. Referência miR	22
10.2.3. Avaliação das amostras	22
11. Guia da resolução de erros (Troubleshooting Guide)	23
12. Limites do processo.....	24
13. Dados de desempenho específicos	25
13.1. Desempenho analítico.....	25
13.1.1. Sensibilidade analítica	25
13.1.2. Especificidade analítica	25
13.1.3. Limite de prova e de quantificação (LoD, LoQ)	25
13.1.4. Linearidade	26
13.2. Precisão	26
13.2.1. Precisão de repetição	26
13.2.2. Precisão de comparação	26
13.3. Capacidade clínica	26
13.4. Interferência.....	29
13.4.1. Hemólise.....	29
13.4.2. Outros estados médicos.....	29
13.4.3. Cross-Reactivity	29
13.5. Summary of Safety and Performance (Breve relatório sobre segurança e desempenho) ...	30
14. Significado dos símbolos	30
15. Alterações aos manuais de instruções anteriores.....	31
15.1. Alterações à versão 10	31
15.2. Alterações à versão 11	31
16. Referências.....	32
17. Informações para o comprador.....	33
17.1. Fabricante.....	33
17.2. Marcas comerciais.....	33
17.3. Distribuidor.....	33
18. Anexo.....	34
18.1. Documentos relativos ao fabrico do cDNA-Synthese-Mastermix (MM).....	34

1. Nome e finalidade do produto

O M371-Test é um diagnóstico in-vitro (IVD) com certificação conforme o regulamento (EU) 2017/746 IVDR, que se baseia na medição da relativa frequência (RQ) do marcador tumoral miR-371a-3p. Para tal, quantifica-se miR-371a-3p e um controlo endógeno em 200 µl de soro sanguíneo por qPCR.

O M371-Test é um teste não automatizado com uma interpretação de resultados qualitativa, que comprova a existência de tumores de células germinais testiculares (KZT tipo II ou Germ Cell Neoplasia in situ derived testicular germ cell tumor (GCNIS-derived TGCT)) em inglês) e pode ser utilizado para o diagnóstico e controlo do processo (inglês “follow-up monitoring”) deste tumor por utilizadores experientes. A população de teste engloba pacientes masculinos adultos com suspeita ou confirmação de um tumor de células germinais testiculares (tipo II, GCNIS-derived TGCT). O resultado do teste não pode ser usado para o diagnóstico primário único de um tumor de células germinais testiculares ou como prova de recidiva. Cada M371-Test positivo deve ser confirmado por um processo adequado do diagnóstico clínico.

2. Bases tecnológicas do processo de teste

O kit M371-Test inclui todos os reagentes necessários à realização do teste de sangue para comprovar tumores de células germinais dos testículos a partir de miRNA extraídos. Para avaliar as amostras é disponibilizado um ficheiro de avaliação opcional do M371-Test.

O processo de prova baseia-se no comprovativo baseado em fluorescência do microRNA (miRNA) miR-371a-3p através de PCR quantitativo em tempo real. Para medir este marcador tumoral, é preciso isolar o RNA, inclusivamente o miRNA, a partir da amostra do paciente (soro). Os reagentes para este primeiro passo de isolamento **não** estão incluídos no kit.

No próximo passo, o marcador tumoral miR-371a-3p, bem como um miRNA adicional, que serve de controlo endógeno (doravante: referência miR), são transcritos com iniciadores específicos no cDNA. No seguinte passo de pré-amplificação, o cDNA é amplificado num PCR (pré-amplificação). De seguida, através do PCR quantitativo, determina-se a frequência relativa do marcador tumoral miR-371a-3p e normaliza-se através da referência miR. Quanto mais cedo for possível detetar um sinal de fluorescência durante o qPCR, mais moléculas do marcador tumoral ou da referência miR existiam na amostra. Estes valores são reproduzidos como valores “Ct”. A frequência relativa (RQ) de miR-371a-3p é calculada, segundo o método $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001) pela referência miR e um valor fixo (calibrador). Em primeiro lugar, o valor ΔCt é calculado para cada amostra: $\Delta Ct = Ct(\text{miR-371a-3p}) - Ct(\text{referência miR})$. Em seguida, é calculada a diferença entre o valor ΔCt da amostra e o valor ΔCt do calibrador, cuja expressão relativa do miR-371a-3p é igual a 1: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$. A expressão relativa é calculada usando a seguinte fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor RQ é um múltiplo da expressão do calibrador. Este cálculo pode executar o ficheiro de avaliação opcional disponibilizado (“M371-Test Evaluation file” ver capítulo 3.4. Acessórios opcionais para o M371-Test) após a transmissão correta dos valores Ct medidos.

Os resultados do M371-Test devem ser avaliados tomando em consideração o cenário clínico, dependendo se o teste é utilizado para um diagnóstico primário ou para identificar recidivas no acompanhamento de pacientes com tumores testiculares (Tabela 1). No âmbito de um diagnóstico primário, não é possível uma afirmação clara para amostras com uma frequência relativa entre 5 e 10 (INDETERMINATE), pois é aqui que se encontra a faixa do limite de quantificação do teste. Neste caso, deve ser efetuado após algumas semanas outro M371-Test com uma amostra nova.

Tabela 1: interpretação dos resultados do M371-Test em função do cenário clínico.

Diagnóstico primário (deteção de tumores primários)	
RQ < 5	Negativo, reduzida probabilidade tumoral
$5 \leq RQ < 10$	Indefinido (INDETERMINATE), recomenda-se a repetição após algumas semanas
$RQ \geq 10$	Positivo, elevada probabilidade tumoral
Acompanhamento (deteção de recidivas)	
RQ < 15	Negativo, reduzida probabilidade de recidiva
$RQ \geq 15$	Positivo, elevada probabilidade de recidiva

Para explicações adicionais sobre a evidência científica, consulte o capítulo "13. Dados de desempenho específicos" deste manual de instruções.

Cada ciclo é realizado com um controlo negativo (NC). Para avaliar e validar os controlos, consulte o capítulo "10. Análise de resultados" deste manual de instruções.

3. Reagentes incluídos no kit

3.1. Componentes

O M371-Test é proposto em duas variantes (número de artigo MCS0105 e número de artigo MCS0115HT).

Número de artigo MCS0105 – inclui reagentes para cinco amostras de paciente e cinco controlos negativos. O utilizador pode medir cada amostra individualmente com um controlo negativo (ver tabela 2).

CUIDADO: Mede-se o controlo negativo na pré-amplificação e qPCR sempre apenas **uma vez!**

Tabela 2: Conteúdo do kit M371-Test MCS0105.

Reagente	Recipiente	Volume [µl]
cDNA Solution (preto)	1 Tubo de ensaio	135
Reverse Transcriptase (amarelo)	1 Tubo de ensaio	19,68
RNase Inhibitor (transparente)	1 Tubo de ensaio	3,74
PreAmp Solution (verde)	1 Tubo de ensaio	418
Target Solution (azul)	1 Tubo de ensaio	410
Control Solution (violeta)	1 Tubo de ensaio	410
PCR-grade water (branco)	1 Tubo de ensaio	1000

Número de artigo MCS0115HT – inclui reagentes para quinze amostras de paciente e um controlo negativo. O utilizador tem de medir todas as amostras **numa** passagem (ver tabela 3).

Tabela 3: Conteúdo do kit M371-Test MCS0115HT.

Reagente	Recipiente	Volume [µl]
cDNA Solution (preto)	1 Tubo de ensaio	153
Reverse Transcriptase (amarelo)	1 Tubo de ensaio	22,30
RNase Inhibitor (transparente)	1 Tubo de ensaio	4,24
PreAmp Solution (verde)	1 Tubo de ensaio	786
Target Solution (azul)	1 Tubo de ensaio	770
Control Solution (violeta)	1 Tubo de ensaio	770
PCR-grade water (branco)	1 Tubo de ensaio	1000

3.2. Componentes reativos do M371-Test

cDNA Solution (preto)

- Primer Stemloop específico para miRNA para o miRNA alvo e de referência

Reverse Transcriptase (amarelo)

- Transcriptase reversa

PreAmp Solution (verde)

- Primer específico para miRNA para o miRNA alvo e de referência
- DNA Polimerase

Target Solution (azul)

- Primer específico para miRNA e sonda para o miRNA alvo
- DNA Polimerase

Control Solution (violeta)

- Primer específico para miRNA e sonda para o miRNA de referência
- DNA Polimerase

3.3. Informações e documentos sobre o M371-Test

O manual de instruções, as fichas de dados de segurança e tutoriais em vídeo para a realização do teste estão disponíveis no website mir|detect em <https://www.mirdetect.de/download>. Caso seja publicado um manual de instruções editado, os clientes serão advertidos por e-mail para a nova versão.

3.4. Acessórios opcionais para o M371-Test

O ficheiro de avaliação do M371-Test ("M371-Test Evaluation File"; disponível apenas em inglês) é um software de cálculo de tabelas com fórmulas criadas para a avaliação de amostras são transmitidos em formato eletrónico (via e-mail). As versões atualizadas serão igualmente apresentadas por e-mail.

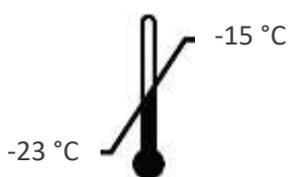
3.5. Substâncias perigosas e componentes de origem animal no kit do M371-Test

Os componentes PreAmp Solution, Target Solution e Control Solution contêm formamida em concentrações muito baixas. Nenhum componente do M371-Test é prejudicial à saúde. Para informações mais detalhadas sobre as concentrações pode ser consultada a ficha de dados de segurança do M371-Test (<https://www.mirdetect.de/download>).

Uma matéria-prima utilizada na produção da Target Solution e Control Solution contém gelatina de origem animal. O fabricante da matéria-prima garante que o risco de contaminação por BSE/TSE é insignificante. Além disso, o risco reduz com o uso de vestuário de trabalho protetor (luvas, batas de laboratório e óculos de segurança, ver capítulo "6. Medidas preventivas") e com a realização dos trabalhos sob uma bancada PCR durante a execução do M371-Test. O M371-Test pode apenas ser utilizado por pessoal técnico.

4. Transporte, armazenamento e estabilidade

O envio do M371-Test ocorre $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ via envio expresso. **No caso de danos de transporte, deve contactar imediatamente a empresa de transportes e também a mir|detect GmbH ou Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH.** Os dados de contacto estão disponíveis no capítulo "17. Informações para o comprador". Não deve usar tubos de ensaio de reagentes danificados, mas sim eliminá-los logo. Não devem ser misturados entre si componentes de diferentes lotes de kits.



Guarde todos os reagentes do kit antes e depois da primeira abertura entre -23°C e -15°C . Proteja a Target Solution (azul) e Control Solution (violeta) antes da incidência de luz. Cada componente pode ser descongelado até oito vezes e novamente congelado.



Se forem cumpridas as condições de armazenamento, tem validade até à data indicada no exterior do kit (máximo prazo de validade: dez meses). Não use materiais fora de prazo.

5. Equipamento adicionalmente necessário

5.1. Equipamento geral de laboratório

O seguinte equipamento de laboratório é necessário para realizar o M371-Test.

- Acessórios opcionais: ficheiro de avaliação do M371-Test ("M371-Test Evaluation file")*
- Bancada PCR
- Standard-PCR-Instrument
- Bloco de arrefecimento para os reservatórios de reação utilizados
- Misturador de vórtice
- Pipeta com volumes alteráveis em tamanhos adequados
- Opcional: dispensador eletrónico
- Centrífuga de bancada com um rotor para reservatório de reação de 0,2/1,5 ml
- Centrífuga de placas para placas PCR
- Real-time PCR-Instrument**

*O ficheiro de avaliação para o M371-Test foi validado com Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO.

** O M371-Test foi validado com os seguintes cicladores de PCR em tempo real:

- LightCycler® 480 II qPCR Instrument (Roche Diagnostics) com bloco de aquecimento de 96 poços e versão de software 1.5.x
- QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) com bloco de aquecimento de 96 poços e software "Design and Analysis", Versão 1.4.x
- AriaDx (Agilent) com versão do software 2.0

5.2. Consumíveis gerais e reagentes

Todos os consumíveis utilizados devem ser de polipropileno e isentos de RNasen, DNasen, DNA e inibidores PCR.

- Tubos de ensaio para recolha de sangue*
- Tubos criogénicos, independentes
- Kit de extração /miRNA**
- Reservatórios de reação de 1,5 ml com fundo cónico e tampa de segurança (PP)
- Reservatórios de reação PCR de 0,2 ml (p. ex., tiras de 8)
- Pontas de pipetas com filtro
- Opcional: Base para dispensador eletrónico
- Placas PCR com película aderente
- Aplicador para colar películas aderentes

* necessário para a obtenção de soro. Recomendado com gel de soro Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® (gel Z de 7,5 ml ou 9 ml); informações mais precisas sobre a obtenção de soro. no capítulo "8. Recolha e processamento de amostras".

** necessário para a extração de miRNA. O teste é recomendado para com kit de soro/plasma QIAGEN GmbH miRNeasy.

5.3. Requisitos do aparelho

A instalação, calibração, qualificação de funcionamento e manutenção de todos os aparelhos e equipamentos utilizados têm de ser realizadas de acordo com as indicações do fabricante e são da responsabilidade do utilizador do teste. É responsável também pela determinação dos respetivos processos de controlo de qualidade.

6. Medidas preventivas

O utilizador experiente é responsável pelo cumprimento dos regulamentos laboratoriais aplicáveis. Durante o trabalho com produtos químicos, deve usar sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção.

6.1. Medidas preventivas no laboratório

Devem ser cumpridas normas como, p. ex., DIN EN ISO 17025 ou DIN EN ISO 15189 para impedir o risco de contaminação cruzada de amostras de pacientes antes, durante e após a extração de RNA. Deve impedir que penetrem nucleases nas amostras durante a extração. Use exclusivamente pontas de pipetas descartáveis com filtro, para evitar uma contaminação cruzada entre amostras de pacientes.

Os resultados de medição podem ser influenciados por temperaturas exteriores muito elevadas. Guarde os reagentes e as amostras fora dos frigoríficos sempre em blocos de arrefecimento.

Os reagentes para qPCR (Control Solution (violeta) e Target Solution (azul)) são sensíveis à luz e, por isso, devem ser armazenados em local protegido da luz. A exposição excessiva à luz pode comprometer a sondas de fluorescência.

Os reagentes do M371-Test podem ser descongelados até oito vezes. Depois disso não deve voltar a usar os reagentes.

O M371-Test só pode ser realizado por utilizadores profissionais, que estejam familiarizados com os métodos da obtenção de soro, extração de RNA e qPCR.

6.2. Medidas preventivas para proteger contra infeções

As amostras humanas de sangue e soro analisadas com este teste, devem basicamente ser tratadas como potencialmente infecciosas e devem ser cumpridas todas as medidas preventivas, tal como prescritas na diretiva da segurança microbiológica e biológica para laboratórios, “Diretiva 2000/54/CE sobre a proteção dos trabalhadores contra o perigo de materiais de trabalho biológicos durante o trabalho”, ou outras prescrições sobre a segurança biológica.

6.3. Comunicação de eventos relacionados com o produto

Todos os incidentes ou acontecimentos graves relacionados com o produto têm de ser imediatamente comunicados à mir|detect GmbH (info@mirdetect.de) e às autoridades responsáveis.

Não tome decisões médicas relevantes, sem primeiro contactar um profissional de saúde.

6.4. Eliminação de materiais de trabalho e reagentes

Nenhum reagente do M371-Test é prejudicial à saúde. Os reagentes expirados ou recipientes de reagentes vazios podem ser eliminados no lixo residual. Devem ser observadas as determinações locais. Por favor, **nunca retire a película de placas qPCR usadas** e assegure uma eliminação sem prejuízo.

Relativamente aos materiais e reagentes de trabalho utilizados para manuseamento das amostras de soro e respetiva eliminação ou para a extração RNA deve ler com atenção as indicações no manual de instruções dos respetivos kits e deve segui-las rigorosamente.

7. Controlo de qualidade

De acordo com o sistema de gestão de qualidade certificado ISO 13485 da mir | detect GmbH, cada lote do M371-Test é testado mediante especificações predefinidas, de modo a assegurar sempre a mesma qualidade de produto. Isso mantém a variabilidade Batch-to-Batch baixa. Os certificados dos lotes podem ser pedidos ao fabricante.

8. Recolha e processamento de amostras

8.1. Recolha e armazenamento de sangue

A recolha deve ser realizada por pessoal profissional qualificado para reduzir riscos inerentes para o paciente, e o consequente armazenamento de sangue e obtenção de soro deve ocorrer conforme descrito a seguir:

- Devem ser usados tubos de ensaio de gel de soro S-Monovette® para efeitos de recolha de sangue, de acordo com as indicações do fabricante. Não usar tubos de ensaio para plasma, EDTA, heparina ou PAXgene.
- O soro deve ser separado dos componentes celulares do sangue o mais rapidamente possível após a recolha de sangue (ver 8.2. Obtenção, armazenamento e transporte de soro).
- **As amostras de sangue total não podem ser congeladas**, pois isso leva à hemólise.

8.2. Obtenção, armazenamento e transporte de soro

- Inverter algumas vezes o sangue no tubo de ensaio de sangue e incubar na vertical durante 30 minutos à temperatura ambiente (15 – 25°C).
- Centrifugar durante 10 minutos o tubo de ensaio de sangue a 2500 *g*.
- Retirar cuidadosamente o tubo de ensaio de sangue da centrífuga.
- Pipetar o soro num tubo criogénico etiquetado. É suposto obter-se cerca de 3-5 ml de soro de um total de 10 ml de sangue total.
- O soro pode ser armazenado até 6 horas a 2 – 8°C, quando a extração RNA ainda é realizada no mesmo dia.
- Para um armazenamento a longo prazo, deve alíquotar o soro e guardar a -20°C ou -80°C.
- O soro deve ser transportado congelado num recipiente adequado. É possível manter a estabilidade durante:
 - 90 horas a < -1°C
 - 16 dias a < -20°C

8.3. Medidas preventivas na obtenção de soro

No caso de uma coloração vermelha visível do soro, recomenda-se uma medição fotométrica numa absorção de 414 nm. Um valor superior a 0,3 remete para um grau eventualmente problemático de hemólise, que influencia negativamente o resultado de medição do M371-Test (Myklebust *et al.*, 2019). Neste caso, aconselha-se uma nova recolha de amostra de sangue e a eliminação do soro hemolítico.

Um valor Ct muito baixo <12 da referência miR pode também indicar a presença de hemólise e adulterar o resultado (ver capítulo “10.2.2. Referência miR”).

Se houver indícios de que o soro é particularmente gorduroso, deixe-o repousar um pouco à temperatura ambiente. Forma-se uma camada de gordura que depois pode ser removida com cuidado.

Certifique-se que a camada de Buffy Coat (película de leucócitos) não é destruída ou conjuntamente transferida após o passo de centrifugação acima dos glóbulos vermelhos. Este passo é especialmente importante, pois uma transição representa a maior fonte de contaminação possível com miRNA ou RNA celular.

8.4. Extração miRNA

Os materiais de RNA ou miRNA do soro dos pacientes não fazem parte do M371-Test.

Para evitar degradações do material da amostra durante a extração de RNA deve prestar-se atenção ao uso de recursos de trabalho livres de RNase, DNase e DNA e ao uso do equipamento pessoal individual. Devem ser ainda evitadas combinações cruzadas entre as amostras de pacientes.

Atenção: Evite incubações expandidas e um frequente descongelamento, pois isso pode causar degradações!

A extração RNA ocorre de acordo com o correspondente manual de instruções. A mir|detect GmbH recomenda a extração de RNA a partir de **200 µL de soro**. Para garantir uma extração igualmente eficiente é necessário seguir rigorosamente as indicações do fabricante relativamente ao kit de extração.

- O miRNA extraído pode ser diretamente usado para realizar o M371-Test.
- Pode armazenar o miRNA a -20°C ou -80°C.
- **Atenção:** Devem ser evitados repetidos ciclos de congelamento e descongelamento de miRNA, pois isso pode causar degradações!

9. Realização do M371-Test

Todos os reagentes do kit M371-Test são “ready-to-use” e podem ser diretamente aplicados na realização do teste.

9.1. Realização geral do teste

Antes da primeira aplicação do M371-Test, é recomendado realizar um ensaio com amostras conhecidas. Para suporte e aconselhamento, contacte a **mir|detect GmbH** (Formulário de contacto em <https://www.mirdetect.de/Service/>) ou **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** (17.3. Distribuidor).

Para efeitos de monitorização e realização idêntica do M371-Test em todos os laboratórios, a mir|detect GmbH recomenda a participação em comparações laboratoriais regulares (formulário de contacto disponível em <https://www.mirdetect.de/Service/>).

É necessário processar um controlo negativo (NC) de PCR grade water para a respetiva validade em cada ciclo. O controlo é reescrito na síntese cDNA, mas - ao contrário do que acontece numa amostra de paciente - é apenas analisado na medição final miR-371a-3p e referência miR.

Indicações importantes:

- Os componentes Reverse Transcriptase (amarelo) e RNase Inhibitor (transparente) **não** devem ser misturado com um misturador de vórtice. Em vez disso, sacuda o tubo com o dedo. Misturar os restantes componentes antes da utilização durante aprox. 3 seg. a cerca de 2800 rpm num misturador de vórtice, para garantir uma solução homogénea.
- Centrifugue todas as soluções do kit antes da sua utilização durante aprox. 3 segundos a 2000 g, para eliminar gotas na tampa.
- Retire todas as soluções do kit das suas condições de armazenamento apenas para a realização do M371-Test. Use o cDNA-Synthese Mastermix (MM) diretamente após o seu fabrico. Depois de utilizado, todas as soluções devem ser imediatamente congeladas de novo ou os recipientes vazios devem ser eliminados.
- Recomenda-se a utilização de blocos de arrefecimento/racks de arrefecimento adequados para todos os reservatórios de reação, incluindo as tiras de 8 e a placa de 96 poços. Estes facilitam o manuseamento e garantem o arrefecimento contínuo dos reagentes.
- Os programas de temperatura (tab. 6, 8 e 9) indicam as condições necessárias para as respetivas reações. Além disso, a tampa de aquecimento deve ser ativada (recomendado: 105 °C). Respeite o manual de instruções do seu aparelho.

9.2. Realização da síntese cDNA

- Descongelar cDNA Solution (preto) e PCR grade water (branco) brevemente à temperatura ambiente ou no frigorífico.
- Misturar e centrifugar cDNA Solution no misturador de vórtice durante aprox. 3 seg. e guardar no bloco de arrefecimento.
- Estalar para misturar Reverse Transcriptase (amarelo) e RNase Inhibitor (transparente) (não em vórtice), centrifugar e guardar no bloco de arrefecimento.

Execute os próximos passos sob uma bancada PCR limpa.

- Pipetar em conjunto Mastermix (MM) para a síntese cDNA de cDNA Solution, de Reverse Transcriptase e de RNase Inhibitor de acordo com o respetivo número de amostras num recipiente de reação adequado. Observar a relação da tabela 4.
- Estalar para misturar e centrifugar Mastermix (MM) ou pipetar várias vezes. Guardar Mastermix (MM) no bloco de arrefecimento.
- Pipetar respetivamente 9 µl de síntese cDNA Mastermix (MM) por cada amostra de paciente e controlo numa tira de 8 PCR (ver tabela 5).
- Adicionar respetivamente 6 µl a mostrar ou controlo.

Tabela 4: Esquema de pipetagem para o fabrico de um cDNA-Synthese-Mastermix (MM)

Rxn = Reações.

Reagente	Mastermix (MM)	Aplicação individual	MM (2 amostras)
		1 Rxn [µl]	3 Rxn (incl. NC e 10 % de excedente) [µl]
cDNA Solution (preto)		7,81	25,77
Reverse Transcriptase (amarelo)		1,00	3,3
RNase Inhibitor (transparente)		0,19	0,63
Volume total		9,00	29,7

Tabela 5: Distribuição do cDNA-Synthese-Mastermix (MM) e das amostras nos recipientes de reação PCR (tira de 8). Representação da realização para duas amostras e um controlo negativo (NC).

Recipientes de reação PCR
MM + amostra 1
MM + amostra 2

MM + NC

- Bases de síntese cDNA, estalando para misturar e centrifugar ou pipetando várias vezes.
- Bases de síntese cDNA durante pelo menos 5 minutos no frigorífico ou incubar em gelo a +4°C.
- Fazer síntese cDNA de acordo com a tabela 6. Prestar atenção à ativação da tampa de aquecimento.

- O cDNA pronto pode ser guardado durante a noite no frigorífico (+4°C). Congelar a -20°C para um armazenamento mais prolongado.

Tabela 6: Parâmetros do programa de síntese cDNA para um instrumento PCR padrão.

Temperatura pretendida [°C]	Duração [hh:mm:ss]	Segmento
16	00:30:00	Annealing
42	00:30:00	Transcrição inversa
85	00:05:00	Ativação de enzimas
≥ 4 a ≤ 10	∞	Arrefecer

9.3. Realização da pré-amplificação

- Descongelar PreAmp Solution (verde) brevemente à temperatura ambiente ou no frigorífico, depois misturar durante aprox. 3 seg. no misturador vórtice, centrifugar e guardar no bloco de arrefecimento.

Execute os próximos passos sob uma bancada PCR limpa.

- Por cada amostra de paciente **três** bases de 16 µl de PreAmp Solution em tiras de 8 PCR e adicionar por cada 4 µl do cDNA sintetizado de novo (ver tabela 7).
- Para o controlo negativo basta **uma vez** 16 µl de PreAmp Solution e 4 µl de base cDNA.
- Bases de pré-amplificação, estalando para misturar e centrifugar ou pipetando várias vezes.
- Realizar pré-amplificação de acordo com a tabela 8. Prestar atenção à ativação da tampa de aquecimento.
- Os pré-amplificados prontos podem ser guardados durante a noite no frigorífico (+4°C). Congelar a -20°C para um armazenamento mais prolongado.

Tabela 7: Representação da realização de uma pré-amplificação para duas amostras e um controlo negativo (NC).

Recipientes de reação PCR
Amostra 1
Amostra 1
Amostra 1
Amostra 2
Amostra 2
Amostra 2

NC

Tabela 8: Parâmetros do programa de pré-amplificação para um instrumento PCR padrão.

Ciclos	Temperatura pretendida [°C]	Duração [hh:mm:ss]	Segmento
1	95	00:01:00	Ativação de enzimas
15	95	00:00:15	Desnaturação
	60	00:04:00	Annealing + Elongation
1	≤10	∞	Arrefecer

Indicação: É importante garantir que é programado o número correto de ciclos, pois a introdução do ciclo pode variar em diferentes sistemas de cicladores de PCR (número total de ciclos ou número de repetições de ciclo).

9.4. Preparação das amostras pré-amplificadas

- Descongelar Target Solution (azul) e Control Solution (violeta) protegidos da luz no frigorífico ou brevemente à temperatura ambiente também protegidos da luz. Descongelar PCR-grade water (branco) à temperatura ambiente. Guardar reagentes no blocos de arrefecimento.
- Se necessário, descongelar brevemente os pré-amplificados à temperatura ambiente ou no frigorífico, centrifugar e guardar no bloco de arrefecimento até continuar a ser usado.

Execute os próximos passos sob uma bancada de trabalho PCR limpa.

- Para cada amostra de paciente, submeter 60 µl de PCR-grade water (branco) num recipiente de reação.
- Adicionar todas as três bases de cada amostra à PCR-grade water (3 × 20 µl de pré-amplificado = 60 µl + 60 µl de PCR-grade water).
- Para o controlo negativo, colocar 20 µl PCR-grade water num recipiente de reação e adicionar o respetivo pré-amplificador.

9.5. Disposição da placa qPCR

- Misturar, centrifugar e guardar no bloco de arrefecimento Target Solution (azul) e Control Solution (violeta) durante aprox. 3 segundos no misturador de vórtice.
- Para cada amostra de paciente são necessários seis Wells (três para Target Solution, três para Control Solution). Dois Wells para cada controlo negativo (ver fig. 1).
- Pipetar 15 µl de Target Solution ou Control Solution nas correspondentes posições da placa qPCR.
- Antes da utilização, misturar, centrifugar e guardar no bloco de arrefecimento os pré-amplificados diluídos durante aprox. 3 segundos
- Pipetar 5 µl dos pré-amplificados diluídos nas correspondentes posições da placa qPCR.
- Fechar a placa qPCR com uma película de cobertura ótica e alisar com um aplicador para películas para ficar sem bolhas.
- Centrifugar a placa PCR com uma centrífuga de placas (p. ex., 2 × 30 seg. a 500 g).

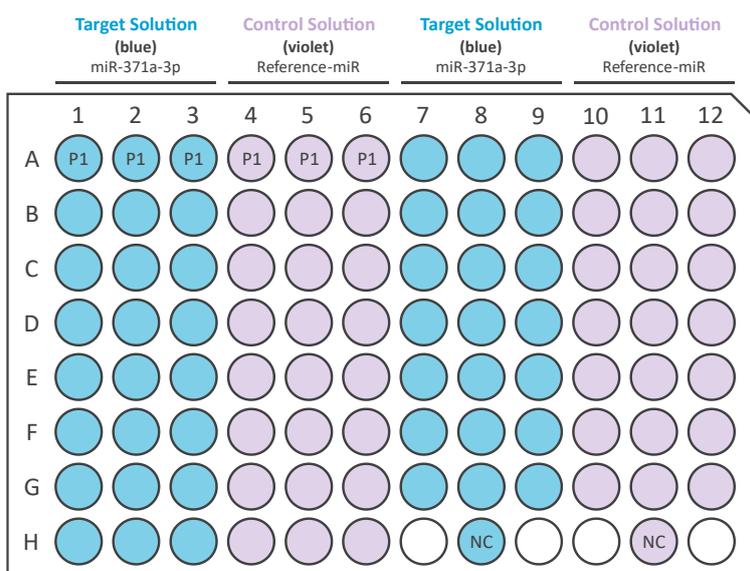


Fig. 1: Disposição recomendada da placa qPCR para a medição de uma amostra (P1), um controlo negativo (NC).

9.6. Carregar a placa qPCR

Em relação à programação do seu ciclador de PCR em tempo real, observe as informações do fabricante.

- Criar no software qPCR-Cycler um programa qPCR de acordo com a tabela 9.
- As taxas máximas de aquecimento e arrefecimento específicas do aparelho podem ser mantidas (Tabela 10).
- Devem ser realizadas as seguintes configurações gerais:
Volume de reação: 20 µl
Canal de detecção: FAM
- Abrir tampa de carga do instrumento qPCR e colocar a placa qPCR na armação. Certifique-se que a placa cabe exatamente na armação. Feche a tampa de carga.
- Iniciar o curso qPCR e inserir um nome de identificação inequívoco.
- Concluído o curso, retire a placa qPCR do instrumento qPCR e elimine, sem remover a película de proteção.

Particularidade LightCycler® 480II (Roche): Nos esquemas da disposição das placas, as amostras têm de ser definidas nas medições paralelas de miR-371a-3p e referência miR como triplicados entre si.

- Sob o ponto “Sample Editor” é preciso identificar as três bases para cada amostra de paciente e cada miRNA como réplicas. Para tal, escolher respetivamente três posições e clicar no botão “Make Replicates”
- Ex.: A1-A3 = uma réplica, A4-A6 = uma réplica (ver Fig. 1)

Tabela 9: Perfil de temperatura do qPCR.

Número de ciclos	Passo	Temperatura [°C]	Duração [mm:ss]	Deteção
1	Ativação de Polimerase	95	10:00	
40	Desnaturação	95	00:15	
	Annealing/Elongation	60	01:00	Medição de fluorescência no final de cada ciclo
1	Arrefecer	37	01:00	

Tabela 10: Taxas de aquecimento e arrefecimento específicas do dispositivo de cicladores de qPCR validados

Ciclador de qPCR	Taxas de aquecimento e arrefecimento máximas [°C/s]
LightCycler® 480 II	4,4 (aquecimento), 2,2 (arrefecimento)
QuantStudio™ 5	3,66
AriaDx	6,0

10. Análise de resultados

Nota: Cp (= Crossing point) e Ct (= Cycle threshold) são idênticos e permutáveis. Neste manual de instruções é usado o termo Ct.

10.1. Ficheiro de avaliação do M371-Test e importação de dados

O ficheiro de avaliação do M371-Test é um software acessório opcional e é transmitido em formato eletrónico **por e-mail** após a aquisição do kit. O ficheiro com a designação "M371-Test Evaluation File" está disponível apenas em inglês. Para uma avaliação fiável e segura, deve ser sempre utilizada a versão atual do ficheiro de avaliação do M371-Test. Para garantir o uso seguro, o ficheiro de avaliação do M371-Test contém áreas bloqueadas, **que não devem e não podem ser alteradas**. As células com possibilidade de registo estão destacadas a verde claro, como p. ex., a designação das amostras e a área para introdução de dados do qPCR. Depois de inserir os dados do curso qPCR no ficheiro de avaliação do M371-Test, a frequência relativa (RQ) de miR-371a-3p é automaticamente calculada e aparece o resultado do teste.

10.2. Análise de resultados

Configurações da análise:

Tabela 11: configurações de análise específicas do aparelho.

Ciclador de qPCR	Valor limite	Linha de base
LightCycler® 480 II	Abs Quant/2nd Derivative Max	Os ciclos de início e fim devem ser escolhidos de modo que o ruído inicial no sinal não seja considerado e a linha de base termine antes que seja detetada uma fluorescência significativa.
QuantStudio™ 5	Auto threshold	
Aria Dx	Auto threshold	

Em seguida, descreve-se a análise do resultado com o ficheiro de avaliação opcional do M371-Test. O processo aqui descrito refere-se ao instrumento LightCycler® 480 II qPCR Instrument Roche Diagnostics com bloco de aquecimento de 96 poços e versão de software 1.5.x. Caso sejam usados outros cicladores de qPCR validados, garantir que os valores medianos de Ct são transferidos corretamente para a máscara de introdução do ficheiro de avaliação do M371-Test. As configurações de análise específicas do aparelho dos sistemas de cicladores de qPCR validados podem ser visualizadas na Tabela 11.

- No software LightCycler® 480, escolha a experiência anterior e clique no separador “Analysis”.
- Escolher “Abs Quant/2nd Derivative Max” para todas as amostras e clicar em “OK”.
- Escolher “Median” em vez de “Mean” no menu dropdown no lado inferior direito e calcular mediante “Calculate” no lado inferior esquerdo.
- Os medianos dos valores Ct do miR-371a-3p e da referência miR são calculados automaticamente para cada amostra e apresentados na tabela de resultados "Replicate Statistics" no lado inferior esquerdo.
- Todos os resultados da tabela de resultados “Replicate Statistics” devem ser transferidos para o ficheiro de avaliação do M371-Test. Para tal, clicar no campo “Replicate Statistics”, marcar todos os dados com Ctrl + A e depois copiar os dados com Ctrl + C.
- Mudar para o ficheiro de avaliação do M371-Test e seguir as instruções sobre transmissão de dados.
- Os resultados do controlo negativo para a medição miR-371a-3p e referência miR têm de ser introduzidos manualmente no ficheiro de avaliação. Com o cursor do rato sobre a respetiva posição Well no software LightCycler®, aparece o valor Ct medido.
- O ficheiro de avaliação contém colunas de resultados separadas para o diagnóstico primário e o acompanhamento. Devido a diferentes valores limite, os resultados nestas colunas podem diferir. **Garantir que o resultado é lido na coluna correspondente do respetivo cenário.**

10.2.1. Controlo negativo

Em cada curso qPCR, é preciso aplicar um controlo negativo (NC, PCR grade water) tanto para a medição miR-371a-3p como para a referência miR, de modo a confirmar o sucesso da realização do teste.

Um curso qPCR é **VÁLIDO**, quando o controlo negativo para miR-371a-3p e o controlo negativo para a medição de referência miR é **NEGATIVA**. O controlo negativo é negativo, quando o valor Ct para ambos os miRNA medidos estiver pelo menos 10 ciclos posteriores ao valor mais alto do correspondente miRNA de uma amostra ou estiver num valor de 35 ou superior.

Um curso qPCR é **INVÁLIDO**, quando o controlo negativo é **POSITIVO**. O controlo negativo para miR-371a-3p e a medição de referência miR é positivo, quando o valor Ct para o miRNA especificamente medido estiver menos de 10 ciclos posteriores ao valor máximo de uma amostra.

Quando os controlos negativos são **POSITIVOS**, as amostras, que foram processadas em conjunto com os controlos, **não** podem ser avaliadas. Neste caso, o M371-Test tem de ser repetido para todas as amostras.

O ficheiro de avaliação do M371-Test indica se todos os controlos foram aprovados (ficheiro de avaliação do M371-Test → Controlos: NC miR-371a e NC referência miR).

10.2.2. Referência miR

Referência miR indica se a amostra apresentava uma quantidade suficiente de miRNA na respetiva base. O resultado de miR-371a-3p qPCR depende do resultado da referência miR.

A faixa normal para o valor Ct da referência miR situa-se, com o LightCycler® 480 II Instrument entre 12 e 22. Neste caso existe miRNA suficiente e os resultados são válidos.

Se o valor Ct da referência miR de uma amostra for **superior a 22**, isso remete para quantidades muito baixas após a extração de RNA e pode ameaçar alguns diagnósticos inequívocos.

Se o valor Ct da referência miR de uma amostra for **inferior a 12**, estava-se provavelmente perante uma hemólise da amostra, sendo impossível afirmar claramente o estado tumoral mediante esta amostra.

Amostras de paciente, cujo valor Ct da referência miR está abaixo de 12 ou acima de 22, devem ser novamente recolhidas e processadas com o M371-Test.

10.2.3. Avaliação das amostras

A avaliação dos resultados do teste é descrita conforme o cenário clínico no capítulo "2. Bases tecnológicas do processo de teste".

11. Guia da resolução de erros (Troubleshooting Guide)

- Se um controlo negativo não for aprovado para um curso qPCR, deve repetir o curso (amostras inclusive controlo negativo para miR-371a-3p e referência-miR).
- Os sinais indesejados nos controlos negativos podem dever-se a uma tampa de aquecimento inativada durante a síntese ou pré-amplificação do cDNA. Devido a condensação nas tampas dos reservatórios de reação, ocorrem mudanças de concentração não pretendidas. Para o evitar, é necessário programar uma temperatura da tampa de aquecimento de 105 °C.
- Se, para uma amostra, o valor Ct da referência miR estiver acima de 22, deve voltar a recolher a amostra e processá-la com o M371-Test, pois a quantidade de material de base foi insuficiente.
- Se, para uma amostra, o valor Ct da referência miR estiver abaixo de 12, deve voltar a recolher a amostra e processá-la com o M371-Test, pois a amostra original estava provavelmente hemolítica.
- Se, numa amostra do **diagnóstico primário**, a RQ estiver entre 5 e 10 (área indefinida), fazer uma nova recolha de sangue do paciente após algumas semanas e repedir a medição.
- Software LightCycler®: Quando falta a tabela “Replicate Stats”, verifique se as réplicas de uma amostra de paciente foram reciprocamente atribuídas.

12. Limites do processo

- O teste só é adequado ao diagnóstico in-vitro.
- O teste está unicamente preparado para detetar tumores de células germinais testiculares tipo II (Germ Cell Neoplasia *in situ* derived GCTs).
- O teste não demonstrou funções de prognóstico (previsão de recidivas após intervenção), mas pode ser utilizado para follow-up monitoring de pacientes com tumor testicular.
- Só foram validados os cicladores de qPCR validados no capítulo "5.1. Equipamento geral de laboratório".
- Este produto foi desenvolvido para a análise do soro. Foram unicamente validados os tubos de ensaio para recolha de sangue de gel de soro S-Monovette® 7,5 e 9 ml Z-Gel da firma Sarstedt AG & Co. KG.
- Não foram validados outros tipos de amostras de pacientes e outros tubos de ensaio para recolha de sangue.
- Devem ser respeitadas as indicações relativas à recolha de amostras e processamento de amostras do capítulo "8. Recolha e processamento de amostras"
- Este produto só pode ser usado por pessoas com experiência na execução de testes de PCR.
- O resultado do teste não pode ser usado para o diagnóstico primário único de um tumor de células germinais testiculares ou como prova de recidiva. Cada M371-Test positivo deve ser confirmado por um processo adequado do diagnóstico clínico.
- O resultado do M371-Test tem de ser avaliado em conjunto com outros parâmetros clínicos.
- Os teratomas puros quase não apresentam expressão aumentada do marcador tumoral miR-371a-3p-3p, pelo que este tipo de tumores não pode ser comprovado (Dieckmann et al., 2017; 2019).
- A referência miR expressa-se de forma aumentada no tecido cerebral de pacientes com Alzheimer (Song et al., 2019). Atualmente não se sabe se tal também se aplica à concentração do miR de referência no soro destes pacientes. Neste caso, podem verificar-se falsos negativos nos resultados do teste.
- Observaram-se resultados de teste positivos em grávidas, que não pertencem ao grupo-alvo dos pacientes a analisar com o M371-Test (Gu et al., 2013).
- Uma maior hemólise causa uma maior libertação da referência miR detetada no teste. Daí resulta uma maior redução dos valores Ct da referência miR, que pode levar a valores RQ adulterados e, no pior dos cenários, pode originar um resultado de teste de falso negativo (Myklebust et al., 2019).
- Não se pode descartar que a expressão do miR-371a-3p esteja aumentada em pacientes com Covid-19 (Goebel et al., 2022).

13. Dados de desempenho específicos

13.1. Desempenho analítico

13.1.1. Sensibilidade analítica

A menor diferença mensurável em valores RQ e valores Ct foi medida através de três níveis de diluição de amostras mimic-miRNA, compostas por miR-371a-3p e referência miR. Cada diluição foi medida em 10 réplicas com um lote de kit. Daí resultou que a menor diferença mensurável se situa a 0,52 pmol/l

13.1.2. Especificidade analítica

Foram medidas três diferentes amostras simuladoras de pacientes (expressão de miR-371a-3p alta, média, nenhuma) com contaminação forte, baixa, nenhuma (DNA, contaminação de proteína). Para todas as medições foi usado o mesmo lote de kit M371-Test. Os resultados foram analisados numa análise de regressão.

O valor Ct de miR-371a-3p aumentou no caso de amostras fortemente expressivas, devido às impurezas. Isso pode causar um RQ mais baixo ($p=0,005$, $R^2=0,698$).

No caso de amostras de expressão moderada, a impureza com DNA/proteína causou valores Ct significativamente mais altos de miR-371a-3p e referência miR, bem como valores RQ ($p=0,001$, $R^2=0,798$; $p=0,004$, $R^2=0,711$; $p=0,001$, $R^2=0,812$).

Tendo em conta os resultados, prestar especial atenção a uma extração miRNA correta conforme o protocolo do fabricante, para evitar uma possível contaminação de uma amostra de paciente.

13.1.3. Limite de prova e de quantificação (LoD, LoQ)

O limite de prova e de quantificação (Limit of Detection (LoD) & Limit of Quantification (LoQ)) do M371-Test foi determinado numa série de diluição de miR-371a-3p com seis níveis de diluição, bem como a referência miR em concentração constante com seis réplicas cada. Todas as medições foram realizadas com um lote do kit M371-Test.

O limite de prova (LoD) foi definido previamente, pelo que devem ser detetadas pelo menos 5/6 diluições. Era esse o caso na experiência até uma concentração de 7,575 fM. O coeficiente de variação era 77,33 %.

O limite de quantificação (LoQ) foi predefinido, de modo a que o coeficiente de variação fosse no máximo 50 %. Era este o caso até uma concentração de 30,3 fM. Para esta concentração, o coeficiente de variação é 44,07 %. O RQ médio no LoD é 1,05, o RQ médio no LoQ é 8,71. Isso significa que LoQ está pouco acima do valor Cut-off de RQ = 5. Uma vez que os valores abaixo de 8,71 não podem ser quantificados com exatidão, o valor Cut-off para o diagnóstico primário foi aumentado para uma faixa Cut-off-, que engloba valores RQ de 5 a 10. Valores dentro desta faixa não podem ser medidos com exatidão e são considerados indefinidos (INDETERMINATE).

13.1.4. Linearidade

Para a medição da linearidade diluiu-se uma amostra mimic-miRNA numa concentração de 500 pM seis vezes 1:10. Cada diluição foi medida três vezes independentemente do mesmo operador com um lote do kit M371-Test em diferentes dias. Daí resulta uma eficiência de PCR de 90 % em média, o coeficiente de correlação (R^2) situava-se em 0,993-0,997. Considerando os valores miR-371a-3p-Ct, havia concentrações de 5 fM a 500 fM na faixa linear. Numa concentração de 0,5 fM, o miR-371a-3p não era detetável.

13.2. Precisão

13.2.1. Precisão de repetição

A reprodutibilidade do resultado do teste foi determinada por repetidos testes de amostras com quatro diferentes concentrações (expressão miR-371a-3p alta, média, baixa e nenhuma). Cada amostra foi processada em 30 réplicas com um lote do kit M371-Test por um operador. O coeficiente de variação para amostras com expressão alta e média é aprox. 14 %. Para amostras de baixa expressão, o coeficiente de variação vai até 85 %, por isso é preciso observar o limite de quantificação na avaliação. As amostras representativas de pacientes sem tumores podem apresentar um coeficiente de variação de 127 %. Este foi observado a uma concentração de 5 fM. Uma vez que esta concentração se encontra abaixo do limite de prova (7,575 fM), um coeficiente de variação maior não é problemático.

13.2.2. Precisão de comparação

Para a precisão de comparação foram analisados os seguintes parâmetros:

- Diferentes operadores
- Diferentes consumíveis (placas qPCR)
- Diferentes laboratórios (diferentes cicladores de PCR e instrumentos de ciclador de qPCR (LightCycler® 480II))

Por operador foram medidas quatro diferentes concentrações em amostras em duas réplicas (expressão alta, média, baixa e nenhuma de miR-371a-3p). Por tipo de placa foram medidas quatro concentrações (expressão alta, média, baixa e nenhuma miR-371a-3p) com quatro réplicas respetivamente. Por laboratório foram medidas quatro concentrações (expressão alta, média, baixa e nenhuma miR-371a-3p) com quatro réplicas respetivamente.

Operadores e consumíveis como placas qPCR não tinham influência significativa sobre o RQ das amostras analisadas ($p= 0,09 - 0,33$, Kruskal Wallis ou $p= 0,25 - 0,81$, Mann-Whitney U). Na comparação de dois laboratórios obteve-se na faixa mais alta do RQ uma diferença significativa ($p=0,014$, Mann-Whitney U na faixa RQ 200-2000). Este não afetou a faixa do limite clínico de decisão (RQ= 10) e deslocou-se para o coeficiente de variação numa faixa de 21-22 %.

13.3. Capacidade clínica

A capacidade clínica do M371-Test foi comprovada, entre outras coisas, num estudo multicêntrico em 37 clínicas da Alemanha, Áustria, Suíça, Hungria e Itália (Dieckmann et al., 2019). Para o estado foram medidas amostras de soro de 616 pacientes com tumores de células germinais e de 258 pacientes de controlo com o M371-Test. Para determinar a capacidade clínica para o diagnóstico primário foram

comparadas amostras de 522 pacientes, dos quais 323 seminomas e 199 não seminomas, com amostras de 258 pacientes de controlo.

No diagnóstico primário de tumores de células germinais, o M371-Test apresentou uma sensibilidade de 91,8 % e uma especificidade de 96,1 %. A AUC (área abaixo da curva ROC) apresentou 0,970 e o valor preditivo positivo foi de 97,2% (Tabela 12).

Tabela 12: Características clínicas do M371-Test (de Dieckmann et al. 2019).

Grupo	AUC	Sensibilidade	Especificidade	PPW*	NPW*	LR+	LR-
KZT (n=522) vs. controlos (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)	23675 (12.89 – 43.49)	0.086 (0.06 – 0.11)
Seminoma (n=323) vs. controlos (n=258)	0.964 (0.949 – 0.979)	89.8 (85.9 – 92.8)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-
Não seminoma (n = 199) vs. controlos (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. controlos (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. controlos (n=258)	0.998 (0.995 – 1.0)	98.7 (95.3 – 99.8)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-
Recidiva (n=46) vs. controlos (n=258)	0.921 (0.862 – 0.981)	82.6 (68.6 – 92.2)	96.1 (93.0 – 98.1)	-	-	-	-

*As características clínicas para PPW e NPW baseiam-se em n = 155 KZT e n = 90 controlos. AUC: Area under the curve (área por baixo da curva), CS: Clinical stage (estágio clínico), KZT: tumor de células germinais, LR+: likelihood-ratio positivo, LR-: likelihood-ratio negativo, PPW: valor preditivo positivo, NPW: valor preditivo negativo. Valores entre parênteses = 95 % intervalo de confiança.

Recidivas de pacientes KZT puderam ser corretamente determinadas em 10 de 10 ou 4 de 4 recidivas mediante maior expressão miR-371a-3p (Dieckmann et al., 2017; van Agthoven et al., 2017). Outro grupo mostrava nas amostras de 10 pacientes TGCT uma subida da expressão miR-371a-3p durante uma recaída (Terbuch et al., 2018).

Dieckmann et al. Mostraram uma sensibilidade de 83 % com n = recidivas 46 TGCT com uma normalização dos valores de soro miR-371a-3p após terapia de recidiva bem-sucedida (Dieckmann et al., 2019). Rosas Plaza et al. também determinou uma subida de miR-371a-3p na recidiva (Rosas Plaza et al., 2019).

Numa série de n = 151 pacientes TGCT clínicos no estágio 1, Lobo e os colegas encontraram n = 34 casos de recaídas. Desses conseguiram comprovar n = 32 (94 %) com a medição miR-371a-3p, enquanto o padrão clássico de ouro (AFP e bHCG) estava aumentado apenas em 38 % dos casos (Lobo et al., 2020).

A confiança, com a qual a expressão miR-371a-3p comprova recidivas, continuou a ser reforçada por Fankhauser et al.. Num estudo com 30 pacientes foi possível determinar uma mais alta expressão miR-371a-3p em 10/10 pacientes com recidivas, enquanto que miR-371a-3p estava aumentado apenas num paciente sem recidiva (Fankhauser et al., 2022). Este aumento normalizou-se logo na próxima medição, o que remete para o facto de se dever acompanhar a subida de miR-371a-3p mesmo após uma expressão aumentada. Foi possível medir recidivas em média dois meses antes do que com os métodos convencionais, num paciente até mais de cinco meses antes (Fankhauser et al., 2022).

O estudo atual mais abrangente sobre o desempenho do M371-Test no acompanhamento de pacientes com tumores de células germinais testiculares em estágio clínico 1 incluiu 258 pacientes e observou-os durante um período médio de 18 meses. O teste foi positivo em todos os 39 pacientes que desenvolveram uma recidiva neste período. As recidivas foram detetadas com sensibilidade de 100%, tendo sido alcançada ao mesmo tempo uma especificidade de 96,3% (Belge et al., 2024). Ressalta-se que neste estudo de acompanhamento foi utilizada uma expressão relativa de RQ = 15 como Cut-off para detetar uma expressão relativa de RQ = 15, que difere do ponto de corte utilizado no diagnóstico primário (RQ = 5, Dieckmann et al., 2019) (ver também "2. Bases tecnológicas do processo de teste"). Embora os marcadores séricos clássicos bHCG e AFP tenham permitido detetar recidivas com especificidade de 91,8 %, atingiram uma sensibilidade de apenas 45,2 %. Na tabela 13 encontra-se um resumo de detalhes adicionais sobre a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos do M371-Test em comparação com os marcadores séricos clássicos no acompanhamento de pacientes com tumores de células germinais em estágio clínico 1.

Tabela 13. Características clínicas do M371-Test no acompanhamento de pacientes KZT CS 1 em comparação com os marcadores séricos clássicos (de Belge et al., 2024).

Marcador	Recidivas confirmadas clin.				Casos sem recidiva				PPW [%]	NPW [%]
	n	WP	FN	Sensibilidade [%]	n	WN	FP	Especificidade [%]		
M371, todos 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: tumor de células germinais, S: seminoma, NS: não-seminoma, bHCG/AFP: casos com um marcador sérico no mínimo bHCG e/ou AFP, n: número de casos registados, WP: verdadeiro positivo, FN: falso negativo, WN: verdadeiro negativo, FP: falso positivo, NPW: valor preditivo negativo, PPW: valor preditivo positivo Valores entre parênteses = 95 % intervalo de confiança.

13.4. Interferência

13.4.1. Hemólise

Uma maior hemólise causa uma maior libertação da referência miR detetada no teste. Daí resulta uma maior redução dos valores Ct da referência miR, que pode levar a valores RQ adulterados e, no pior dos cenários, pode originar um resultado de teste de falso negativo. Vinte soros de pacientes foram analisados quanto a hemólise mediante a descoloração e medição fotométrica (414 nm). Cada amostra foi medida facilmente com o M371-Test. O grau de hemólise tinha uma influência significativa sobre a medição da referência miR ($p=0,002$). Um grau mais alto de hemólise tem como consequência um valor Ct mais baixo da referência miR ($R^2=0,437-0,743$).

13.4.2. Outros estados médicos

Em pacientes com Alzheimer, foram observadas concentrações elevadas do miR de referência no tecido cerebral (Song et al., 2019). De momento, não se conhece se também existem nestes pacientes concentrações elevadas do miR de referência que possam corromper o resultado do teste. Observaram-se resultados de teste positivos em grávidas que não pertencem ao grupo-alvo dos pacientes por analisar. Estudos mais recentes indicam que miR-371a-3p poderia estar aumentada em pacientes com Covid-19 (Goebel et al., 2022). Se estes estudos se confirmarem, recomenda-se em caso de suspeita que se analise paralelamente o estado Covid-19 do paciente.

13.4.3. Cross-Reactivity

As seguintes substâncias foram testadas quanto a uma interferência com o M371-Test: impureza DNA, proteína, EDTA, citrato, heparina, sequências miR idênticas (miR-372-3p).

Para a testagem da interferência foi usado o CLSI Interference Testing em Clinical Chemistry 3rd ed. Inicialmente dividiu-se uma amostra de soro para cada interferente em dois grupos, dos quais uma foi enriquecida com uma concentração três vezes superior de interferente, do que seria normalmente de esperar. O outro grupo não foi enriquecido com interferente e serviu de controlo. Cada grupo foi medido em 7 réplicas. Se a diferença do resultado excedeu uma medida anteriormente determinada (50 %) do grupo de teste para o grupo de controlo, foi realizada uma experiência Dose-Response.

No caso de impurezas com DNA, proteína e heparina, observa-se uma influência sobre o RQ e o resultado do teste logo com impurezas muito baixas.

Apesar do isolamento miRNA recomendado e de métodos idênticos eliminarem o DNA e a proteína das amostras de soro, a inobservância do protocolo do fabricante pode originar uma contaminação das amostras do paciente com DNA ou proteína. Esta contaminação pode causar resultados adulterados. A mir|detect GmbH recomenda, por isso, urgentemente seguir rigorosamente os protocolos do fabricante.

Uma vez que bastam quantidades pequenas de heparina para influenciar os resultados das amostras do paciente, a mir|detect GmbH recomenda o uso de gel de soro Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® para recolher sangue.

Não se pode excluir a deteção futura de mais interferências.

13.5. Summary of Safety and Performance (Breve relatório sobre segurança e desempenho)

O atual breve relatório sobre segurança e desempenho ("Summary of Safety and Performance") pode ser consultado através do EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>) ou pedido através do formulário de contacto em www.mirdetect.de/Service.

14. Significado dos símbolos

A utilização de símbolos cumpre a norma DIN EN ISO 15223-1:2021 (Produtos médicos - Para inscrições de produtos médicos sobre símbolos utilizados, identificação e informações a fornecer - Parte 1: Requisitos gerais (ISO 15223-1:2016, versão corrigida 2017-03); versão alemã EN ISO 15223-1:2016).

A seguir pode ver representados os símbolos com o respetivo significado (ver tabela 14).

Tabela 14: Representação de símbolos e respetivo significado.

	Identificação CE + Código da autoridade designada (XXXX)
	Diagnóstico <i>in-vitro</i>
	Observar manual de instruções
	Número do artigo
	Número de lote
	Fabricante
	Distribuidor
	Suficiente para <n> ensaios
	Proteger contra luz solar
	Limite de temperatura
	Validade
	Não usar se a embalagem estiver danificada

15. Alterações aos manuais de instruções anteriores

15.1. Alterações à versão 10

- Atualização do nome da empresa do distribuidor
- Adição de uma tabela para interpretação dos resultados do M371-Test em função do cenário clínico no capítulo 2 Bases tecnológicas do processo de teste
- Explicação sobre o cálculo da RQ no capítulo 2 Bases tecnológicas do processo de teste
- Indicação dos documentos disponíveis para download no website mirdetect, no capítulo 3.3 Acessórios
- Adição do capítulo 3.4 Substâncias perigosas e componentes de origem animal no kit do M371-Test
- Correção da temperatura de transporte no capítulo 4
- Nova ilustração para ocupação de placas qPCR no capítulo 9.5
- Remoção do símbolo "não estéril" da tabela do capítulo 14
- Atualização do capítulo 10.2 (Análise de resultados (instrumento LightCycler®))
- Atualização do capítulo 12 Limites do processo
- Atualização do capítulo 13 Dados de desempenho específicos

15.2. Alterações à versão 11

- Correção de erros de formulação e erros ortográficos
- Adição do código da entidade designada junto ao símbolo CE na folha de rosto
- Indicação sobre a certificação IVDR do M371-Test no capítulo 1
- Listagem dos componentes reativos do M371-Test no capítulo 3.2
- Registo do ciclador de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) com bloco de aquecimento de 96 poços e software "Design and Analysis", versão 1.4.x e Aria Dx (Agilent) com a versão do software 2.0 no capítulo 5.1
- Remoção da amostra positiva opcional do capítulo 3 e 9, das respetivas tabelas bem como o capítulo 18.1 sobre o cálculo da base Mastermix
- Substituição do capítulo "Acessórios" pelo capítulo "3.3 Informações e documentos sobre o M371-Test" e "3.4 Acessórios opcionais"
- Indicação sobre o ficheiro de avaliação opcional do M371, disponível apenas na versão em inglês "M371-Test Evaluation File" no capítulo 3.4 e 10.1
- Apresentação das indicações importantes do capítulo 9.1 em subpontos para maior clareza bem como adição de duas novas indicações sobre a utilização de blocos de arrefecimento /racks de arrefecimento e ativação da tampa de aquecimento em cicladores de PCR.
- Alteração da designação "Hibridização de primer" em "Annealing" nas tabelas 6 e 8
- Indicação sobre a ativação da tampa de aquecimento nos capítulos 9.2, 9.3 e 11
- Nova indicação sobre a mistura e centrifugação de pré-amplificados no capítulo 9.5
- Adição de uma tabela das taxas de aquecimento e arrefecimento dos sistemas de cicladores validados, bem como a simplificação da tabela sobre o perfil de temperaturas do ciclador de qPCR no capítulo 9.6
- Indicação sobre as duas colunas de resultados separadas no ficheiro de avaliação do M371-Test e adição de uma tabela para as configurações de análise específicas dos aparelhos de sistemas de cicladores validados no capítulo 10.2
- Descrição detalhada da expressão aumentada do miR de referência em pacientes com Alzheimer no capítulo 12 e 13.4.2
- Correção da sensibilidade analítica para 0,52 pmol/l no capítulo 13.1.1
- Listagem adicional das alterações à versão 10 no capítulo 15.1

- Atualização do endereço de e-mail do distribuidor no capítulo 17.3

16. Referências

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(-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, Karlsdóttir 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. Informações para o comprador

17.1. Fabricante



mir|detect GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven, Deutschland

Para mais informações e ajudas, visite a nossa página na Internet ou envie-nos um e-mail ou então telefone:

Website: <https://www.mirdetect.de>
E-mail: info@mirdetect.de
Telefone: +49 (0) 421 / 40 89 37 11-0

17.2. Marcas comerciais

Todas as marcas comerciais, marcas e nomes mencionados neste documento são propriedade das respectivas empresas.

17.3. Distribuidor



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH
Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach

E-mail: Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com
Phone: +49 6074 23698-0

18. Anexo

18.1. Documentos relativos ao fabrico do cDNA-Synthese-Mastermix (MM)

Tabela 15: Esquema de pipetagem para o fabrico de um cDNA-Synthese-Mastermix para 2, 3, 4 e 5 amostras (incl. 10 % volumes excedentes), Rxn = reações.

Mastermix (MM) Reagente	MM (2 amostras)	MM (3 amostras)	MM (4 amostras)	MM (5 amostras)
	3 Rxn (incl. NC & excedente) [μl]	4 Rxn (incl. NC & excedente) [μl]	5 Rxn (incl. NC & excedente) [μl]	6 Rxn (incl. NC & excedente) [μl]
cDNA Solution (preto)	25,77	34,36	42,96	51,55
Reverse Transcriptase (amarelo)	3,3	4,4	5,5	6,6
RNase Inhibitor (transparente)	0,63	0,84	1,05	1,25
Volume total	29,7	39,6	49,5	59,4