



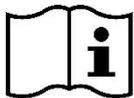
M371-Test

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 10, copyright©, Stand 18.07.2023_draft, mir|detect GmbH



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

Inhalt

1.	Name und Verwendungszweck des Produkts	4
2.	Technologische Grundlagen des Testverfahrens	4
3.	Im Kit enthaltene Reagenzien	5
3.1.	Komponenten.....	5
3.3.	Accessoires	6
4.	Transport, Lagerung und Stabilität.....	6
5.	Zusätzlich benötigtes Equipment	6
5.1.	Allgemeine Laborausstattung.....	6
5.2.	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	7
5.4.	Geräteanforderungen	7
6.	Vorsichtsmaßnahmen	7
6.1.	Vorsichtsmaßnahmen im Labor	7
6.2.	Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor Infektionen	8
6.3.	Meldung von Ereignissen im Zusammenhang mit dem Produkt	8
6.4.	Entsorgung der Arbeitsmaterialien und Reagenzien	8
7.	Qualitätskontrolle.....	8
8.	Probenentnahme und Probenprozessierung	9
8.1.	Blutentnahme und Blutlagerung.....	9
8.2.	Serumgewinnung, -lagerung und -transport.....	9
8.3.	Vorsichtsmaßnahmen bei der Serumgewinnung.....	9
8.4.	miRNA-Extraktion	10
9.	Durchführung M371-Test.....	10
9.1.	Generelle Durchführung des Tests.....	10
9.2.	Durchführung der cDNA-Synthese	11
9.3.	Durchführung der Präamplifikation	12
9.4.	Vorbereitung der präamplifizierten Proben.....	13
9.5.	Belegung der qPCR-Platte	13
9.6.	Laden der qPCR-Platte.....	14
10.	Ergebnisanalyse.....	15
10.1.	M371-Test-Auswertdatei und Daten-Import	15
10.2.	Ergebnisanalyse (LightCycler® 480 II Instrument).....	15
10.2.1.	Negativkontrolle.....	16
10.2.2.	Referenz-miR.....	16
10.2.3.	Beurteilung der Proben.....	16

11. Leitfaden zur Fehlerbehebung (Troubleshooting Guide).....	17
12. Grenzen des Verfahrens.....	17
13. Spezifische Leistungsdaten.....	18
13.1. Analytische Leistung.....	18
13.1.1. Analytische Sensitivität.....	18
13.1.2. Analytische Spezifität.....	18
13.1.3. Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LoD, LoQ).....	18
13.1.4. Linearität.....	19
13.2. Präzision.....	19
13.2.1. Wiederholungspräzision.....	19
13.2.2. Vergleichspräzision.....	19
13.3. Klinische Leistungsfähigkeit.....	19
13.4. Interferenz.....	21
13.4.1. Hämolyse.....	21
13.4.2. Andere medizinische Zustände.....	21
13.4.3. Cross-Reactivity.....	21
13.5. Kurzbericht für Sicherheit und Leistung.....	22
14. Bedeutung von Symbolen.....	22
15. Änderungen zur vorherigen Gebrauchsanweisung (Version 09).....	23
16. Referenzen.....	23
17. Informationen für den Käufer.....	24
17.1. Hersteller.....	24
17.2. Trademarks.....	24
17.3. Distributor.....	24
18. Anhang.....	25
18.1. Vorlagen für die Herstellung des cDNA-Synthese-Mastermixes (MM).....	25

1. Name und Verwendungszweck des Produkts

Das Labordiagnostikum M371-Test ist ein 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 Serum aus der Kubitalvene mittels qPCR quantifiziert.

Der M371-Test ist ein nicht-automatischer Test mit einer qualitativen Ergebnisinterpretation, der das Vorhandensein testikulärer Keimzelltumoren (KZT bzw. engl. 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, Germ Cell Neoplasia in situ derived TGCT). Das Testergebnis kann nicht zur alleinigen Primär-Diagnose eines testikulären Keimzelltumors 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 M371-Test-Auswertdatei zur Verfügung gestellt.

Das Nachweisverfahren basiert auf dem fluoreszenzinduzierten Nachweis der microRNA miR-371a-3p mittels quantitativer PCR. Um diesen Tumormarker zu messen, muss die RNA, einschließlich der microRNA, 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 microRNA, die als endogene Kontrolle dient (von hier an: 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 von miR-371a-3p wird nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) durch die Referenz-miR und einen festen Wert (Kalibrator) berechnet.

Der M371-Test kann zu drei verschiedenen Ergebnissen führen:

RQ < 5 = negativ, niedrige Tumorwahrscheinlichkeit
RQ 5-10 = unbestimmt, Wiederholung nach einigen Wochen empfohlen
RQ > 10 positiv, hohe Tumorwahrscheinlichkeit

Für weitere Erklärung zur wissenschaftlichen Evidenz siehe Kapitel 13. Spezifische Leistungsdaten dieser Gebrauchsanweisung.

Jeder Lauf wird mit einer Negativkontrolle (NC) und, wenn gewünscht, auch einer Positivprobe (PP) 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 und, falls gewünscht, einer Positivprobe messen (siehe Tabelle 1).

VORSICHT: Dabei werden Negativ- und Positivprobe in der Präamplifikation und qPCR jeweils nur **einmal** gemessen!

Tabelle 1: Inhalt des M371-Test-Kits MCS0105.

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

Artikelnummer MCS0115HT – enthält Reagenzien für fünfzehn Patientenproben, eine Negativkontrolle und, falls gewünscht, eine Positivprobe. Der Anwender muss dabei alle Proben in **einem** Durchgang messen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Inhalt des M371-Test-Kits MCS0115HT.

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

3.2. Reaktive Komponenten des M371-Tests

Für die reverse Transkription während der cDNA-Synthese wird eine Reverse Transkriptase verwendet (Komponente „Reverse Transcriptase“). Die M371-Test-Komponente „PreAmp Solution“ enthält TaqMan™ microRNA Assay. Dieses Reagenz enthält miRNA-spezifische Primer und TaqMan™ Sonden. Die beiden Komponenten „Target Solution“ und „Control Solution“ enthalten TaqMan™ microRNA-Assay und DNA-Polymerase.

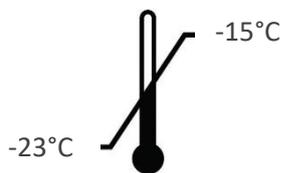
3.3. Accessoires

Die M371-Test-Auswertdatei (Tabellenkalkulationssoftware mit hinterlegten Formeln) für die Beurteilung von Proben und die Gebrauchsanweisung werden in elektronischer Form übermittelt (via E-Mail).

Die Gebrauchsanweisung, Sicherheitsdatenblätter sowie Video-Tutorials sind ebenfalls über den Service-Bereich unter www.mirdetect.de/Service verfügbar.

4. Transport, Lagerung und Stabilität

Der Versand des M371-Tests erfolgt < 5°C via Express-Versand. **Bei einem Transportschaden wenden Sie sich bitte unverzüglich sowohl an das Transportunternehmen als auch an Novatec Immundiagnostica GmbH, part of Gold Standard Diagnostics Frankfurt.** 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.

- Tabellenkalkulationssoftware*
- 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**

* Validiert wurde die M371-Test-Auswertdatei mit Microsoft Excel 2019, 2003 sowie Apache OpenOffice 4.1.5.

** Validiert wurde der M371-Test mit Roche Diagnostics LightCycler® 480 II qPCR Instrument mit 96-Well Heizblock und Software-Version 1.5.x

5.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

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

- Blutröhrchen*
- Kryoröhrchen, selbststehend
- RNA-/miRNA Extraktions-Kit**
- 1,5 ml Reaktionsgefäße mit konischem Boden und Sicherheitsdeckel (PP)
- 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (8-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).

** notwendig für die Extraktion von miRNA. Empfohlen wird der Test mit QIAGEN GmbH miRNeasy Serum/Plasma Kit und Promega Corporation Maxwell RSC mit miRNA Plasma- und Serum-Kit.

5.4. 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

Die Einhaltung der Regeln zur Guten Laborpraxis (Good Laboratory Practices, GLP) ist erforderlich, um vor, während und nach der RNA-Extraktion das Risiko einer Kreuzkontamination von Patientenproben 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. Das Pipettieren der qPCR-Platte sollte nicht unter direkter Lichteinstrahlung erfolgen.

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 werden und alle Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, wie sie in der Richtlinie für mikrobiologische und biologische Sicherheit für Laboratorien, „Direktive 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 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 von 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 oder ähnliche Röhrchen ohne weitere Zusatzstoffe sollten für die Blutentnahme entsprechend den Herstellerangaben verwendet werden.
- 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 hochkant für 30 Minuten bei Raumtemperatur (15 – 25°C) inkubieren.
- Das Blutröhrchen für 10 Minuten bei 2500 x 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 microRNA 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 Novatec Immundiagnostica GmbH, part of Gold Standard Diagnostics Frankfurt (17.3. Distributor).

Für die Überwachung und gleichwertige Durchführung des M371-Tests in allen Laboren empfiehlt mir|detect GmbH die Teilnahme an regelmäßigen Ringversuchen.

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 - auch nur einfach in der abschließenden miR-371a- und Referenz-miR-Messung analysiert.

Hinweis: Mixen Sie ALLE Lösungen des Kits - exklusive Reverse Transcriptase (gelb) und RNase Inhibitor (durchsichtig) - vor ihrer Verwendung für ca. 3 Sekunden bei ca. 2,800 U/min auf einem Vortex Mixer, um eine homogene Lösung zu gewährleisten.

Hinweis: Zentrifugieren Sie ALLE Lösungen des Kits - inklusive Reverse Transcriptase (gelb) und RNase Inhibitor (durchsichtig) - vor ihrer Verwendung für ca. 3 Sekunden bei 2,000 x g, um Tropfen am Deckel zu entfernen.

Hinweis: 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.

9.2. Durchführung der cDNA-Synthese

- cDNA Solution (schwarz) und PCR grade water (weiß) bei Raumtemperatur 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 der cDNA Solution, der Reversen Transcriptase und dem RNase Inhibitor entsprechend ihrer Anzahl an Proben in einem geeigneten Reaktionsgefäß zusammen pipettieren. Dabei das Verhältnis aus Tabelle 3 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 4).
- Jeweils 6 µl Probe oder Kontrolle hinzufügen.

Tabelle 3: Pipettierschema für die Herstellung eines cDNA-Synthese-Mastermixes (MM)

Rxn = Reaktionen.

Reagenz	Mastermix (MM)	Einzelansatz	MM (2 Proben)
		1 Rxn [µl]	4 Rxn (inkl. NC und optionale PP + 10 % Überschuss) [µl]
cDNA Solution (schwarz)		7,81	34,36
Reverse Transcriptase (gelb)		1,00	4,4
RNase Inhibitor (durchsichtig)		0,19	0,84
Gesamtvolumen		9,00	39,6

Tabelle 4: Verteilung des cDNA-Synthese-Mastermixes (MM) und der Proben in die PCR-Reaktionsgefäße (8-Streifen). Darstellung der Durchführung für zwei Proben, eine Negativkontrolle (NC) und eine Positivprobe (PP).

PCR-Reaktionsgefäße
MM + Probe 1
MM + Probe 2

MM + NC
MM + PP*

*optional

- cDNA-Synthese-Ansätze durch Anschnipsen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen und abzentrifugieren.

- cDNA-Synthese Ansätze für mindestens 5 Minuten im Kühlschrank bzw. auf Eis bei +4°C inkubieren.
- cDNA-Synthese entsprechend Tabelle 5 durchführen.
- Fertige cDNA kann über Nacht im Kühlschrank (+4°C) gelagert werden. Für längere Lagerung bei -20°C einfrieren.

Tabelle 5: Parameter des cDNA-Synthese-Programms für ein Standard-PCR-Instrument.

Zieltemperatur [°C]	Dauer [hh:mm:ss]	Segment
16	00:30:00	Primer Hybridisierung
42	00:30:00	Reverse Transkription
85	00:05:00	Enzyminaktivierung
≥ 4 bis ≤ 10	∞	Abkühlen

9.3. Durchführung der Präamplifikation

- PreAmp Solution (grün) bei Raumtemperatur 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 6).
- Für die Negativkontrolle und Positivprobe (optional) genügt **einmal** 16 µl PreAmp Solution und 4 µl cDNA-Ansatz.
- Präamplifikations-Ansätze durch Anschnipsen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen und abzentrifugieren.
- Präamplifikation entsprechend der Tabelle 7 durchführen.
- Fertige Präamplifikate können über Nacht im Kühlschrank (+4°C) gelagert werden. Für längere Lagerung bei -20°C einfrieren.

Tabelle 6: Darstellung der Durchführung einer Präamplifikation für zwei Proben, eine Negativkontrolle (NC) und eine Positivprobe (PP).

PCR-Reaktionsgefäße
Probe 1
Probe 1
Probe 1
Probe 2
Probe 2
Probe 2
PP*
NC

*optional

Tabelle 7: 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	Primer Hybridisierung + Elongation
1	≤10	∞	Abkühlen

9.4. Vorbereitung der präamplifizierten Proben

- Target Solution (blau) und Control Solution (violett) bei Raumtemperatur lichtgeschützt auftauen. PCR-grade water (weiß) bei Raumtemperatur auftauen. Reagenzien in Kühlblock lagern.
- Ggf. Präamplifikate bei Raumtemperatur 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 frischen Reaktionsgefäß vorlegen.
- Alle drei Ansätze jeder Probe zu dem PCR-grade water hinzufügen. Dies entspricht einer 1:1 Verdünnung (3 x 20 µl Präamplifikat = 60 µl + 60 µl PCR-grade water).
- Für Negativ- bzw. Positivprobe 20 µl PCR-grade water in einem frischen Reaktionsgefäß vorlegen und die Präamplifikate hinzufügen.

9.5. Belegung der qPCR-Platte

- Target Solution (blau) und Control Solution (violett) für ca. 3 Sekunden 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 Negativ- bzw. Positivprobe je zwei Wells (siehe Tabelle 8).
- 15 µl der Target Solution bzw. Control Solution in die entsprechenden Positionen der qPCR-Platte pipettieren.
- 5 µl der gepoolten und 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 für 1 min bei 500 x g mit einer Plattenzentrifuge abzentrifugieren.

Tabelle 8: Empfohlene Plattenbelegung der qPCR-Platte für die Messung von zwei Proben (P1, P2), einer Negativkontrolle (NC) und Positivprobe (PP).

	miR-371a			Referenz-miR			miR-371a			Referenz-miR		
	Target Solution (blau)			Control Solution (violett)			Target Solution (blau)			Control Solution (violett)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P2	P2	P2
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	PP*	---	---	PP*	---	---	---	---	---	---	---	---
H	---	NC	---	---	NC	---	---	---	---	---	---	---

*optional

9.6. Laden der qPCR-Platte

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

- In der qPCR-Cycler-Software ein qPCR-Programm entsprechend Tabelle 9 anlegen.
- 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 Tabelle 8)
- 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 mit Klick auf „Start Run“ starten und eindeutig zu identifizierenden Namen einfügen.
- Nach Beendigung des Laufs die qPCR-Platte aus dem qPCR-Instrument entnehmen und entsorgen, ohne die Schutzfolie zu entfernen.

Tabelle 9: qPCR-Programm für das LightCycler® 480 II Instrument.

Programm Parameter	Enzymaktivierung	PCR		Abkühlen
96-well Block	Heizrate 4,4°C/s & Abkühlgeschwindigkeit 2,2°C/s			
Analysemodus	None	Quantification Mode		None
Zyklen	1	40		1
Schritte	1	1	2	1
Zieltemperatur [°C]	95	95	60	37
Dauer [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:15	00:01:00	00:01:00
Heizrate [°C/s]	4,4	4,4	2,2	2,2
Detektionsmodus	kein	kein	einmalig	kein
Fluorophor	kein	kein	FAM*	kein

*Filter-Set: Anregung 465 nm und Emission 510 nm

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 als Software ein fester Bestandteil des M371-Tests und wird bei Erwerb des Kits in elektronischer Form übermittelt (via E-Mail). Für den sicheren Gebrauch der M371-Test-Auswertdatei dürfen die gesperrten Bereiche der Datei nicht verändert werden! Es sollte eine aktuelle Version der Tabellensoftware verwendet werden.

In der M371-Test-Auswertdatei sind beschreibbare Zellen farblich in hellem grün hervorgehoben (z. B. Bezeichnung der Proben und das Einfügen von Daten aus der qPCR); alle weiteren Zellen sind gesperrt und dürfen nicht verändert werden.

Nach Einfügen der Daten aus dem qPCR-Lauf in die Auswertdatei wird die relative Häufigkeit (RQ) der miR-371a automatisch berechnet und das Testergebnis angezeigt.

10.2. Ergebnisanalyse (LightCycler® 480 II Instrument)

Für diesen Schritt wird die von mir|detect bereitgestellte M371-Test-Auswertdatei benötigt. 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.

- In der LightCycler® 480 Basic 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.
- Die medianen Ct-Werte der miR-371a und Referenz-miR werden für jede Probe automatisch berechnet und in der Ergebnistabelle „Replicate Statistics“ unten links angezeigt.
- Alle Ergebnisse aus der Ergebnistabelle „Replicate Statistics“ in die M371-Test-Auswertdatei übertragen. 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.
- Das Feld „Samples“ anklicken und mit Strg-V (Einfügen) die Daten einfügen.
- Die Ergebnisse der Negativkontrolle für die miR-371a 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.

10.2.1. Negativkontrolle

In jedem qPCR-Lauf muss eine Negativkontrolle (NC, PCR grade water) sowohl für die miR-371a 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 und die Negativkontrolle für die Referenz-miR-Messung **NEGATIV** ist. Die Negativkontrolle ist negativ, wenn der Ct-Wert für beide gemessenen microRNA 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 und die Referenz-miR-Messung ist positiv, wenn der Ct-Wert für die jeweils spezifisch gemessene microRNA 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 Lauf für alle Proben wiederholt werden.

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

10.2.2. Referenz-miR

Die Referenz-miR gibt Aufschluss darüber, ob von jeder Probe eine ausreichende microRNA-Menge im jeweiligen Ansatz vorhanden war. Das Ergebnis der miR-371a 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

Eine Probe ist POSITIV getestet, wenn die relative Häufigkeit (RQ) größer als 10 ist.

Eine Probe ist NEGATIV getestet, wenn die relative Häufigkeit kleiner als 5 ist.

Eine klare Aussage für Patienten mit einer relativen Häufigkeit zwischen 5 und 10 ist nicht möglich (UNBESTIMMT), 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.

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 und die Referenz-miR-Messung).
- 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 der RQ zwischen 5 und 10, bitte dem Patienten nach einigen Wochen frisches Blut abnehmen und das Serum anschließend erneut mit dem M371-Test analysieren.
- 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 GCNis).
- Es wurden nur die in Kapitel 5.1. Allgemeine Laborausstattung genannten qPCR-Cycler validiert. Andere qPCR-Cycler müssen vor Gebrauch vom Nutzer validiert werden.
- 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.
- Dieses Produkt darf nur von Personen mit Erfahrung und Training in PCR-Tests verwendet werden.
- Das Testergebnis kann nicht zur alleinigen Primär-Diagnose eines testikulären Keimzelltumors 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.
- Die Referenz-miR ist bei Alzheimer-Patienten differentiell exprimiert, was zu falschen Ergebnissen führen kann (Song et al., 2019).
- 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).

13. Spezifische Leistungsdaten

13.1. Analytische Leistung

13.1.1. Analytische Sensitivität

Der kleinste messbare Unterschied in RQ-Werten und Ct-Werten wurde anhand 3 Verdünnungen von mimic-miRNA-Proben, bestehend aus miR-371a und Referenz-miR, gemessen. Jede Verdünnung wurde in 10 Replikaten mit einer Kit-Charge gemessen. Daraus resultierte, dass der kleinste messbare Unterschied bei 2,56 – 3,08 pmol/L bei einer Konzentration von 61,5 pmol/L liegt.

13.1.2. Analytische Spezifität

Drei verschiedene patientensimulierende Proben (hohe, mittlere, keine miR-371a-Expression) wurden pur, mit starker oder geringer 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 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 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 und der Referenz-miR mit sechs Verdünnungsstufen mit je sechs Replikaten bestimmt. Alle Messungen wurden mit einer M371-Test-Kit-Charge durchgeführt.

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

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) war im Vorhinein so definiert, dass der Variationskoeffizient höchstens 50 % betragen sollte. Dies war bis zu einer Konzentration von 30,3 fM miR-371a 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 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.

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-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 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-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 das Limit of Quantification bei der Auswertung beachtet werden.

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-Expression). Pro Plattentyp wurden vier Konzentrationen (hohe, mittlere, niedrige und keine miR-371a-Expression) mit je vier Replikaten gemessen. Pro Labor wurden vier Konzentrationen (hohe, mittlere, niedrige und keine miR-371a-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 mit Proben von 258 Kontrollpatienten verglichen. Die Auswertung der klinischen Leistungsfähigkeit erfolgte sowohl über die empirisch in der Studie erhobenen Daten als auch über eine Kernel-Dichteschätzung. Mit diesem mathematischen

Verfahren wurden die klinischen Leistungsmerkmale des M371-Tests für einen unbegrenzten Stichprobenumfang modelliert. Da die Dichteschätzung generell konservativere Ergebnisse liefert, sind in Tabelle 10 nur diese Leistungsmerkmale angegeben.

Tabelle 10: Klinische Leistungsmerkmale des M371-Tests aus der Kernel Dichteschätzung.

Gruppe	AUC	Sensitivität	Spezifität	PPW*	NPW*	LR+	LR-
KZT (n = 522) vs. Kontrollen (n = 258)	0,966 (0,953 – 0,976)	90,1 (86,9 – 91,7)	94,0 (91,4 – 96,8)	97,2 (92,9 – 99,2)	82,7 (74,0 – 89,4)	23,675 (12,89 – 43,49)	0,086 (0,06 – 0,11)
Seminome (n = 323) vs. Kontrollen (n = 258)	0,959 (0,94 – 0,972)	87,1 (82,6 – 89,3)	94,0 (91,4 – 96,6)	-	-	-	-
Nichtseminome (n = 199) vs. Kontrollen (n = 258)	0,976 (0,958 – 0,989)	94,1 (90,2 – 96,4)	94,0 (91,3 – 96,8)	-	-	-	-
CS I (n = 371) vs. Kontrollen (n = 258)	0,953 (0,934 – 0,967)	86,7 (82,3 – 88,8)	94,0 (91,3 – 96,8)	-	-	-	-
CS II/III (n = 151) vs. Kontrollen (n = 258)	0,996 (0,992 – 0,999)	98,4 (96,2 – 99,5)	94,0 (91,4 – 96,9)	-	-	-	-

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, NPW: Negativ Prädiktiver Wert, PPW: Positiv 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 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 X. et al. festgestellt (Rosas Plaza X. 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 β HCG) nur in 38 % der Fälle erhöht war (Lobo et al., 2020).

Die Zuverlässigkeit, mit der die miR-371a-Expression Rezidive nachweist, konnte weiterhin von Fankhauser et al. bekräftigt werden. In einer Studie mit 30 Patienten konnte eine erhöhte miR-371a-Expression in 10/10 Patienten mit Rezidiven festgestellt werden, wohingegen miR-371a 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 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).

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

Ebenfalls zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann eine Alzheimer-Erkrankung bei Patienten. Bei diesem Krankheitsbild liegt ebenfalls die Referenz-miR erhöht vor und verfälscht das Testergebnis. Positive Testergebnisse wurden zusätzlich 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 ist (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 bzw. ein ähnliches Serum-Gel Röhrchen ohne Zusätze.

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

13.5. Kurzbericht für Sicherheit und Leistung

Der aktuelle Kurzbericht für Sicherheit und Leistung kann über EUDAMED eingesehen werden oder über das Kontaktformular auf www.mirdetect.de/Service angefordert werden.

14. Bedeutung von Symbolen

Die Verwendung von Symbolen erfolgt anhand der DIN EN ISO 15223-1 (2016) (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 11).

Tabelle 11: Darstellung von Symbolen und ihren Bedeutungen.

	CE-Kennzeichnung
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Artikelnummer
	Fertigungslosnummer, Charge
	Hersteller
	Distributor
	Ausreichend für <n> Prüfungen
	Vor Sonnenlicht schützen
	Temperaturbegrenzung
	Verwendbar bis
	Nicht steril
	Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden

15. Änderungen zur vorherigen Gebrauchsanweisung (Version 09)

- Korrektur der Konzentrationen für LoD und LoQ in Kapitel **13.1.3**. Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LoD, LoQ)

16. Referenzen

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(2): 213-220. doi: 10.1016/j.eururo.2016.07.029. Erratum in: *Eur Urol.* 2017; 71(5): e161.

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(16): 1412-1423. doi: 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. <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(4): 858. doi: 10.3390/biomedicines10040858.

Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Am Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 304(8): E836-43. doi: 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.

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(4): 402-8.

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.

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(10). pii: E1221. doi: 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.

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(10). pii: E3130. doi: 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(4): 379-388. doi: 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: www.mirdetect.de
E-Mail: 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



Novatec Immundiagnostica GmbH,
part of Gold Standard Diagnostics Frankfurt
Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach

E-Mail: info@goldstandarddiagnostics.eu
Phone: +49 6074 23698-0

18. Anhang

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

Tabelle 12: Pipettierschema für die Herstellung eines cDNA-Synthese-Mastermixes für 2, 3, 4 und 5 Proben (inkl. 10 % Überschussvolumen), Rxn = Reaktionen.

Mastermix (MM) Reagenz	MM (2 Proben)	MM (3 Proben)	MM (4 Proben)	MM (5 Proben)
	4 Rxn (inkl. NC & optionale PP + Überschuss) [µl]	5 Rxn (inkl. NC & optionale PP + Überschuss) [µl]	6 Rxn (inkl. NC & optionale PP + Überschuss) [µl]	7 Rxn (inkl. NC & optionale PP + Überschuss) [µl]
cDNA Solution (schwarz)	34,36	42,96	51,55	60,14
Reverse Transcriptase (gelb)	4,4	5,5	6,6	7,7
RNase Inhibitor (durchsichtig)	0,84	1,05	1,25	1,46
Gesamtvolumen	39,6	49,5	59,4	69,3