



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



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

Índice

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Nome e finalidade do produto | 4 |
| 2. | Bases tecnológicas do processo de teste | 4 |
| 3. | Reagentes incluídos no kit..... | 5 |
| 3.1. | Componentes | 5 |
| 3.3. | Accessoires | 6 |
| 4. | Transporte, armazenamento e estabilidade | 6 |
| 5. | Equipamento adicionalmente necessário | 6 |
| 5.1. | Equipamento geral de laboratório | 6 |
| 5.2. | Consumíveis gerais e reagentes | 7 |
| 5.4. | Requisitos do aparelho..... | 7 |
| 6. | Medidas preventivas | 7 |
| 6.1. | Medidas preventivas no laboratório | 7 |
| 6.2. | Medidas preventivas para proteger contra infeções | 8 |
| 6.3. | Comunicação de eventos relacionados com o produto | 8 |
| 6.4. | Eliminação de materiais de trabalho e reagentes..... | 8 |
| 7. | Controlo de qualidade..... | 8 |
| 8. | Recolha e processamento de amostras | 9 |
| 8.1. | Recolha e armazenamento de sangue | 9 |
| 8.2. | Obtenção, armazenamento e transporte de soro..... | 9 |
| 8.3. | Medidas preventivas na obtenção de soro | 9 |
| 8.4. | Extração miRNA..... | 10 |
| 9. | Realização do M371-Test | 10 |
| 9.1. | Realização geral do teste..... | 10 |
| 9.2. | Realização da síntese cDNA..... | 11 |
| 9.3. | Realização da pré-amplificação | 12 |
| 9.4. | Preparação das amostras pré-amplificadas | 13 |
| 9.5. | Disposição da placa qPCR..... | 13 |
| 9.6. | Carregar a placa qPCR | 14 |
| 10. | Análise de resultados | 15 |
| 10.1. | Ficheiro de avaliação do M371-Test e importação de dados..... | 15 |
| 10.2. | Análise de resultados (instrumento LightCycler® 480 II) | 15 |
| 10.2.1. | Controlo negativo..... | 16 |
| 10.2.2. | Referência miR | 16 |
| 10.2.3. | Avaliação das amostras | 16 |

| | |
|--|----|
| 11. Guia da resolução de erros (Troubleshooting Guide) | 17 |
| 12. Limites do processo | 17 |
| 13. Dados de desempenho específicos | 18 |
| 13.1. Desempenho analítico..... | 18 |
| 13.1.1. Sensibilidade analítica | 18 |
| 13.1.2. Especificidade analítica | 18 |
| 13.1.3. Limite de prova e de quantificação (LoD, LoQ) | 18 |
| 13.1.4. Linearidade | 19 |
| 13.2. Precisão | 19 |
| 13.2.1. Precisão de repetição | 19 |
| 13.2.2. Precisão de comparação | 19 |
| 13.3. Capacidade clínica | 19 |
| 13.4. Interferência..... | 21 |
| 13.4.1. Hemólise..... | 21 |
| 13.4.2. Outros estados médicos..... | 21 |
| 13.4.3. Cross-Reactivity | 21 |
| 13.5. Breve relatório sobre segurança e desempenho | 22 |
| 14. Significado dos símbolos | 22 |
| 15. Alterações ao manual de instruções anterior (versão 09) | 23 |
| 16. Referências..... | 23 |
| 17. Informações para o comprador..... | 24 |
| 17.1. Fabricante..... | 24 |
| 17.2. Marcas comerciais..... | 24 |
| 17.3. Distribuidor..... | 24 |
| 18. Anexo..... | 25 |
| 18.1. Documentos relativos ao fabrico do cDNA-Synthese-Mastermix (MM)..... | 25 |

1. Nome e finalidade do produto

O diagnóstico de laboratório M371-Test é um diagnóstico in-vitro (IVD), 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 da veia cubital mediante 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 ou TGCT em inglês) e pode ser utilizado para o diagnóstico e controlo do processo (inglês “follow-up Monitoring”) deste tumor mediante utilizadores experientes. A população de teste engloba pacientes masculinos adultos com suspeita ou confirmação de um tumor de células germinais testiculares (tipo II, Germ Cell Neoplasia in situ derived TGCT). O resultados de teste não pode ser usado para o diagnóstico primário único de um tumor de células germinais testiculares. Cada M371-Test positivo devia ser confirmado por um processo adequado do diagnóstico clínico.

2. Bases tecnológicas do processo de teste

O kit de 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 do M371-Test.

O processo de prova baseia-se no comprovativo induzido por fluorescência do microRNA miR-371a-3p através do PCR quantitativo. Para medir este marcador tumoral, é preciso isolar o RNA, inclusivamente o microRNA, 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 microRNA 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 de miR-371a-3p é calculada, segundo o método $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001) pela referência miR e um valor fixo (calibrador).

O M371-Test pode originar três resultados diferentes:

RQ < 5 = negativo, baixa probabilidade tumoral

RQ 5-10 = indefinido, recomenda-se a repetição após algumas semanas

RQ > 10 positivo, elevada probabilidade tumoral

Para mais explicações 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) e, se desejar, também uma amostra positiva (PP). 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 e, se desejar, uma amostra positiva (ver tabela 1).

CUIDADO: Mede-se a amostra negativa e positiva na pré-amplificação e qPCR sempre apenas **uma vez!**

Tabela 1: Conteúdo do kit de 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 do artigo MCS0115HT – inclui reagentes para quinze amostras de paciente, um controlo negativo e, se desejar, uma amostra positiva. O utilizador tem de medir todas as amostras **numa** passagem (ver tabela 2).

Tabela 2: Conteúdo do kit de 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 μl |

3.2. Componentes reativos do M371-Test

Para a transcrição inversa durante a síntese cDNA, é usada uma transcriptase inversa (componente “Transcriptase”). O componente de M371-Test “PreAmp Solution” inclui TaqMan™ microRNA Assay. Este reagente contém iniciadores específicos miRNA e sondas TaqMan™. Ambos os componentes “Target Solution” e “Control Solution” incluem TaqMan™ microRNA-Assay e DNA-Polymerase.

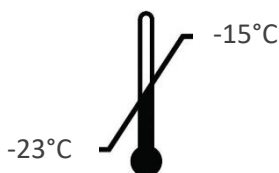
3.3. Acessórios

O ficheiro de avaliação do M371-Test (software de cálculo de tabelas com fórmulas de criadas) para a avaliação de amostras e o manual de instruções são transmitidos em formato eletrónico (via e-mail).

O manual de instruções, as fichas técnicas de segurança, bem como os tutoriais de vídeo estão igualmente disponíveis através da área de serviço em www.mirdetect.de/Service.

4. Transporte, armazenamento e estabilidade

O envio do M371-Test ocorre < 5°C via envio express. **No caso de danos de transporte, deve dirigir-se imediatamente à empresa de transportes e também à Novatec Immundiagnostica GmbH, part of Gold Standard Diagnostics Frankfurt.** 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.

- Software de cálculo de tabelas*
- 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 de M371-Test foi validado com Microsoft Excel 2019, 2003 e Apache OpenOffice 4.1.5.

** O M371-Test foi validado com Roche Diagnostics LightCycler® 480 II qPCR Instrument com bloco de aquecimento 96-Well e versão de software 1.5.x

5.2. Consumíveis gerais e reagentes

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

- Tubo de ensaio de sangue*
- Tubos criogénicos, independentes
- Kit de extração RNA-/miRNA**
- Reservatórios de reação de 1,5 ml com fundo cónico e tampa de segurança (PP)
- Reservatórios de reação PCR de 0,2 ml (8 tiras)
- 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).

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

5.4. 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

É necessário cumprir as regras da Boa Prática Laboratorial (Good Laboratory Practices, GLP) para evitar, antes, durante e depois da extração RNA, o risco de contaminação cruzada de amostras de pacientes. 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. A pipetagem da placa qPCR não devia ser efetuada sob radiação direta de luz.

Os reagentes do M371-Test podem ser descongelados até oito vezes. Depois disso não devia 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, que são analisadas com este teste, deviam basicamente ser tratadas como potencialmente infecciosas e deviam ser cumpridas todas as medidas preventivas, tal como estão 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 e às entidades competentes. 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 devia ser realizada por pessoal profissional qualificado para reduzir riscos inerentes para o paciente, e o conseqüente armazenamento de sangue e obtenção de soro deviam ocorrer conforme descrito a seguir:

- Devem ser usados tubos de ensaio de gel de soro S-Monovette® ou idênticos sem quaisquer aditivos para efeitos de recolha de sangue, de acordo com as indicações do fabricante.
- O soro devia ser o mais rapidamente possível após a recolha de sangue separado dos componentes celulares do 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 de pé durante 30 minutos à temperatura ambiente (15 – 25°C).
- Centrifugar durante 10 minutos o tubo de ensaio de sangue a 2500 x 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 devia 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 microRNA 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 de 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 efeitos de apoio e aconselhamento entre em contacto com a Novatec Immundiagnostica GmbH, part of Gold Standard Diagnostics Frankfurt (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 ensaios interlaboratoriais.

É preciso processar em conjunto 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 - também é apenas analisado na medição final miR-371a e referência miR.

Nota: Misture TODAS as soluções do kit - exclusivamente Reverse Transcriptase (amarelo) e RNase Inhibitor (transparente) - antes da sua utilização durante aprox. 3 segundos a aprox. 2,800 rpm num misturador de vórtice, para garantir uma solução homogênea.

Nota: Centrifuge TODAS as soluções do kit - inclusivamente Reverse Transcriptase (amarelo) e RNase Inhibitor (transparente) - antes da sua utilização durante aprox. 3 segundos a aprox. 2,000 x g, para eliminar gotas na tampa.

Nota: Retire todas as soluções do kit apenas para a realização do M371-Test das suas condições de armazenamento. 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.

9.2. Realização da síntese cDNA

- Descongelar cDNA Solution (preto) e PCR grade water (branco) à temperatura ambiente.
- 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 3.
- 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 4).
- Adicionar respetivamente 6 µl a mostrar ou controlo.

Tabela 3: 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] | 4 Rxn (incl. NC e opcional PP + 10 % excedente) [µl] |
| Solução cDNA (preto) | | 7,81 | 34,36 |
| Transcriptase inverso (amarelo) | | 1,00 | 4,4 |
| RNase Inhibitor (transparente) | | 0,19 | 0,84 |
| Volume total | | 9,00 | 39,6 |

Tabela 4: Distribuição do cDNA-Synthese-Mastermix (MM) e das amostras nos recipientes de reação PCR (8 tiras). Representação da realização para duas amostras, um controlo negativo (NC) e uma amostra positiva (PP).

| Recipientes de reação PCR |
|---------------------------|
| MM + amostra 1 |
| MM + amostra 2 |
| --- |
| --- |
| MM + NC |
| MM + PP* |
| --- |
| --- |

*opcional

- 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 5.

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

Tabela 5: Parâmetros do programa de síntese cDNA para um instrumento PCR padrão.

| Temperatura pretendida [°C] | Duração [hh:mm:ss] | Segmento |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| 16 | 00:30:00 | Hibridização de iniciadores |
| 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) à temperatura ambiente, depois misturar durante ca. 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 6).
- Para o controlo negativo e amostra positiva (opcional) 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 7.
- Os pré-amplificados prontos podem ser guardados durante a noite no frigorífico (+4°C). Congelar a -20°C para um armazenamento mais prolongado.

Tabela 6: Representação da realização de uma pré-amplificação para duas amostras, um controlo negativo (NC) e uma amostra positiva (PP).

| Recipientes de reação PCR |
|---------------------------|
| Amostra 1 |
| Amostra 1 |
| Amostra 1 |
| Amostra 2 |
| Amostra 2 |
| Amostra 2 |
| PP* |
| NC |

*opcional

Tabela 7: 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 | Hibridização de iniciadores + alongamento |
| 1 | ≤10 | ∞ | Arrefecer |

9.4. Preparação das amostras pré-amplificadas

- Descongelar Target Solution (azul) e Control Solution (violeta) à temperatura ambiente protegido da luz. Descongelar PCR-grade water (branco) à temperatura ambiente. Guardar reagentes no blocos de arrefecimento.
- Se necessário, descongelar os pré-amplificados à temperatura ambiente, 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 limpo.
- Adicionar a PCR-grade water todas as três bases de cada amostra. Isso corresponde a uma diluição de 1:1 (3 x 20 µl de pré-amplificado = 60 µl + 60 µl PCR-grade water).
- Submeter, para amostra negativa ou positiva, 20 µl de PCR-grade water num recipiente de reação limpo e adicionar pré-amplificados.

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). Para cada amostra negativa ou positiva respetivamente dois Wells (ver tabela 8).
- Pipetar 15 µl de Target Solution ou Control Solution nas correspondentes posições da placa qPCR.
- Pipetar 5 µl dos pré-amplificados agrupados e 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 durante 1 min a 500 x g com uma centrífuga de placas.

Tabela 8: Disposição recomendada da placa qPCR para a medição de duas amostras (P1, P2), um controlo negativo (NC) e amostra positiva (PP).

| | miR-371a | | | Referência miR | | | miR-371a | | | Referência miR | | |
|----------|------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|
| | Target Solution (azul) | | | Control Solution (violeta) | | | Target Solution (azul) | | | Control Solution (violeta) | | |
| | 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 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

*opcional

9.6. Carregar a placa qPCR

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

- Criar no software qPCR-Cycler um programa qPCR de acordo com a tabela 9.
- 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 tabela 8)
- 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 clicando em “Start Run” e inserir nome de identificação inequívoca.
- Concluído o curso, retire a placa qPCR do instrumento qPCR e elimine, sem remover a película de proteção.

Tabela 9: Programa qPCR para o instrumento LightCycler® 480 II.

| Programa parâmetros | Ativação de enzimas | PCR | | Arrefecer |
|-----------------------------|---|---------------------|----------|-----------|
| Bloco 96-well | Taxa de aquecimento 4,4°C/s & velocidade de arrefecimento 2,2°C/s | | | |
| Modo de análise | None | Quantification Mode | | None |
| Ciclos | 1 | 40 | | 1 |
| Passos | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Temperatura pretendida [°C] | 95 | 95 | 60 | 37 |
| Duração [hh:mm:ss] | 00:10:00 | 00:00:15 | 00:01:00 | 00:01:00 |
| Taxa de aquecimento [°C/s] | 4,4 | 4,4 | 2,2 | 2,2 |
| Modo de deteção | nenhum | nenhum | único | nenhum |
| Fluoróforo | nenhum | nenhum | FAM* | nenhum |

*Conjunto de filtros: Estímulo 465 nm e emissão 510 nm

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 de M371-Test faz parte, como software, do M371-Test e é transmitido em formato eletrónico (via e-mail) aquando a aquisição do kit. Para o uso seguro do ficheiro de avaliação de M371-Test não é possível alterar as áreas bloqueadas do ficheiro! Devia ser usada uma versão atual do software de tabela.

No ficheiro de avaliação de M371-Test estão destacadas a cores, a verde-claro, linhas editáveis (p. ex. designação das amostras e a inserção de dados de qPCR); todas as restantes linhas estão bloqueadas e não podem ser alteradas.

Depois de inserir os dados do curso qPCR no ficheiro de avaliação, a frequência relativa (RQ) de miR-371a é automaticamente calculada e aparece o resultado do teste.

10.2. Análise de resultados (instrumento LightCycler® 480 II)

Para este passo precisa do ficheiro de avaliação de teste M371 disponibilizado pela mir | detect. O processo aqui descrito refere-se ao instrumento 480 II qPCR Roche Diagnostics LightCycler® com bloco de aquecimento 96-Well e versão de software 1.5.x.

- No LightCycler® 480 Basic Software, 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 valores Ct medianos de miR-371a e referência miR são calculados automaticamente para cada amostra e apresentados na tabela de resultados “Replicate Statistics” em baixo do lado esquerdo.
- Transferir todos os resultados da tabela de resultados “Replicate Statistics” para o ficheiro de avaliação de M371-Test. Para tal, clicar no campo “Replicate Statistics”, marcar todos os dados com Strg + A e depois copiar os dados com Strg + C.
- Mudar para o ficheiro de avaliação de M371-Test.
- Clicar no campo “Samples” e inserir os dados com Strg-V (inserir).
- Os resultados do controlo negativo para a medição miR-371a e referência miR têm de ser manualmente introduzidos no ficheiro de avaliação. Com o cursor do rato sobre a respetiva posição Well no software LightCycler®, aparece o valor Ct medido.

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 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 e o controlo negativo para a medição de referência miR é **NEGATIVA**. O controlo negativo é negativo, quando o valor Ct para ambos os microRNA 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 e a medição de referência miR é positivo, quando o valor Ct para o microRNA 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. O M371-Test tem de ser repetido num curso desses para todas as amostras.

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

10.2.2. Referência miR

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

A faixa normal para o valor Ct da referência miR situa-se, com o instrumento 480 II LightCycler® 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, deviam ser novamente recolhidas e processadas com o M371-Test.

10.2.3. Avaliação das amostras

Uma amostra teste POSITIVO, quando a frequência relativa (RQ) é superior a 10.

Uma amostra teste NEGATIVO, quando a frequência relativa (RQ) é inferior a 5.

Não é possível uma afirmação clara para pacientes com uma frequência relativa entre 5 e 10 (UNCONFIRMED [NÃO CONFIRMADO]), pois é aqui que se encontra a faixa do limite de quantificação do teste. Neste caso, devia ser efetuado após algumas semanas outro M371-Test com uma amostra nova.

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 e referência-miR).
- Se, para uma amostra, o valor Ct da referência miR estiver acima de 22, devia 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, devia voltar a recolher a amostra e processá-la com o M371-Test, pois a amostra original estava provavelmente hemolítica.
- Se, para uma amostra, o RQ se situar entre 5 e 10, volte a recolher sangue do paciente, algumas semanas depois, e analise o soro de novo com o M371-Test.
- 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 GCNis).
- Só foram validados os qPCR-Cycler validados no capítulo 5.1. Equipamento geral de laboratório. Outros qPCR-Cycler têm de ser validados antes de o utilizador os usar.
- 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.
- Este produto só pode ser usado por pessoas com experiência e formação em testes PCR.
- O resultados de teste não pode ser usado para o diagnóstico primário único de um tumor de células germinais testiculares. Cada M371-Test positivo devia ser confirmado por um processo adequado do diagnóstico clínico.
- O resultado do M371-Test tem de ser avaliado em conjunto com outros parâmetros clínicos.
- Teratomes puros mal mostram qualquer expressão do marcador tumoral miR-371a-3p, pelo que este tipo de tumores não pode ser comprovado.
- A referência miR expressa-se de modo diferencial nos pacientes com Alzheimer, o que pode levar a resultados falsos (Song et al., 2019).
- Observaram-se resultados de teste positivos em grávidas, que não pertencem ao grupo-alvo dos pacientes a analisar com o M371 (Gu et al., 2013).

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 3 diluições de amostras mimic-miRNA, compostas por miR-371a e referência miR. Cada diluição foi medida em 10 réplicas com um lote de kit. Daí resultou que a menor diferença mensurável se situa em 2,56 – 3,08 pmol/L numa concentração de 61,5 pmol/L.

13.1.2. Especificidade analítica

Três diferentes amostras simuladoras de pacientes (expressão de miR-371a alta, média, nenhuma) foram medidas de modo puro e com impurezas fortes ou baixas (ADN, contaminação de proteína). Para todas as medições foi usado o mesmo lote de kit de M371-Test. Os resultados foram analisados numa análise de regressão.

O valor Ct de miR-371a 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 ADN/proteína causou valores Ct significativamente mais altos de miR-371a 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, devia prestar-se 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 e referência miR com seis níveis de diluição com seis réplicas. Todas as medições foram realizadas com um lote de kit de M371-Test.

O limite de prova (LoD) foi definido no protocolo de estudo, de modo a poderem 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) estava predefinido, de modo a que o coeficiente de variação fosse no máximo 50 %. Era esse o caso até uma concentração de 30,3 fM miR-371a. 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 poderem ser quantificados com exatidão, o valor Cut-off 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.

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 de kit de 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-Ct, havia concentrações de 5 fM a 500 fM na faixa linear. Numa concentração de 0,5 fM, o miR-371a 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 alta, média, baixa e nenhuma). Cada amostra foi processada em 30 réplicas com um lote de kit de 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 Limit of Quantification na avaliação.

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 PCR-Cycler e instrumentos qPCR-Cycler (LightCycler® 480II))

Por operador foram medidas quatro diferentes concentrações em amostras em duas réplicas (expressão alta, média, baixa e nenhuma miR-371a). Por tipo de placa foram medidas quatro concentrações (expressão alta, média, baixa e nenhuma miR-371a) com quatro réplicas respetivamente. Por laboratório foram medidas quatro concentrações (expressão alta, média, baixa e nenhuma miR-371a) 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 estudo 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 com tumor com amostras de 258 pacientes de controlo. A avaliação da capacidade clínica foi efetuada tanto através dos dados empíricos recolhidos no estudo, como através de uma avaliação da densidade Kernel. Com este processo matemático modelaram-se as características clínicas do M371-Test para um tamanho ilimitado da amostra. Uma vez que a avaliação da densidade fornece geralmente resultados conservadores, na tabela 10 são apresentados apenas estas características.

Tabela 10: Características clínicas do M371-Test da avaliação da densidade Kernel.

| Grupo | AUC | Sensibilidade | Especificidade | PPW* | NPW* | LR+ | LR- |
|--|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|
| KZT (n = 522) vs. controlos (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. controlos (n = 258) | 0,959 (0,94 – 0,972) | 87,1 (82,6 – 89,3) | 94,0 (91,4 – 96,6) | - | - | - | - |
| Não seminome (n = 199) vs. controlos (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. controlos (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. controlos (n = 258) | 0,996 (0,992 – 0,999) | 98,4 (96,2 – 99,5) | 94,0 (91,4 – 96,9) | - | - | - | - |

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, NPW: valor preditivo negativo, PPW: valor preditivo positivo. 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 (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 X. et al. também determinou uma subida de miR-371a-3p na recidiva (Rosas Plaza X. 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 β HCG) estava aumentado apenas em 38 % dos casos (Lobo et al., 2020).

A confiança, com a qual a expressão miR-371a comprova recidivas, continuou a ser reforçada por Fankhauser et al.. Num estudo com 30 pacientes foi possível determinar uma mais alta expressão miR-371a em 10/10 pacientes com recidivas, enquanto que miR-371a 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 mesmo após uma expressão aumentado. 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).

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

A doença de Alzheimer nos pacientes pode também causar resultados de falsos negativos. Neste quadro clínico, a referência miR está igualmente aumentada e adultera o resultado de teste. Observaram-se resultados de teste positivos também em grávidas, mas que não pertencem ao grupo-alvo dos pacientes por analisar. Estudos mais recentes indicam que miR-371a-3p está aumentada em pacientes com Covid-19 (Goebel et al., 2022). Se estes estudos se confirmarem, recomenda-se em caso de suspeita que se analise o estado Covid-19 do paciente paralelamente.

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 um foi enriquecido 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 ou obter soro ou um tubo de ensaio de gel de soro sem aditivos.

Não se pode excluir a deteção futura de mais interferências.

13.5. Breve relatório sobre segurança e desempenho














O atual breve relatório sobre segurança e desempenho pode ser consultado através de EUDAMED 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 (2016) (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 11).

Tabela 11: Representação de símbolos e respetivo significado.

| | |
|---|--|
|  | Identificação CE |
|  | Diagnóstico <i>in-vitro</i> |
|  | Observar manual de instruções |
|  | Número do artigo |
|  | Número do lote de produção, charge |
|  | Fabricante |
|  | Distribuidor |
|  | Suficiente para <n> ensaios |
|  | Proteger contra luz solar |
|  | Limite de temperatura |
|  | Validade |
|  | Não estéril |
|  | Não usar se a embalagem estiver danificada |

15. Alterações ao manual de instruções anterior (versão 09)

- Correção das concentrações para LoD e LoQ no capítulo 13.1.3. Limite de prova e de quantificação (LoD, LoQ)

16. Referências

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, 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.

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. Informações para o comprador

17.1. Fabricante



mir|detect GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven, Alemanha

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

Website: 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



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

E-mail: info@goldstandarddiagnostics.eu
Telefone: +49 6074 23698-0

18. Anexo

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

Tabela 12: 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) |
|--|---|---|---|---|
| | 4 Rxn (incl. NC & PP opcionais + excedente) [μl] | 5 Rxn (incl. NC & PP opcionais + excedente) [μl] | 6 Rxn (incl. NC & PP opcionais + excedente) [μl] | 7 Rxn (incl. NC & PP opcionais + excedente) [μl] |
| cDNA Solution (preto) | 34,36 | 42,96 | 51,55 | 60,14 |
| Reverse Transcriptase (amarelo) | 4,4 | 5,5 | 6,6 | 7,7 |
| RNase Inhibitor (transparente) | 0,84 | 1,05 | 1,25 | 1,46 |
| Volume total | 39,6 | 49,5 | 59,4 | 69,3 |