

# M371-Test

Diagnostica in-vitro: uso unicamente da parte di utenti esperti

**REF** MCS0105

**REF** MCS0115HT

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di impiegare il test e seguirle con precisione per assicurare l'affidabilità dei risultati.



Versione 16, © mir|detect GmbH, aggiornato al 01/09/2026.



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

## Contenuto

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Nome e destinazione d'uso del prodotto.....                            | 4  |
| 2. Basi tecnologiche della procedura di prova .....                       | 4  |
| 3. Reagenti inclusi nel kit.....                                          | 6  |
| 3.1. Componenti.....                                                      | 6  |
| 3.2. Componenti reattivi dell'M371-Test .....                             | 7  |
| 3.3. Informazioni e documenti relativi all'M371-Test .....                | 7  |
| 3.4. Accessori opzionali all'M371-Test .....                              | 7  |
| 3.5. Sostanze pericolose e componenti animali nel kit dell'M371-Test..... | 7  |
| 4. Trasporto, conservazione e stabilità .....                             | 8  |
| 5. Attrezzatura aggiuntiva richiesta .....                                | 9  |
| 5.1. Attrezzatura generale di laboratorio.....                            | 9  |
| 5.2. Materiali di consumo generali e reagenti .....                       | 9  |
| 5.3. Requisiti del dispositivo.....                                       | 10 |
| 6. Misure precauzionali .....                                             | 10 |
| 6.1. Misure precauzionali in laboratorio .....                            | 10 |
| 6.2. Misure precauzionali per la protezione dalle infezioni .....         | 10 |
| 6.3. Segnalazione di risultati in relazione al prodotto.....              | 11 |
| 6.4. Smaltimento di materiali di lavoro e reagenti.....                   | 11 |
| 7. Controllo qualità.....                                                 | 11 |
| 8. Raccolta ed elaborazione di campioni.....                              | 12 |
| 8.1. Prelievo di sangue e conservazione dei campioni.....                 | 12 |
| 8.2. Precauzioni da adottare durante il prelievo di siero e plasma.....   | 13 |
| 8.3. Estrazione di miRNA .....                                            | 13 |
| 9. Esecuzione dell'M371-Test.....                                         | 14 |
| 9.1. Esecuzione generale del test .....                                   | 14 |
| 9.2. Esecuzione della sintesi del cDNA .....                              | 15 |
| 9.3. Esecuzione della preamplificazione .....                             | 17 |
| 9.4. Preparazione dei campioni preamplificati .....                       | 18 |
| 9.5. Posizionamento della piastra qPCR.....                               | 18 |
| 9.6. Caricamento della piastra qPCR .....                                 | 19 |
| 10. Analisi dei risultati .....                                           | 20 |
| 10.1. File di valutazione dell'M371-Test e importazione dei dati .....    | 20 |
| 10.2. Analisi dei risultati .....                                         | 21 |
| 10.2.1. Controllo negativo.....                                           | 22 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 10.2.2. miR di riferimento .....                                                                 | 22 |
| 10.2.3. Valutazione dei campioni .....                                                           | 22 |
| 11. Guida alla risoluzione dei problemi (Troubleshooting Guide) .....                            | 23 |
| 12. Limiti della procedura.....                                                                  | 24 |
| 13. Dati specifici sulle prestazioni .....                                                       | 25 |
| 13.1. Prestazioni analitiche .....                                                               | 25 |
| 13.1.1. Sensibilità analitica.....                                                               | 25 |
| 13.1.2. Specificità analitica.....                                                               | 25 |
| 13.1.3. Limite di rilevabilità e quantificazione (LoD, LoQ) .....                                | 25 |
| 13.1.4. Linearità.....                                                                           | 26 |
| 13.2. Precisione .....                                                                           | 26 |
| 13.2.1. Precisione di ripetibilità.....                                                          | 26 |
| 13.2.2. Precisione di confronto .....                                                            | 26 |
| 13.3. Prestazioni cliniche.....                                                                  | 26 |
| 13.4. Interferenza.....                                                                          | 29 |
| 13.4.1. Emolisi .....                                                                            | 29 |
| 13.4.2. Altre condizioni mediche.....                                                            | 29 |
| 13.4.3. Reattività incrociata .....                                                              | 29 |
| 13.5. Summary of Safety and Performance (Relazione breve sulla sicurezza e le prestazioni) ..... | 30 |
| 14. Significato dei simboli.....                                                                 | 30 |
| 15. Modifiche alle precedenti istruzioni per l'uso.....                                          | 31 |
| 15.1. Modifiche alla versione 15 .....                                                           | 31 |
| 16. Riferimenti.....                                                                             | 31 |
| 17. Informazioni per gli acquirenti .....                                                        | 33 |
| 17.1. Fabbricante.....                                                                           | 33 |
| 17.2. Marchi commerciali.....                                                                    | 33 |
| 17.3. Distributori .....                                                                         | 33 |
| 18. Allegato.....                                                                                | 34 |
| 18.1. Modelli per la preparazione del Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA (MM) .....          | 34 |

## 1. Nome e destinazione d'uso del prodotto

L'M371-Test è un test diagnostico in vitro (IVD) certificato secondo il Regolamento (UE) 2017/746 IVDR, basato sulla misurazione della quantificazione relativa (RQ) del marcatore tumorale miR-371a-3p. A tal fine, si quantificano miR-371a-3p e un controllo endogeno in 200 µl di siero o plasma mediante qPCR.

L'M371-Test è un test non automatico con un'interpretazione qualitativa del risultato, che dimostra la presenza di tumori a cellule germinali testicolari (KZT, tipo II, tumore a cellule germinali testicolari derivato in situ della neoplasia germinale ingrese (TGCT derivato da GCNis)), impiegabile per la diagnosi e il controllo di processo (ingl. "follow-up monitoring") di questo tumore tramite utenti esperti. La popolazione di prova include pazienti maschi adulti con il sospetto o la conferma di un tumore a cellule germinali testicolari (tipo II, TGCT derivato da GCNis). Il risultato del test non può essere utilizzato per la sola diagnosi primaria di un tumore a cellule germinali testicolari o per rilevare una recidiva. Ogni M371-Test positivo dovrebbe essere confermato da una procedura adeguata della diagnostica clinica.

## 2. Basi tecnologiche della procedura di prova

Il kit dell'M371-Test contiene tutti i reagenti per effettuare le analisi del sangue necessarie per rilevare i tumori delle cellule germinali del testicolo dal miRNA già estratto. Per la valutazione delle prove viene messo a disposizione il file di valutazione opzionale dell'M371-Test.

La procedura di prova si basa sul rilevamento indotto dalla fluorescenza del microRNA (miRNA) miR-371a-3p mediante PCR quantitativa in tempo reale. Per misurare questo marcatore tumorale, è necessario isolare l'RNA, compresi i miRNA, dal campione del paziente (siero o plasma). I reagenti per questa prima fase di isolamento **non** sono inclusi nel kit.

Nel passaggio successivo, il marcatore tumorale miR-371a-3p e un ulteriore miRNA, che funge da controllo endogeno (di seguito: miR di riferimento), vengono trascritti in cDNA con primer specifici. Nel seguente passaggio di preamplificazione, il cDNA viene amplificato in una PCR (preamplificazione). In seguito, utilizzando una PCR quantitativa, la quantificazione relativa del marcatore tumorale miR-371a-3p viene definita e normalizzata mediante il miR di riferimento. Prima viene rilevato un segnale di fluorescenza durante la qPCR, più molecole del marcatore tumorale o del miR di riferimento erano presenti nel campione. Questi valori sono riportati come valori "Ct". La frequenza relativa (QR) di miR-371a-3p è calcolata secondo il metodo  $\Delta\Delta Ct$  (Livak & Schmittgen, 2001) dal miR di riferimento e da un valore fisso (calibratore). Per ciascun campione viene innanzitutto calcolato il valore  $\Delta Ct$ :  $\Delta Ct = Ct(\text{miR-371a-3p}) - Ct(\text{miR di riferimento})$ . Viene poi calcolata la differenza tra il valore  $\Delta Ct$  del campione e il valore  $\Delta Ct$  del calibratore, la cui espressione relativa del miR-371a-3p è pari a 1:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{campione}) - \Delta Ct(\text{calibratore})$ . L'espressione relativa viene calcolata rispettivamente con la seguente formula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Il valore RQ è un multiplo dell'espressione del calibratore. Il file di valutazione fornito opionalmente ("File di valutazione M371-Test" vedi capitolo 3.4. Accessori opzionali all'M371-Test) può eseguire questi calcoli dopo che i valori Ct misurati sono stati trasferiti correttamente.

I risultati dell'M371-Test devono essere valutati tenendo conto dello scenario clinico, a seconda che il test venga utilizzato per fare una diagnosi primaria o per rilevare recidive nel follow-up di pazienti con tumore testicolare (Tabella 1). Nell'ambito della diagnosi primaria, non è possibile un'affermazione chiara per i campioni con una quantificazione relativa compresa tra 5 e 10 (INDETERMINATA), poiché questa rientra nell'intervallo del limite di quantificazione del test. In questo caso, deve aver luogo un altro M371-Test con un campione fresco dopo alcune settimane.

Tabella 1: Interpretazione dei risultati dell'M371-Test in base allo scenario clinico.

| <b>Diagnosi primaria (riconoscimento di tumori primari)</b> |                                                                  |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| RQ < 5                                                      | Negativo, bassa probabilità di tumore                            |
| $5 \leq \text{RQ} < 10$                                     | Indeterminato (INDETERMINATO), ripetizione dopo alcune settimane |
| $\text{RQ} \geq 10$                                         | Positivo, elevata probabilità di tumore                          |
| <b>Assistenza post-terapia (riconoscimento di recidive)</b> |                                                                  |
| RQ < 15                                                     | Negativo, bassa probabilità di recidiva                          |
| $\text{RQ} \geq 15$                                         | Positivo, elevata probabilità di recidiva                        |

Per ulteriori chiarimenti sulla prova scientifica, vedere il capitolo “13. Dati specifici sulle prestazioni” delle presenti istruzioni per l’uso.

Ogni analisi viene eseguita con un controllo negativo (NC). Per la valutazione e la validità dei controlli, vedere il capitolo “10. Analisi dei risultati” delle presenti istruzioni per l’uso.

### 3. Reagenti inclusi nel kit

#### 3.1. Componenti

L'M371-Test viene offerto in due varianti (codice articolo MCS0105 e codice articolo MCS0115HT).

**Codice articolo MCS0105** – contiene reagenti per cinque campioni di pazienti e cinque controlli negativi. L'utente può misurare ogni campione individualmente con un controllo negativo (vedi Tabella 2).

ATTENZIONE: il controllo negativo viene misurato solo **una volta** nella preamplificazione e nella qPCR!

Tabella 2: Contenuto del kit dell'M371-Test MCS0105.

| Reagenti                       | Provette   | Volume [μl]  |
|--------------------------------|------------|--------------|
| cDNA Solution (nero)           | 1 provetta | <b>90</b>    |
| Reverse Transcriptase (giallo) | 1 provetta | <b>13,12</b> |
| RNase Inhibitor (trasparente)  | 1 provetta | <b>2,49</b>  |
| PreAmp Solution (verde)        | 1 provetta | <b>350</b>   |
| Target Solution (blu)          | 1 provetta | <b>328</b>   |
| Control Solution (violetto)    | 1 provetta | <b>328</b>   |
| PCR-grade water (bianco)       | 1 provetta | <b>1000</b>  |

**Codice articolo MCS0115HT** – contiene reagenti per quindici campioni di pazienti e un controllo negativo. L'utente deve misurare tutti i campioni in **una volta** (vedi Tabella 3).

Tabella 3: Contenuto del kit dell'M371-Test MCS0115HT.

| Reagenti                       | Provette   | Volume [μl]  |
|--------------------------------|------------|--------------|
| cDNA Solution (nero)           | 1 provetta | <b>153</b>   |
| Reverse Transcriptase (giallo) | 1 provetta | <b>22,30</b> |
| RNase Inhibitor (trasparente)  | 1 provetta | <b>4,24</b>  |
| PreAmp Solution (verde)        | 1 provetta | <b>786</b>   |
| Target Solution (blu)          | 1 provetta | <b>770</b>   |
| Control Solution (violetto)    | 1 provetta | <b>770</b>   |
| PCR-grade water (bianco)       | 1 provetta | <b>1000</b>  |

### 3.2. Componenti reattivi dell'M371-Test

#### **cDNA Solution (nero)**

- Primer stemloop specifici per miRNA per il miRNA target e di riferimento

#### **Reverse Transcriptase (giallo)**

- Reverse Transcriptase

#### **PreAmp Solution (verde)**

- Primer specifici per miRNA per il miRNA target e di riferimento
- DNA polimerasi

#### **Target Solution (blu)**

- Primer specifici per miRNA e sonda per il miRNA target
- DNA Polymerase

#### **Control Solution (violetto)**

- Primer specifici per miRNA e sonda per il miRNA di riferimento
- DNA Polymerase

### 3.3. Informazioni e documenti relativi all'M371-Test

Le istruzioni per l'uso e i video tutorial per l'esecuzione di test sono disponibili anche sul sito di mir|detect <https://www.mirdetect.de/download>. Se vengono pubblicate istruzioni per l'uso riviste, i clienti verranno informati della nuova versione tramite e-mail. Una versione cartacea delle istruzioni per l'uso è disponibile tramite modulo di contatto sul nostro sito web (<https://www.mirdetect.de/Service/>) o richiesta via e-mail.

### 3.4. Accessori opzionali all'M371-Test

Il file di valutazione dell'M371-Test ("M371-Test Evaluation File"; disponibile solo in lingua inglese) è un software opzionale per foglio di calcolo con formule memorizzate per la valutazione di campioni e viene inviato in formato elettronico (via e-mail). Le versioni aggiornate vengono consegnate ugualmente via e-mail.

### 3.5. Sostanze pericolose e componenti animali nel kit dell'M371-Test

I componenti PreAmp Solution, Target Solution e Control Solution contengono formammidine in concentrazioni molto basse. Non tutti i componenti dell'M371-Test sono nocivi per la salute. Secondo la direttiva 1999/45/CE e i regolamenti (CE) 1907/2006 e 1272/2008, per l'M371-Test non occorre nessuna scheda dati, in quanto questa include una quantità inferiore all'1% di componenti classificati come pericolosi e non superiore allo 0,1% dei componenti classificati come cancerogeni. Per questo, la mir|detect GmbH non fornisce alcuna scheda dati di sicurezza per questo prodotto. Sebbene quando si lavora con queste o altre sostanze chimiche sia sempre necessario indossare guanti protettivi, indumenti adatti e occhiali di sicurezza, la mir|detect GmbH declina qualsiasi responsabilità per danni materiali e/o lesioni come conseguenza di un utilizzo di questo prodotto o di un contatto con lo stesso.

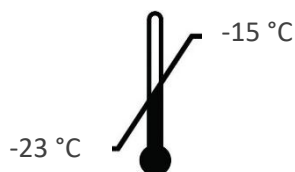
Una materia prima utilizzata per produrre Target Solution e Control Solution contiene gelatina animale. Il produttore della materia prima garantisce che il rischio di contaminazione da BSE/TSE sia trascurabile.

Inoltre, il rischio è ridotto al minimo utilizzando indumenti da lavoro protettivi (guanti, camici da laboratorio e occhiali di sicurezza, vedi il capitolo “6. Misure precauzionali”) e lavorando sotto un banco di lavoro PCR durante l’esecuzione dell’M371-Test. L’M371-Test può essere eseguito solo da utenti specializzati.

## 4. Trasporto, conservazione e stabilità

L’invio dell’M371-Test viene spedito a  $< 0^{\circ}\text{C}$  in modalità Express. **Nel caso di danni da trasporto, rivolgersi tempestivamente sia all’impresa di trasporti che a mir|detect GmbH o ai nostri partner di distribuzione presso cui si è acquistato l’M371-Test.** I dati di contatto sono indicati al capitolo “17.

Informazioni per gli acquirenti”. Le provette di reagenti danneggiate non vanno utilizzate e devono essere smaltite subito. Lo stesso vale per i kit non sufficientemente raffreddati durante il trasporto. I componenti di lotti di kit diversi non vanno mescolati insieme.



Conservare tutti i reagenti del kit prima e dopo la prima apertura a temperature tra i  $-23^{\circ}\text{C}$  e i  $-15^{\circ}\text{C}$ . Proteggere Target Solution (blu) e Control Solution (violetto) dalla luce. Ogni componente può essere scongelato e ricongelato fino a otto volte.



A condizione che siano rispettate le condizioni di conservazione, il kit può essere utilizzato fino alla data di scadenza riportata all'esterno del kit (durata massima possibile: dieci mesi). Non utilizzare i materiali dopo la data di scadenza.

## 5. Attrezzatura aggiuntiva richiesta

### 5.1. Attrezzatura generale di laboratorio

Occorre la seguente attrezzatura di laboratorio per eseguire l'M371-Test.

- Accessori opzionali: file di valutazione dell'M371-Test ("M371-Test Evaluation file")\*
- Banco di lavoro PCR.
- Strumento PCR standard
- Blocco di raffreddamento per le provette di reazione utilizzate.
- Miscelatore Vortex
- Pipetta con volume modificabile in dimensioni adeguate.
- Opzionale: dispenser elettronico
- Centrifuga da tavolo con un rotore per provette di reazione da 0,2/1,5 ml
- Centrifuga a piastre per piastre PCR
- Strumento PCR\*\* in tempo reale

\*Il file di valutazione per l'M371-Test è stato convalidato con Microsoft Excel per Microsoft 365 MSO.

\*\* L'M371-Test è stato validato con i seguenti termociclatori per PCR in tempo reale:

- LightCycler® 480 II qPCR Instrument (Roche Diagnostics) con blocco riscaldante a 96 pozzetti
- cobas® Strumento cobas® z 480 qPCR (Roche Diagnostics) con blocco riscaldante a 96 pozzetti
- LightCycler® PRO qPCR Instrument (Roche Diagnostics) con blocco riscaldante a 96 pozzetti
- QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) con blocco riscaldante a 96 pozzetti
- QuantStudio™ 5 Dx (Thermo Fisher Scientific) con blocco riscaldante a 96 pozzetti
- AriaDx (Agilent) con blocco riscaldante a 96 pozzetti
- CFX96™ qPCR Instrument (BioRad) con blocco riscaldante a 96 pozzetti

### 5.2. Materiali di consumo generali e reagenti

Tutti i materiali di consumo impiegati devono essere realizzati in polipropilene ed essere privi di RNase, DNase, DNA e inibitori PCR.

- Provette per prelievo di sangue\*
- Criotubi, autoportanti
- Kit di estrazione\*\* miRNA
- Provette da 1,5 ml con fondo conico e coperchio di sicurezza (polipropilene)
- Provette di reazione PCR da 0,2 ml (es. 8 strisce)
- Punte delle pipette con filtro
- Opzionale: attacco per dispenser elettronico
- Piastre PCR con pellicola adesiva
- Applicatore per l'adesione di pellicole adesive

\* necessario per il prelievo di siero o plasma. Per il siero consigliato con Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® Serum-Gel CAT (7,5 ml o 9 ml). Per il plasma, utilizzare **esclusivamente** S-Monovette® cfDNA Exact (9,2 ml); per informazioni più dettagliate sul prelievo di siero o plasma, consultare il capitolo "8. Raccolta ed elaborazione di campioni".

\*\* necessario per l'estrazione di miRNA. Si raccomanda di effettuare l'estrazione dell'RNA con i seguenti metodi:

- per siero e plasma: kit siero/plasma QIAGEN GmbH miRNeasy

- per siero e plasma: kit plasma e siero Maxwell® RSC miRNA di Promega
- solo per plasma: kit per l'isolamento dell'RNA totale MagMAX™ mirVana™ con KingFisher® Apex Dx di Thermo Fisher Scientific

### 5.3. Requisiti del dispositivo

Le operazioni di installazione, calibrazione, qualificazione funzionale e manutenzione di tutte le apparecchiature e i dispositivi utilizzati vanno eseguite nel rispetto delle indicazioni del produttore e sono responsabilità dell'utente del test. Ad egli spetta anche la definizione di adeguate procedure di controllo della qualità.

## 6. Misure precauzionali

L'utente professionale è responsabile del rispetto delle normative di laboratorio applicabili. Durante il lavoro con prodotti chimici, indossare sempre un camice di laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali protettivi.

### 6.1. Misure precauzionali in laboratorio

È necessario rispettare normative come DIN EN ISO 17025 o DIN EN ISO 15189 per evitare il rischio di contaminazione incrociata dei campioni dei pazienti prima, durante e dopo l'estrazione dell'RNA. Durante l'estrazione, impedire l'introduzione di nucleasi nei campioni. Consigliamo esclusivamente l'uso di punte di pipette monouso con filtro per evitare una contaminazione incrociata tra i campioni dei pazienti.

I risultati della misurazione possono essere influenzati da temperature esterne notevolmente aumentate. Conservare sempre i reagenti e i campioni in blocchi di raffreddamento fuori dal congelatore.

I reagenti per qPCR (Control Solution (violetto) e Target Solution (blu)) sono fotosensibili e devono pertanto essere conservati al riparo dalla luce. Un'eccessiva esposizione alla luce può influenzare le sonde fluorescenti.

I reagenti dell'M371-Test possono essere scongelati fino a 8 volte. Inoltre, i reagenti non vanno riutilizzati.

L'M371-Test deve essere eseguito esclusivamente da operatori professionali che abbiano familiarità con le tecniche di raccolta del siero/plasma, di estrazione dell'RNA e di qPCR.

### 6.2. Misure precauzionali per la protezione dalle infezioni

I campioni di siero/plasma e sangue umano esaminati con questo test dovrebbero essere sostanzialmente trattati come potenzialmente infettivi e bisognerebbe pertanto osservare tutte le misure precauzionali, come prescritto nella Direttiva per la sicurezza biologica e microbiologica per i laboratori "Direttiva 2000/54/CE relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro" o in altre normative sulla sicurezza biologica.

### 6.3. Segnalazione di risultati in relazione al prodotto

Qualsiasi incidente o evento grave correlato al prodotto deve essere segnalato immediatamente a mir|detect GmbH ([vigilance@mirdetect.de](mailto:vigilance@mirdetect.de)) e alle autorità competenti.

Si prega di non prendere decisioni rilevanti dal punto di vista medico senza prima consultare un operatore sanitario.

### 6.4. Smaltimento di materiali di lavoro e reagenti

Non tutti i reagenti dell'M371-Test sono nocivi per la salute. I reagenti scaduti o i contenitori di reagenti vuoti possono essere smaltiti nei rifiuti generici. Osservare le disposizioni locali in merito. **Non rimuovere mai la pellicola dalle piastre qPCR utilizzate** e garantire uno smaltimento senza danni.

Per quanto riguarda la manipolazione e lo smaltimento dei campioni di siero e plasma, nonché dei materiali e dei reagenti utilizzati per l'estrazione dell'RNA, si prega di leggere attentamente le indicazioni contenute nelle istruzioni per l'uso dei kit corrispondenti e di attenersi scrupolosamente a esse.

## 7. Controllo qualità

In conformità al sistema di gestione della qualità con certificazione ISO 13485 di mir|detect GmbH, ogni lotto dell'M371-Test viene testato sulla base delle specifiche indicate, al fine di assicurare una qualità di prodotto costante. Questo mantiene bassa la variabilità tra i lotti. I certificati di lotto sono disponibili su richiesta presso il produttore.

## 8. Raccolta ed elaborazione di campioni

### 8.1. Prelievo di sangue e conservazione dei campioni

Il prelievo di sangue dovrebbe essere effettuato da personale qualificato, al fine di ridurre i rischi associati per il paziente, e il successivo recupero e conservazione del siero/plasma dovrebbero avvenire come descritto di seguito.

#### Informazioni importanti:

- Si prega di riempire sempre le provette **fino al volume nominale**.
- **I campioni di sangue intero non vanno congelati** poiché ciò ne causerebbe l'emolisi.

Tabella 4: Panoramica sul trattamento, lo stoccaggio e la spedizione di siero e plasma.

|                                                                                        | Campione di siero                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Campione di plasma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Materiale</b>                                                                       | Raccomandazione: <ul style="list-style-type: none"><li>• S-Monovette® Serum-Gel CAT 9,0 ml, cod. art. 02.1388.001 oppure</li><li>• S-Monovette® Serum-Gel CAT 7,5 ml, cod. art. 01.1602.001</li><li>• Non utilizzare provette per plasma, EDTA, eparina o PAXgene.</li></ul>                                                    | <b>Esclusivamente:</b><br>S-Monovette® cfDNA Exact, 9,2 ml, cod. art. 01.2040.001                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Fasi operative immediatamente successive al prelievo di sangue</b>                  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Invertire più volte il sangue contenuto nel S-Monovette® Serum-Gel CAT, quindi incubare <b>in posizione verticale</b> a temperatura ambiente per 30–60 minuti.</li><li>• Centrifugare per 10 minuti a 2500 <i>g</i>.</li><li>• Pipettare il siero in un criotubo etichettato.</li></ul> | È possibile effettuare la spedizione diretta non refrigerata al laboratorio in un imballaggio esterno adeguato. Non conservare in frigorifero né nel congelatore!<br>È stata dimostrata la stabilità del campione di sangue contenuto nella S-Monovette® cfDNA Exact per un periodo massimo di 48 ore a una temperatura massima di 30 °C. |
| <b>Condizioni di trasporto</b>                                                         | Congelato, max. 96 ore.                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Trasporto a temperatura ambiente, per un massimo di 48 ore.                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Estrazione del plasma dopo il ricevimento del campione da parte del laboratorio</b> | N. d.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <ul style="list-style-type: none"><li>• Centrifugare S-Monovette® cfDNA Exact per 10 minuti a 2500 <i>g</i>.</li><li>• Trasferire il plasma in provette adatte (da 1,5 o 2,0 ml) e centrifugare per 15 minuti a 15.000 <i>g</i>.</li><li>• Pipettare il plasma in una provetta criogenica etichettata.</li></ul>                          |
| <b>Condizioni di conservazione del siero/plasma separato</b>                           | <ul style="list-style-type: none"><li>• Solo se l'estrazione dell'RNA è prevista per lo stesso giorno: per un massimo di 6 ore a una temperatura compresa tra +2 e +8 °C.<ul style="list-style-type: none"><li>• A -20 °C per un massimo di 16 giorni.</li><li>• A lungo termine a -80 °C.</li></ul></li></ul>                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

## 8.2. Precauzioni da adottare durante il prelievo di siero e plasma

In caso di colorazione rossastra evidente del siero o del plasma, si raccomanda di effettuare una misurazione fotometrica all'assorbimento di 414 nm. Un valore superiore a 0,3 indica un possibile grado di emolisi problematico, che influisce negativamente sul risultato della misurazione dell'M371-Test (Myklebust et al., 2019). In questo caso è consigliabile effettuare un nuovo prelievo di sangue e smaltire il siero o il plasma emolitico.

Un valore Ct molto basso <12 del miR di riferimento può indicare la presenza di un'emolisi e falsare il risultato (vedere il capitolo "10.2.2. miR di riferimento").

Se vi sono indicazioni che il siero o il plasma siano particolarmente ricchi di grassi, lasciateli riposare per un po' a temperatura ambiente. Si formerà uno strato di grasso che potrà essere poi accuratamente rimosso.

Assicurarsi che lo strato di film di leucociti (buffy coat) sopra i globuli rossi non venga distrutto o trasferito dopo la fase di centrifugazione. Questo passaggio è particolarmente importante, poiché il trasferimento rappresenta la più grande fonte possibile di contaminazione con miRNA o RNA cellulare.

## 8.3 Estrazione di miRNA

I materiali necessari per l'estrazione di RNA o miRNA dal siero o dal plasma dei pazienti non sono inclusi nel test M371.

Per evitare la degradazione del materiale del campione durante l'estrazione dell'RNA, è necessario prestare attenzione nell'utilizzare materiali di lavoro privi di RNase, DNase e DNA e dispositivi di protezione individuale. Inoltre, vanno evitate le contaminazioni incrociate tra i campioni dei pazienti.

**Attenzione:** evitare incubazioni prolungate e ripetuti scongelamenti in quanto ciò può portare al degrado!

Si raccomanda di effettuare l'estrazione dell'RNA con i seguenti metodi:

- per siero e plasma: kit siero/plasma QIAGEN GmbH miRNeasy
- per siero e plasma: kit plasma e siero Maxwell® RSC miRNA di Promega
- solo per plasma: kit per l'isolamento dell'RNA totale MagMAX™ mirVana™ con KingFisher® Apex Dx di Thermo Fisher Scientific

L'estrazione di RNA avviene secondo le istruzioni per l'uso. mir|detect GmbH raccomanda di effettuare l'estrazione dell'RNA da **200 µL di siero o plasma**. Per garantire un'estrazione costantemente efficiente occorre seguire rigorosamente i dati del produttore per il kit di estrazione.

- Il miRNA estratto può essere utilizzato direttamente per l'esecuzione dell'M371-Test.
- I miRNA devono essere conservati a -20 °C per un massimo di 16 giorni o a -80 °C per periodi più lunghi.
- **Attenzione:** evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti di miRNA, i quali potrebbero causarne la degradazione!

## 9. Esecuzione dell'M371-Test

Tutti i reagenti del kit dell'M371-Test sono “pronti all'uso” e dunque impiegabili direttamente per l'esecuzione del test.

### 9.1. Esecuzione generale del test

Prima del primo impiego dell'M371-Test si consiglia un ciclo di prova con campioni noti. Per ricevere supporto e consulenza, contattare **mir|detect GmbH** (modulo di contatto su <https://www.mirdetect.de/Service/>) o i nostri partner di distribuzione presso cui si è acquistato l'M371-Test. (17.3. Distributori).

Per il monitoraggio e l'esecuzione equivalente dell'M371-Test in tutti i laboratori, mir|detect GmbH raccomanda di partecipare a regolari confronti di laboratorio (modulo di contatto tramite <https://www.mirdetect.de/Service/>).

Un controllo negativo (NC) fatto di PCR-grade water deve essere elaborato in ogni analisi per essere valido. Il controllo viene riscritto nella sintesi del cDNA ma, a differenza di un campione del paziente, viene semplicemente analizzato nella misurazione miR-371a-3p finale e di riferimento.

#### Informazioni importanti:

- i componenti Reverse Transcriptase (giallo) e RNase Inhibitor (trasparente) non devono essere miscelati agitando su vortex. Agitare la provetta con il dito. Miscelare agitando su vortex i restanti componenti prima dell'uso per circa 3 secondi a circa 2.800 rpm per garantire una soluzione omogenea.
- Centrifugare tutte le soluzioni del kit: prima dell'uso, per circa 3 secondi a 2000 g, per rimuovere le gocce dal tappo.
- Rimuovere tutte le soluzioni del kit dalle condizioni di conservazione solo per eseguire l'M371-Test. Utilizzare il Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA subito dopo la sua produzione. Dopo l'uso, tutte le soluzioni devono essere nuovamente congelate immediatamente o i contenitori vuoti vanno smaltiti.
- Si consiglia di utilizzare blocchi di raffreddamento/cooling racks adeguati per tutti i recipienti di reazione, comprese le strisce da 8 pozzetti e la piastra da 96 pozzetti. Questi facilitano la manipolazione e garantiscono il raffreddamento continuo dei reagenti.
- I programmi di temperatura (Tabelle 7, 9 e 10) indicano le condizioni richieste per le rispettive reazioni. Inoltre deve essere attivato il coperchio riscaldante (consigliato: 105 °C). Osservare le istruzioni per l'uso del proprio dispositivo.

## 9.2. Esecuzione della sintesi del cDNA

- Scongellare cDNA Solution (nero) e PCR-grade water (bianco) a temperatura ambiente o in frigorifero.
- Miscelare la cDNA Solution agitandola su vortex per circa 3 sec., centrifugare e conservare nel blocco di raffreddamento.
- Miscelare Reverse Transcriptase (giallo) e RNase Inhibitor (trasparente) agitando (non su vortex), centrifugare e conservare in un blocco di raffreddamento.

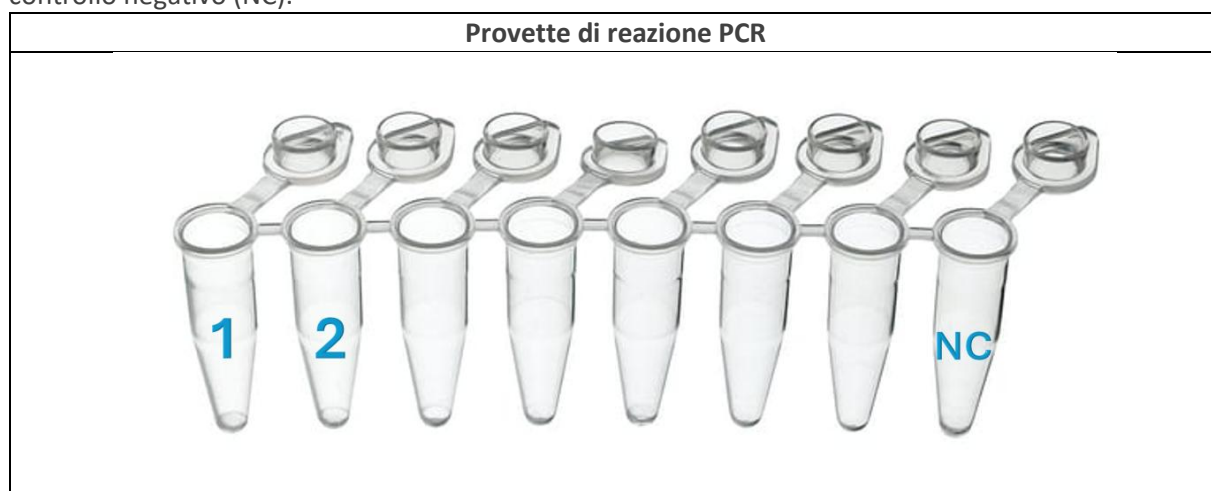
Eseguire i passaggi successivi sotto un banco PCR pulito.

- Pipettare il Mastermix (MM) per la sintesi di cDNA dalla cDNA Solution, la Reverse Transcriptase e l'RNase Inhibitor insieme in base al numero di campioni in un recipiente di reazione adatto. Osservare il rapporto di cui alla Tabella 5.
- Miscelare il Mastermix (MM) agitando o pipettando su e giù più volte e centrifugare. Conservare il Mastermix (MM) nel blocco di raffreddamento.
- Pipettare rispettivamente 9 µl del Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA per campione di paziente e pipettare il controllo in una striscia PCR a 8 pozzetti (vedi la Tabella 6).
- Aggiungere rispettivamente 6 µl di campione o controllo.

Tabella 5: Schema di pipettaggio per la produzione di un Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA  
Rxn = reazioni.

| <b>Reagenti</b>                       | <b>Mastermix (MM)</b> | <b>Lotto unico</b> | <b>MM (2 campioni)</b>                          |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------------------------|
|                                       |                       | <b>1 Rxn [µl]</b>  | <b>3 Rxn (incl. NC e 10% di eccedenza) [µl]</b> |
| <b>cDNA Solution (nero)</b>           |                       | 7,81               | 25,77                                           |
| <b>Reverse Transcriptase (giallo)</b> |                       | 1,00               | 3,3                                             |
| <b>RNase Inhibitor (trasparente)</b>  |                       | 0,19               | 0,63                                            |
| <b>Volume totale</b>                  |                       | <b>9,00</b>        | <b>29,7</b>                                     |

Tabella 6: Distribuzione del Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA e successiva aggiunta dei campioni alle provette di reazione PCR (8 strisce). Illustrazione dell'implementazione del per due campioni e un controllo negativo (NC).



- Miscelare i lotti di sintesi del cDNA agitando o pipettando su e giù più volte e centrifugare.
- Incubare i lotti di di sintesi del cDNA per almeno 5 minuti in frigo o sul ghiaccio a +4°C.
- Eseguire la sintesi del cDNA in conformità alla Tabella 7. Prestare attenzione all'attivazione del coperchio riscaldante.
- Il cDNA ottenuto può essere conservato in frigorifero (+4 a +8 °C) per una notte. Per una conservazione più lunga, congelare a -20°C.

Tabella 7: Parametri del programma di sintesi del cDNA per uno strumento PCR standard.

| Temperatura obiettivo [°C] | Durata [hh:mm:ss] | Segmento                 |
|----------------------------|-------------------|--------------------------|
| 16                         | 00:30:00          | Annealing                |
| 42                         | 00:30:00          | Trascrizione inversa     |
| 85                         | 00:05:00          | Inattivazione enzimatica |
| Da 4 a 10                  | ∞                 | Raffreddamento           |

### 9.3. Esecuzione della preamplificazione

- Scongelare la PreAmp Solution (verde) a temperatura ambiente o in frigorifero, miscelare poi per circa 3 secondi agitando su vortex, centrifugare e conservare nel blocco di raffreddamento.

Eeguire i passaggi successivi sotto un banco PCR pulito.

- Presentare **tre** lotti di 16 µl PreAmp Solution in strisce PCR a 8 pozzetti e aggiungere rispettivamente 4 µl del nuovo cDNA sintetizzato (vedi Tabella 8).
- Per il controllo negativo sono sufficienti **solo** 16 µl di PreAmp Solution e 4 µl di lotto di cDNA.
- Miscelare i lotti di preamplificazione agitando o pipettando su e giù più volte e centrifugare.
- Eseguire la preamplificazione in base alla Tabella 9. Prestare attenzione all'attivazione del coperchio riscaldante.
- I preamplificati già pronti possono essere conservati in frigorifero (+4 a +8 °C) per tutta la notte. Per una conservazione più lunga, congelare a -20°C.

Tabella 8: Rappresentazione dell'esecuzione di una preamplificazione per due campioni e un controllo negativo (NC).

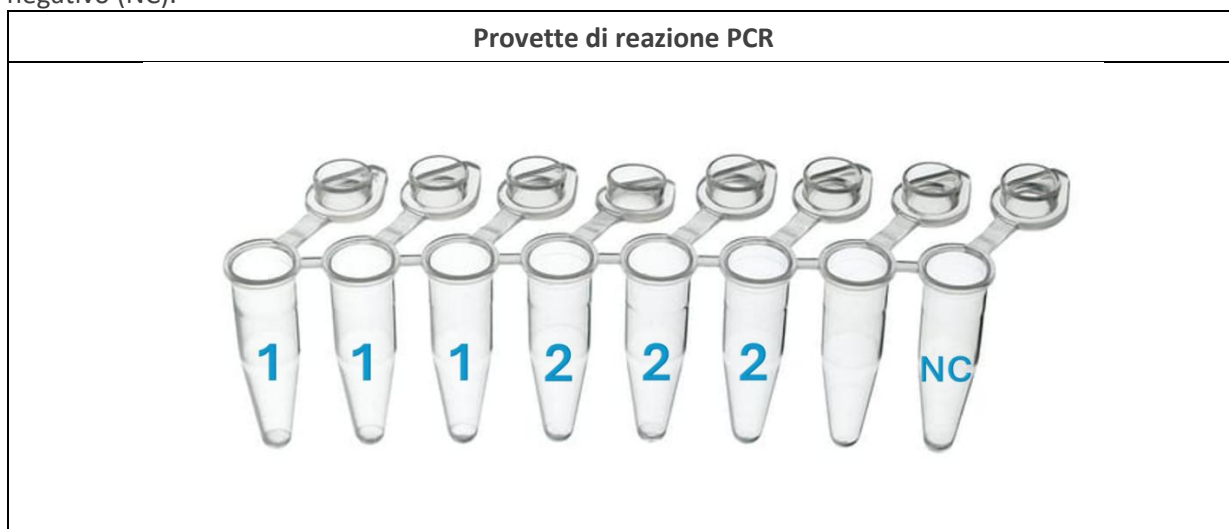


Tabella 9: Parametri del programma di preamplificazione per uno strumento PCR standard.

| Cicli | Temperatura obiettivo [°C] | Durata [hh:mm:ss] | Segmento               |
|-------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| 1     | 95                         | 00:01:00          | Attivazione enzimatica |
| 15    | 95                         | 00:00:15          | Denaturazione          |
|       | 60                         | 00:04:00          | Annealing + Elongation |
| 1     | Da 4 a 10                  | ∞                 | Raffreddamento         |

**Nota:** è importante assicurarsi che sia programmato il numero corretto di cicli, poiché l'input del ciclo può variare in diversi sistemi di PCR-Cycler (numero totale di cicli o numero di ripetizioni del ciclo).

## 9.4. Preparazione dei campioni preamplificati

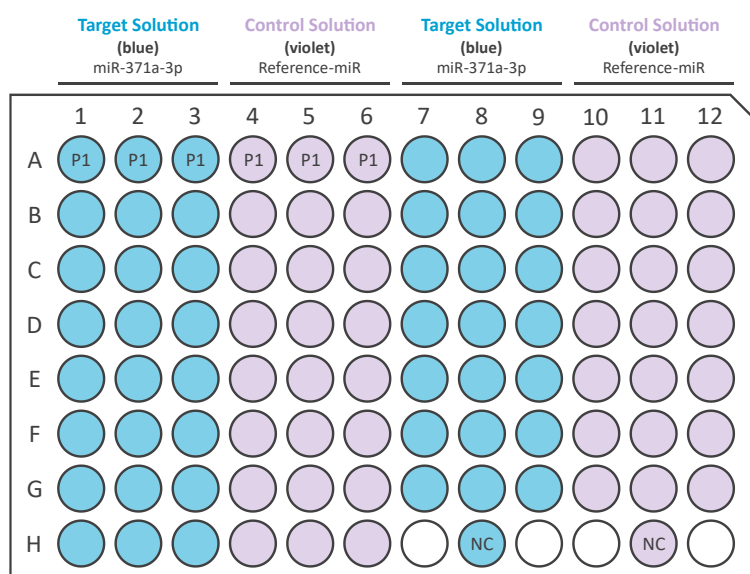
- Scongelare Target Solution (blu) e Control Solution (violetto) in luogo protetto dalla luce in frigorifero o brevemente a temperatura ambiente, comunque in luogo protetto dalla luce. Scongelare la PCR grade water (bianco) a temperatura ambiente. Conservare i reagenti nel blocco di raffreddamento.
- Se necessario, scongelare brevemente i preamplificati a temperatura ambiente o in frigorifero, centrifugare e conservare nel blocco di raffreddamento fino all'uso successivo.

Eeguire i passaggi successivi sotto un banco di lavoro PCR pulito.

- Per ogni campione del paziente, posizionare 60 µl di PCR-grade water (bianco) in una nuova provetta di reazione.
- Aggiungere tutti e tre i lotti di ogni campione al PCR-grade water (preamplificatore 3 × 20 µl = 60 µl + 60 µl PCR-grade water).
- Per il campione negativo o positivo, posizionare 20 µl PCR-grade water in una provetta di reazione e aggiungere il rispettivo preamplificato.

## 9.5. Posizionamento della piastra qPCR

- Miscelare Target Solution (blu) e Control Solution (violetto) agitando su vortex per circa 3 secondi, centrifugare e conservare nel blocco di raffreddamento.
- Per ogni campione del paziente occorrono sei pozzetti (tre per la Target Solution, tre per la Control Solution). Due pozzetti per ogni controllo negativo (vedi III 1).
- Pipettare 15 µl di Target Solution o Control Solution nelle rispettive posizioni della piastra qPCR.
- Prima dell'uso, mescolare i preamplificatori diluiti agitando su vortex per circa 3 secondi, centrifugare e conservare nel blocco di raffreddamento
- Pipettare 5 µl dei preamplificati diluiti nelle rispettive posizioni della piastra qPCR.
- Sigillare la piastra qPCR con un film coprioggetto ottico e lisciare con un applicatore per film per evitare la formazione di bolle.
- Centrifugare la piastra PCR utilizzando una centrifuga per piastre (almeno 2 minuti (in totale) a 500 g).



III 1: Posizionamento raccomandato della piastra qPCR per la misurazione di un campione (P1) e di un controllo negativo (NC).

## 9.6. Caricamento della piastra qPCR

In merito alla programmazione del Real-Time PCR-Cycler, osservare le informazioni del produttore.

- Creare un programma qPCR nel software qPCR Cycler secondo la Tabella 10.
- È possibile mantenere le velocità massime di riscaldamento e raffreddamento specifiche del dispositivo (Tabella 11).
- La qPCR deve essere impostata come quantificazione relativa. Oltre al miR-371a-3p bersaglio, il miRNA di riferimento funge da controllo endogeno per la normalizzazione.
- È necessario regolare le seguenti impostazioni generali:  
volume di reazione: 20 µl  
canale di rilevamento: FAM
- Aprire lo sportello di carico del qPCR-Instrument e disporre la piastra qPCR nel telaio. Accertarsi che la piastra si adatti perfettamente al telaio. Chiudere lo sportello di carico.
- Avviare la corsa qPCR e inserire un nome che possa essere chiaramente identificato.
- Alla fine dell'analisi, rimuovere la piastra qPCR dal qPCR-Instrument e smaltirla senza rimuovere la pellicola di protezione.

**Particolarità di LightCycler® 480II e cobas® z 480 (Roche):** negli schemi di posizionamento delle piastre, i campioni nelle misurazioni parallele di miR-371a-3p e miR di riferimento devono essere definiti come triplicati l'uno dell'altro.

- I tre lotti per ciascun campione del paziente e ogni miRNA devono essere contrassegnati come repliche alla voce "Sample Editor". Per fare ciò, selezionare tre posizioni ciascuno e cliccare sul pulsante "Make Replicates"
- Es.: A1-A3 = una replica, A4-A6 = una replica (vedi III 1)

Tabella 10: Profilo di temperatura di qPCR.

| Numero di cicli | Fase                   | Temperatura [°C] | Durata [mm:ss] | Rilevamento                                            |
|-----------------|------------------------|------------------|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1               | Attivazione Polymerase | 95               | 10:00          |                                                        |
| 40              | Denaturazione          | 95               | 00:15          |                                                        |
|                 | Annealing/Elongation   | 60               | 01:00          | Misurazione della fluorescenza alla fine di ogni ciclo |
| 1               | Raffreddamento         | 37               | 01:00          |                                                        |

Tabella 11: Velocità massime di riscaldamento e raffreddamento specifiche del dispositivo di qPCR-Cycler convalidati

| qPCR-Cycler         | Velocità massime di riscaldamento e raffreddamento [°C/s] |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|
| LightCycler® 480 II | 4,4 (riscaldamento), 2,2 (raffreddamento)                 |
| LightCycler® PRO    | 4,4 (riscaldamento), 2,2 (raffreddamento)                 |
| cobas® z 480        | 4,4 (riscaldamento), 2,2 (raffreddamento)                 |
| QuantStudio™ 5      | 3,28 (riscaldamento), 2,52 (raffreddamento)               |
| QuantStudio™ 5 Dx   | 3,28 (riscaldamento), 2,52 (raffreddamento)               |
| AriaDx              | 6,0                                                       |
| CFX96™              | 4,4 (riscaldamento), 2,2 (raffreddamento)                 |

## 10. Analisi dei risultati

**Nota:** Cp (= Crossing point) e Ct (= Cycle threshold) sono identici e intercambiabili. In queste istruzioni per l'uso viene utilizzato il termine Ct.

Al termine della qPCR, prima di procedere all'analisi dei valori Ct, è opportuno verificare che le curve di amplificazione presentino il tipico andamento sigmoidale.

### 10.1. File di valutazione dell'M371-Test e importazione dei dati

Il file di valutazione dell'M371-Test è un software accessorio opzionale e viene trasmesso su richiesta, tramite un modulo di contatto sul nostro sito web (<https://www.mirdetect.de/Service/>) in modalità elettronica **via e-mail**. Il file con denominazione "M371-Test Evaluation File" è disponibile solo in lingua inglese. Per una valutazione affidabile e sicura, bisognerebbe sempre utilizzare la versione attuale del file di valutazione dell'M371-Test. Se è disponibile una nuova versione, i clienti che hanno già ricevuto il file di valutazione vengono informati via e-mail. Per garantire un uso sicuro, il file di valutazione dell'M371-Test contiene aree bloccate **che non possono e non devono essere modificate**. Le celle descrivibili sono evidenziate in verde chiaro, come il nome dei campioni e l'area per l'inserimento dei dati della qPCR. Dopo aver inserito i dati dell'analisi qPCR nel file di valutazione dell'M371-Test, viene calcolata automaticamente la frequenza relativa (RQ) del miR-371a-3p e visualizzato il risultato del test.

## 10.2. Analisi dei risultati

### Impostazioni dell'analisi:

Tabella 12: Impostazioni dell'analisi specifiche del dispositivo

| qPCR-Cycler         | Valore soglia                 | Linea di base                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LightCycler® 480 II | Abs Quant/2nd Derivative Max  | I cicli di inizio e fine dovrebbero essere scelti in modo tale che il rumore iniziale nel segnale non venga preso in considerazione e che la linea di base termini prima che venga rilevata una fluorescenza significativa. |
| LightCycler® PRO    | Baseline Subtracted           |                                                                                                                                                                                                                             |
| cobas® z 480        | Abs Quant/2nd Derivative Max  |                                                                                                                                                                                                                             |
| QuantStudio™ 5      | Auto threshold                |                                                                                                                                                                                                                             |
| QuantStudio™ 5 Dx   | Auto threshold                |                                                                                                                                                                                                                             |
| Aria Dx             | Auto threshold                |                                                                                                                                                                                                                             |
| CFX96™              | Baseline Subtracted Curve Fit |                                                                                                                                                                                                                             |

L'analisi dei risultati con il file di valutazione del M371-Test opzionale è descritta di seguito. La procedura qui descritta si riferisce a Roche Diagnostics LightCycler® 480 II qPCR Instrument con blocco riscaldante a 96 pozzetti e versione software 1.5.x. Quando si utilizzano altri qPCR-Cycler convalidati, assicurarsi che i valori Ct mediani siano trasferiti correttamente alla maschera di input del file di valutazione del M371-Test. Le impostazioni di analisi specifiche del dispositivo dei sistemi qPCR-Cycler convalidati vanno visualizzati nella Tabella 12.

- Nel software LightCycler® 480, selezionare l'esperimento precedente e cliccare sulla scheda "Analisi".
- Selezionare "Abs Quant/2nd Derivative Max" per tutti i campioni e cliccare su "OK".
- Selezionare "Median" invece di "Mean" nel menu a tendina sul lato in basso a destra e calcolare premendo "Calculate" sul lato in basso a sinistra.
- I valori Ct mediani del miR-371a-3p e del miR di riferimento vengono calcolati automaticamente per ciascun campione e visualizzati nella tabella dei risultati "Replicate Statistics" in basso a sinistra.
- Tutti i risultati dalla tabella "Replicate Statistics" devono essere trasferiti al file di valutazione dell'M371-Test. Per farlo, cliccare sul campo "Replicate Statistics", evidenziare tutti i dati con Ctrl+A e copiare poi i dati con Ctrl+C.
- Passare al file di valutazione M371-Test e seguire le istruzioni sulla trasmissione dei dati ivi riportate.
- I risultati del controllo negativo per il miR-371a-3p e la misurazione del miR di riferimento devono essere immessi manualmente nel file di valutazione. Tenendo il cursore del mouse sulla relativa posizione del pozzetto nel LightCycler® Software, viene visualizzato il valore Ct misurato.
- Il file di valutazione contiene colonne di risultati separate per la diagnostica primaria e l'assistenza post-terapia. A causa dei diversi valori di soglia, i risultati in queste colonne potrebbero differire. **Assicurati di leggere il risultato dalla colonna corrispondente al rispettivo scenario.**

### 10.2.1. Controllo negativo

Un controllo negativo (NC, PCR-grade water) deve essere utilizzato in ogni analisi qPCR, sia per il miR-371a-3p che per la misurazione del miR di riferimento, per confermare l'esecuzione positiva del test.

Un'analisi qPCR è **VALIDA** se il controllo negativo per il miR-371a-3p e quello per la misurazione del miR di riferimento sono **NEGATIVI**. Il controllo negativo è negativo se il valore Ct per entrambi i miRNA misurati è almeno 10 cicli dopo il valore più alto del miRNA corrispondente in un campione o ha un valore di 35 o più.

Un'analisi qPCR è **INVALIDA** se il controllo negativo è **POSITIVO**. Il controllo negativo per il miR-371a-3p e la misurazione del miR di riferimento è positivo se il valore Ct per il miRNA specifico misurato è inferiore a 10 cicli dopo il valore più alto di un campione.

Se i controlli negativi sono **POSITIVI**, i campioni elaborati con i controlli **non** possono essere valutati. L'M371-Test deve essere ripetuto per tutti i campioni in un caso simile.

Il file di valutazione dell'M371-Test indica se tutti i controlli sono stati superati (file di valutazione dell'M371-Test ➔ Controls: NC miR-371a e NC miR di riferimento).

### 10.2.2. miR di riferimento

Il miR di riferimento fornisce informazioni sulla presenza di una quantità sufficiente di miRNA nel rispettivo lotto per ciascun campione. Il risultato del miR-371a-3p qPCR dipende da quello del miR di riferimento.

L'intervallo normale per il valore Ct del miR di riferimento è tra 12 e 22 con il LightCycler® 480 II Instrument. In tal caso è presente una quantità sufficiente di miRNA e i risultati sono validi.

Se il valore Ct del miR di riferimento presenta un campione superiore a 22, questo indica livelli iniziali molto bassi dopo l'estrazione dell'RNA e può compromettere una diagnosi chiara.

Se il valore Ct del miR di riferimento di un campione è inferiore a 12, potrebbe essersi verificata un'emolisi del campione e non è possibile fare una dichiarazione chiara sullo stato del tumore sulla base di questo campione.

**I campioni dei pazienti il cui valore Ct del miR di riferimento sia inferiore a 12 o superiore a 22 devono essere nuovamente prelevati ed elaborati con l'M371-Test.**

### 10.2.3. Valutazione dei campioni

La valutazione dei risultati del test in base allo scenario clinico è descritta nel capitolo "2. Basi tecnologiche della procedura di prova".

## 11. Guida alla risoluzione dei problemi (Troubleshooting Guide)

- Se per un'analisi qPCR non viene superato un controllo negativo, l'intera analisi va ripetuta (campioni, incluso controllo negativo per il miR-371a-3p e la misurazione del miR di riferimento).
- Segnali indesiderati nei controlli negativi potrebbero essere dovuti a un cappuccio riscaldante inattivo durante la sintesi o la preamplificazione del cDNA. Si verificano spostamenti indesiderati della concentrazione a causa della condensa sui coperchi dei recipienti di reazione. Per evitare ciò si dovrebbe programmare una temperatura del coperchio riscaldato di 105 °C.
- Se il valore Ct del miR di riferimento per un campione è superiore a 22, il campione va nuovamente prelevato ed elaborato con l'M371-Test, poiché la quantità di materiale di partenza non era sufficiente.
- Se il valore Ct del miR di riferimento per un campione è inferiore a 12, il campione deve essere nuovamente prelevato ed elaborato con l'M371-Test, poiché il campione originale era probabilmente emolitico.
- Se l'RQ di un campione della **diagnosi primaria** è compreso tra 5 e 10 (intervallo indeterminato), prelevare nuovamente il sangue dal paziente dopo alcune settimane e ripetere la misurazione.
- Se le curve di amplificazione non corrispondono al tipico percorso sigmoideo, per la successiva analisi, la piastra qPCR deve essere centrifugata ancora un po'.
- Software LightCycler® 480 II: se manca la tabella "Replicate Stats", verificare se le repliche di un campione del paziente siano associate tra loro come repliche.

## 12. Limiti della procedura

- Il test è adatto solo alla diagnostica in-vitro.
- Il test è progettato esclusivamente per il rilevamento dei tumori a cellule germinali del testicolo di tipo II (neoplasia a cellule germinali derivata in situ GCTs).
- Il test non ha evidenziato alcuna funzione prognostica (previsione di recidive dopo l'intervento), ma può essere utilizzato per il monitoraggio di follow-up dei pazienti con tumore testicolare.
- Vi sono indicazioni secondo cui, nonostante il breve tempo di dimezzamento, la normalizzazione dei livelli di miR-371a-3p al di sotto del valore soglia dopo un'orchietomia richiede un periodo di tempo piuttosto lungo. Anche in assenza di tumore, i risultati dei test postoperatori possono risultare positivi se l'intervallo di tempo tra l'intervento chirurgico e il prelievo del campione non è stato sufficientemente lungo. In questo caso, si raccomanda di ripetere l'M371-Test in un secondo momento. La cinetica della normalizzazione postoperatoria è oggetto di uno studio attualmente in corso.
- Sono stati convalidati solo i qPCR-Cycler menzionati nel capitolo "5.1. Attrezzatura generale di laboratorio".
- Il test è stato sviluppato per l'analisi del miR-371a-3p nel siero o nel plasma. Per i campioni di siero si raccomanda l'uso del S-Monovette® Serum-Gel CAT da 7,5 ml (cod. art. 01.1602.001) o da 9 ml (cod. art. 02.1388.001) di Sarstedt AG & Co. KG. Per il plasma è omologato esclusivamente l'S-Monovette® cfDNA Exact da 9,2 ml (cod. art. 01.2040.001) di Sarstedt AG & Co. KG.
- È necessario osservare le istruzioni sul campionamento e sull'elaborazione dei campioni nel capitolo "8. Raccolta ed elaborazione di campioni".
- Questo prodotto può essere utilizzato solo da persone con esperienza nell'esecuzione di test PCR.
- Il risultato del test non può essere utilizzato per la sola diagnosi primaria di un tumore a cellule germinali testicolari o per rilevare una recidiva. Ogni M371-Test positivo dovrebbe essere confermato da una procedura adeguata della diagnostica clinica.
- Il risultato dell'M371-Test va valutato nel contesto di altri parametri clinici.
- I teratomi puri non mostrano quasi alcun aumento dell'espressione del marcatore tumorale miR-371a-3p, motivo per cui questa entità tumorale non può essere rilevata (Dieckmann et al., 2017; 2019).
- Il miR di riferimento è espresso a livelli aumentati nel tessuto cerebrale dei pazienti con Alzheimer (Song et al., 2019). Al momento non è noto se ciò valga anche per la concentrazione del miR di riferimento nel siero o nel plasma di questi pazienti. In tal caso, potrebbero verificarsi risultati di test falsi negativi.
- L'aumento dell'emolisi porta a un aumento del rilascio di miR di riferimento rilevato nel test. Ne deriva una significativa riduzione dei valori Ct del miR di riferimento, che può portare a valori RQ falsificati e, nel peggiore dei casi, ad un risultato del test falso negativo (Myklebust et al., 2019).
- Non si può escludere che l'espressione di miR-371a-3p sia aumentata nei pazienti Covid-19 (Goebel et al., 2022).
- Nel siero dei pazienti affetti da mieloma multiplo si riscontrano valori di miR-371a-3p in alcuni casi notevolmente elevati (Belge et al., 2025).

## 13. Dati specifici sulle prestazioni

### 13.1. Prestazioni analitiche

#### 13.1.1. Sensibilità analitica

La più piccola differenza misurabile nei valori RQ e Ct è stata misurata utilizzando tre livelli di diluizione di campioni mimic-miRNA costituiti da miR-371a-3p e miR di riferimento. Ogni diluizione è stata misurata in 10 repliche con un lotto del kit. Ciò ha comportato che la più piccola differenza misurabile fosse di 0,52 pmol/L.

#### 13.1.2. Specificità analitica

Tre diversi campioni di simulazione del paziente (alta, media, nessuna espressione di miR-371a-3p) sono stati misurati puri, con alta o bassa contaminazione (DNA, contaminazione proteica). Per tutte le misurazioni è stato utilizzato lo stesso lotto del kit M371-Test. I risultati sono stati analizzati mediante un'analisi di regressione.

Il valore Ct di miR-371a-3p è aumentato nei campioni altamente espressivi a causa della contaminazione. Questo può portare ad una RQ più bassa ( $p=0,005$ ,  $R^2=0,698$ ).

Nel caso di campioni moderatamente espressi, la contaminazione da DNA/proteine ha portato a valori Ct di miR-371a-3p, miR di riferimento e valori RQ ( $p=0,001$ ,  $R^2=0,798$ ;  $p=0,004$ ,  $R^2=0,711$ ;  $p=0,001$ ,  $R^2=0,812$ ) significativamente più alti.

In considerazione dei risultati, occorre prestare particolare attenzione ad una corretta estrazione di miRNA in base al protocollo del produttore, al fine di evitare possibili contaminazioni dei campioni di pazienti.

#### 13.1.3. Limite di rilevabilità e quantificazione (LoD, LoQ)

Il limite di rilevabilità e quantificazione (Limit of Detection (LoD) & Limit of Quantification (LoQ)) del M371-Test è stato determinato in una serie di diluizione del miR-371a-3p con sei livelli di diluizione e del miR di riferimento in concentrazione costante con sei replicati ciascuno. Tutte le misurazioni sono state eseguite con un lotto del kit M371-Test.

Il limite di rilevabilità (LoD) è stato definito in precedenza in modo tale che fossero rilevabili almeno 5/6 diluizioni. Questo è stato il caso dell'esperimento fino ad una concentrazione di 7,575 fM. Il coefficiente di variazione era del 77,33 %.

Il limite di quantificazione (LoQ) è stato definito preliminarmente, in modo tale che il coefficiente di variazione non superi il 50%. Questo è stato il caso fino ad una concentrazione di 30,3 fM. Per questa concentrazione, il coefficiente di variazione è del 44,07 %. La RQ media al LoD è di 1,05; la RQ media al LoQ è di 8,71. Ciò vuol dire che il LoQ è appena superiore al valore limite della RQ = 5. Dato che i valori inferiori a 8,71 non possono essere quantificati con precisione, il valore limite per la diagnosi primaria è stato esteso ad un intervallo limite che include i valori RQ da 5 a 10. I valori all'interno di questo settore non possono essere misurati con precisione e sono da considerarsi indeterminati (INDETERMINATI).

#### 13.1.4. Linearità

Per la misurazione della linearità è stato diluito un campione mimic-miRNA in una concentrazione di 500 pM per sei volte 1:10. Ogni diluizione è stata misurata tre volte in giorni diversi, indipendentemente dall'operatore, con un lotto del kit M371-Test. Ne è derivata un'efficienza media del PCR pari al 90%; il coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) era 0,993-0,997. Tenendo conto dei valori Ct miR-371a-3p, le concentrazioni da 5 fM a 500 fM erano nell'intervallo lineare. Nel caso di una concentrazione di 0,5 fM, il miR-371a-3p non era rilevabile.

### 13.2. Precisione

#### 13.2.1. Precisione di ripetibilità

La riproducibilità dei risultati del test è stata determinata testando ripetutamente i campioni a quattro diverse concentrazioni (alta, media, bassa e nessuna espressione di miR-371a-3p). Ciascun campione è stato elaborato in 30 repliche con un lotto del kit dell'M371-Test da un operatore. Il coefficiente di variazione per campioni con espressione elevata e media è di circa il 14%. Per i campioni a bassa espressione, il coefficiente di variazione è fino all'85%, motivo per cui nella valutazione deve essere rispettato il limite di quantificazione. I campioni che rappresentano pazienti liberi da tumore possono avere un coefficiente di variazione del 127%. Questo è stato osservato fino ad una concentrazione di 5 fM. Poiché questa concentrazione è inferiore al limite di rilevamento (7,575 fM), un coefficiente di variazione più elevato non costituisce un problema.

#### 13.2.2. Precisione di confronto

Per la precisione di confronto sono stati esaminati i seguenti parametri:

- Operatori differenti
- Materiali di consumo differenti (piastre qPCR)
- Laboratori differenti (strumenti PCR Cyclor e qPCR Cyclor differenti (LightCycler 480II))

Per ogni operatore sono state misurate differenti concentrazioni di campioni in due repliche (alta, media, bassa e nessuna espressione di miR-371a-3p). Per tipo di piastra sono state misurate quattro concentrazioni (alta, media, bassa e nessuna espressione di miR-371a-3p), rispettivamente con 4 repliche. Per tipo di laboratorio sono state misurate quattro concentrazioni (alta, media, bassa e nessuna espressione di miR-371a-3p), rispettivamente con 4 repliche.

Operatori e materiali di consumo come le piastre qPCR non hanno avuto alcun influsso significativo sulla RQ dei campioni esaminati ( $p=0,09-0,33$ , Kruskal Wallis o  $p=0,25-0,81$ , Mann-Whitney U). Nel confronto di due laboratori si è evinta una differenza significativa nell'intervallo superiore della RQ ( $p=0,014$ , Mann-Whitney U nell'intervallo RQ 200-2000). Questa non ha tuttavia influito sull'area del limite di decisione clinica ( $RQ=10$ ) ed è compresa tra il 21 e il 22% per il coefficiente di variazione.

### 13.3. Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche dell'M371-Test sono state anche dimostrate in uno studio multicentrico in 37 cliniche provenienti da Germania, Austria, Svizzera, Ungheria e Italia (Dieckmann et al., 2019). Per lo studio, i campioni di siero di 616 pazienti con tumori a cellule germinali e 258 pazienti di controllo sono stati misurati utilizzando l'M371-test. Per determinare la prestazione clinica per la diagnostica primaria, i campioni di 522 pazienti affetti da tumore, inclusi 323 seminomi e 199 non seminomi, sono stati confrontati con campioni di 258 pazienti di controllo.

Nella diagnosi primaria dei tumori a cellule germinali, il M371-Test aveva una sensibilità del 91,8% e una specificità del 96,1%. L'AUC (area sotto la curva ROC) era 0,970 e il valore predittivo positivo era 97,2% (Tabella 13).

Tabella 13: Caratteristiche delle prestazioni cliniche dell'M371-Test (da Dieckmann et al. 2019).

| Gruppo                                         | AUC                      | Sensibilità           | Specificità           | PPW*                  | NPW*                   | LR+                       | LR-                    |
|------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| TGCT (n=522) vs. controlli (n=258)             | 0.970<br>(0.958 – 0.981) | 91.8<br>(89.1 – 94.0) | 96.1<br>(93.0 – 98.1) | 97.2<br>(92.9 – 99.2) | 82.7<br>(74.0 – 89.45) | 23.675<br>(12.89 – 43.49) | 0.086<br>(0.06 – 0.11) |
| Seminomi (n=323) vs. controlli (n=258)         | 0.964<br>(0.949 – 0.979) | 89.8<br>(85.9 – 92.8) | 96.1<br>(93.0 – 98.1) | -                     | -                      | -                         | -                      |
| Non seminomi (n = 199) vs. controlli (n = 258) | 0.978<br>(0.962 – 0.994) | 95.0<br>(91.0 – 97.6) | 96.1<br>(93.0 – 98.1) | -                     | -                      | -                         | -                      |
| CS I (n = 371) vs. controlli (n = 258)         | 0.958<br>(0.942 – 0.974) | 88.9<br>(85.3 – 92.0) | 96.1<br>(93.0 – 98.1) | -                     | -                      | -                         | -                      |
| CS II/III (n = 151) vs. controlli (n = 258)    | 0.998<br>(0.995 – 1.0)   | 98.7<br>(95.3 – 99.8) | 96.1<br>(93.0 – 98.1) | -                     | -                      | -                         | -                      |
| Recidive (n = 46) vs. controlli (n = 258)      | 0.921<br>(0.862 – 0.981) | 82.6<br>(68.6 – 92.2) | 96.1<br>(93.0 – 98.1) | -                     | -                      | -                         | -                      |

\*Le caratteristiche delle prestazioni cliniche per PPW e NPW si basano su n=155 KZT e n=90 controlli. AUC: area sotto la curva, CS: stadio clinico, KZT: tumore a cellule germinali, LR+: rapporto di verosimiglianza positivo, LR-: rapporto di verosimiglianza negativo, PPW: valore predittivo positivo, NPW: valore predittivo negativo. Valori tra parentesi = intervallo di confidenza al 95%.

È stato possibile determinare correttamente le recidive di pazienti TGCT in 10 casi su 10 o 4 su 4 mediante l'aumento dell'espressione di miR-371a-3p (Dieckmann et al., 2017; van Agthoven et al., 2017). Un altro gruppo ha mostrato un aumento dell'espressione di miR-371a-3p durante la ricaduta in campioni di 10 pazienti TGCT (Terbuch et al., 2018).

Dieckmann et al. hanno mostrato una sensibilità dell'83% in n = 46 recidive TGCT con una normalizzazione dei valori sierici di miR-371a-3p dopo una terapia di recidiva di successo (Dieckmann et al., 2019). Un aumento di miR-371a-3p nella recidiva è stato riportato anche da Rosas Plaza et al. (Rosas Plaza et al., 2019).

In una serie di n = 151 pazienti TGCT clinici allo stadio 1, Lobo e colleghi hanno trovato n = 34 casi di recidiva. Di questi, sono stati in grado di rilevare n = 32 (94%) con la misurazione miR-371a-3p, mentre il gold standard classico (AFP e  $\beta$ HCG) era elevato solo nel 38% dei casi (Lobo et al., 2020).

L'affidabilità con cui l'espressione di miR-371a-3p rileva le recidive è stata ulteriormente confermata da Fankhauser et al. In uno studio con 30 pazienti è stata riscontrata una maggiore espressione miR-371a-3p in 10 pazienti su 10 con recidive, mentre miR-371a-3p era aumentata in un solo paziente senza recidiva (Fankhauser et al., 2022). Questo aumento si era già normalizzato alla misurazione successiva,

il che indica che l’aumento di miR-371a-3p dovrebbe essere monitorato anche dopo l’aumento dell’espressione. È stato possibile misurare le recidive in media 2 mesi prima rispetto ai metodi convenzionali, ma in un paziente anche più di 5 mesi prima (Fankhauser et al., 2022).

Lo studio attualmente più ampio sulle prestazioni dell’M371-Test nel follow-up di pazienti con tumori a cellule germinali testicolari in stadio clinico I ha incluso 258 pazienti e li ha osservati per un periodo mediano di 18 mesi. Il test è risultato positivo in tutti i 39 pazienti che hanno sviluppato una recidiva durante questo periodo. Le recidive sono state rilevate con una sensibilità del 100%, mentre è stata raggiunta una specificità del 96,3% (Belge et al., 2024). Va notato che in questo studio di follow-up è stata utilizzata un’espressione relativa di RQ = 15 come limite per rilevare le recidive, che è diversa da quello utilizzato nella diagnosi primaria (RQ = 5, Dieckmann et al ., 2019) (vedi anche “2. Basi tecnologiche della procedura di prova”). Sebbene i classici marcatori sierici  $\beta$ -hCG e AFP fossero in grado di rilevare recidive con una specificità del 91,8%, hanno raggiunto una sensibilità di solo il 45,2%. Ulteriori dettagli sulla sensibilità, specificità e valori predittivi positivi e negativi dell’M371-Test rispetto ai classici marcatori sierici nel follow-up di pazienti con tumori a cellule germinali in stadio clinico I sono riassunti nella Tabella 14.

Tabella 14. Caratteristiche di prestazione clinica dell’M371-Test nel follow-up di pazienti CS I KCT rispetto ai classici marcatori sierici (da Belge et al., 2024).

| Marcato<br>re         | Recidive clinicamente<br>confermate |    |    |                          | Casi esenti da recidiva |     |    |                        | PPW [%]                | NPW [%]                  |
|-----------------------|-------------------------------------|----|----|--------------------------|-------------------------|-----|----|------------------------|------------------------|--------------------------|
|                       | n                                   | WP | FN | Sensibilità<br>[%]       | n                       | WN  | FP | Specificità<br>[%]     |                        |                          |
| M371,<br>tutti KZT    | 39                                  | 39 | 0  | 100,0<br>(100,0 – 100,0) | 219                     | 211 | 8  | 96,3<br>(93,9 – 98,8)  | 83,0<br>(72,2 – 93,7)  | 100,0<br>(100,0 – 100,0) |
| M371,<br>S            | 17                                  | 17 | 0  | 100,0<br>(100,0 – 100,0) | 172                     | 166 | 6  | 96,5<br>(93,8 – 99,3)  | 73,9<br>(56,9 – 91,8)  | 100,0<br>(100,0 – 100,0) |
| M371,<br>NS           | 22                                  | 22 | 0  | 100,0<br>(100,0 – 100,0) | 47                      | 45  | 2  | 95,7<br>(92,9 – 100,0) | 91,7<br>(80,7 – 100,0) | 100,0<br>(100,0 – 100,0) |
| $\beta$ -hCG          | 31                                  | 11 | 20 | 35,5<br>(19,2 – 54,6)    | 196                     | 192 | 4  | 98,0<br>(94,9 – 99,4)  | 73,3<br>(51,0 – 95,7)  | 90,6<br>(86,6 – 94,5)    |
| AFP                   | 32                                  | 8  | 24 | 25,0<br>(11,5 – 43,4)    | 196                     | 184 | 12 | 93,9<br>(89,5 – 96,8)  | 40,0<br>(18,5 – 61,5)  | 88,5<br>(84,1 – 92,8)    |
| $\beta$ -hCG /<br>AFP | 31                                  | 14 | 17 | 45,2<br>(27,3 – 64,0)    | 196                     | 180 | 16 | 91,8<br>(87,1 – 95,3)  | 46,7<br>(28,8 – 64,5)  | 91,4<br>(87,4 – 95,3)    |

KZT: tumore delle cellule germinali, S: seminoma, NS: non seminoma,  $\beta$ -hCG/AFP: casi con almeno un marcatore sierico positivo  $\beta$ -hCG e/o AFP, n: numero di casi registrati, WP: vero positivo, FN: falso negativo, WN: vero negativo, FP: falso positivo, NPW: valore predittivo negativo, PPW: valore predittivo positivo. Valori tra parentesi = intervallo di confidenza al 95%.

Utilizzando il plasma come matrice di campione, l’M371-Test raggiunge prestazioni diagnostiche comparabili. Secondo le conoscenze attuali, la sensibilità dell’uso del plasma è pari al 92,5%, con una specificità del 100% (Heidenreich et al., 2026).

## 13.4. Interferenza

### 13.4.1. Emolisi

L'aumento dell'emolisi porta a un aumento del rilascio di miR di riferimento rilevato nel test. Ne deriva una significativa riduzione dei valori Ct del miR di riferimento, che può portare a valori RQ falsificati e, nel peggiore dei casi, ad un risultato del test falso negativo. Venti sieri di pazienti sono stati analizzati per l'emolisi mediante decolorazione e misurazione fotometrica (414 nm). Ogni campione è stato semplicemente misurato con il M371-Test. Il grado di emolisi ha avuto un influsso significativo sulla misurazione del miR di riferimento ( $p=0,002$ ). Un grado di emolisi più elevato comporta un valore Ct del miR di riferimento più basso ( $R^2=0,437-0,743$ ).

### 13.4.2. Altre condizioni mediche

- Nei pazienti con malattia di Alzheimer, sono stati osservati livelli aumentati di miR di riferimento nel tessuto cerebrale (Song et al., 2019). Al momento non è noto se nel siero o nel plasma di questi pazienti siano presenti concentrazioni elevate del miR di riferimento che potrebbero alterare il risultato del test.
- Secondo uno studio, occasionalmente sono stati osservati livelli elevati di miR-371a-3p nel siero di pazienti affetti da COVID-19 (Goebel et al., 2022).
- Nel siero dei pazienti affetti da mieloma multiplo si riscontrano valori di miR-371a-3p in alcuni casi notevolmente elevati (Belge et al., 2025).

### 13.4.3. Reattività incrociata

Le seguenti sostanze sono state testate per l'interferenza con il M371-Test: contaminazione da DNA, proteine, EDTA, citrati, eparina, sequenze miR simili (miR-372-3p).

CLSI Interference Testing in Clinical Chemistry 3a edizione è stato utilizzato per i test di interferenza. Inizialmente, un campione di siero per ogni interferente è stato diviso in due gruppi, uno dei quali è stato arricchito con una concentrazione di interferente tre volte superiore a quella normalmente prevista. L'altro gruppo non è stato integrato con interferenti ed è servito come controllo. Ciascun gruppo è stato misurato in 7 repliche. Se la differenza nel risultato superava un livello predeterminato (50%) tra il gruppo di test e il gruppo di controllo, veniva eseguito un esperimento dose-risposta.

In caso di contaminazione con DNA, proteine ed eparina, è stata dimostrata un'influenza sulla RQ e sul risultato del test, anche con livelli di contaminazione molto bassi.

Sebbene l'isolamento del miRNA raccomandato e metodi simili rimuovano il DNA e le proteine dai campioni di siero, il mancato rispetto del protocollo del produttore può comportare la contaminazione dei campioni dei pazienti con DNA o proteine. Questa contaminazione può portare a risultati falsi. mir|detect GmbH, pertanto, consiglia vivamente di seguire rigorosamente i protocolli del produttore.

Poiché anche piccole quantità di eparina possono influenzare i risultati dei campioni dei pazienti, mir|detect GmbH raccomanda l'uso di S-Monovette® Serum-Gel CAT o di S-Monovette® cfDNA Exact (entrambi prodotti da Sarstedt AG & Co. KG) per il prelievo di sangue e l'estrazione di siero o plasma. Non è possibile escludere che in futuro possano essere rilevate altre interferenze.

### 13.5. Summary of Safety and Performance (Relazione breve sulla sicurezza e le prestazioni)

La relazione breve sulla sicurezza e le prestazioni ("Summary of Safety and Performance") può essere consultata su EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>) o richiesta tramite il modulo di contatto disponibile su [www.mirdetect.de/Service](http://www.mirdetect.de/Service).

## 14. Significato dei simboli

L'uso dei simboli si basa sulla norma DIN EN ISO 15223-1:2021 (Dispositivi medici - Simboli da utilizzare per etichette sui dispositivi medici, marcatura e informazioni da fornire - Parte 1: Requisiti generali (ISO 15223-1:2016, versione corretta 2017-03); versione tedesca EN ISO 15223-1:2016). I simboli e il loro significato sono riportati di seguito (vedi Tabella 15).

Tabella 15: Rappresentazione dei simboli e dei loro significati.

|                                                                                     |                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|    | Marcatura CE + codice dell'organismo notificato (XXXX)                         |
|    | Diagnostica <i>In-Vitro</i>                                                    |
|   | Attenersi alle istruzioni per l'uso elettroniche                               |
|  | Codice articolo                                                                |
|  | Numero di lotto                                                                |
|  | Informazioni UDI                                                               |
|  | Rappresentante autorizzato (XX = _ codice specifico del Paese o della regione) |
|  | Produttore                                                                     |
|  | Distributore                                                                   |
|  | Sufficiente per <n> esami                                                      |
|  | Proteggere dalla luce solare                                                   |
|  | Limitazione della temperatura                                                  |
|  | Utilizzabile fino a                                                            |
|  | Non utilizzare in caso di confezione danneggiata                               |

## 15. Modifiche alle precedenti istruzioni per l'uso

### 15.1. Modifiche alla versione 15

- Sostituzione del simbolo relativo alle istruzioni per l'uso (ISO 7000-1641) con il simbolo relativo alle istruzioni per l'uso in formato elettronico (ISO 7000-3500).
- Aggiunta della possibilità di utilizzare plasma ottenuto con S-Monovette® cfDNA Exact (capitoli 1, 2, 5.2, 6.1, 6.2, 6.4, 8, 12, 13.4.2, 13.4.3).
- Aggiunta del MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit con il KingFisher® Apex Dx (Thermo Fisher Scientific) (per plasma) e del Maxwell® RSC miRNA Plasma and Serum Kit di Promega come metodo supplementare per l'isolamento dell'RNA nei capitoli 5.2 e 8.3.
- Tabella riassuntiva relativa al prelievo e al trattamento dei campioni nel capitolo 8.1.
- Nuovo riferimento a Heidenreich et al., 2026 nel capitolo 13.3.
- Capitolo 17.3 "Distributori": nuovo riferimento all'elenco dei distributori sul sito web di mir|detect GmbH.

## 16. Riferimenti

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

Belge G, Klemke M, Hansen B, Dumlapinar C, Igde A, Arnold D, Salwender H, Wülfing C, Soave A, Dieckmann KP. Biomarker microRNA-371a-3p - expression in malignancies other than germ-cell tumours. J Cancer Res Clin Oncol. 2025; 151: 58. doi: [10.1007/s00432-025-06101-4](https://doi.org/10.1007/s00432-025-06101-4).

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

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

Fankhauser CD, Christiansen AJ, Rothermundt C, Cathomas R, Wettstein MS, Grossmann NC, Grogg JB, Templeton AJ, Hirschi-Blickenstorfer A, Lorch A, Gillessen S, Moch H, Beyer J, Hermanns T. Detection of recurrences using serum miR-371a-3p during active surveillance in men with stage I testicular germ cell tumours. Br J Cancer. 2022; 126: 1140-1144. doi: [10.1038/s41416-021-01643-z](https://doi.org/10.1038/s41416-021-01643-z).

Goebel H, Koeditz B, Huerta M, Kameri E, Nestler T, Kamphausen T, Friemann J, Hamdorf M, Ohrmann T, Koehler P, Cornely OA, Montesinos-Rongen M, Nicol D, Schorle H, Boor P, Quaas A, Pallasch C,

Heidenreich A, von Brandenstein M. COVID-19 Infection Induce miR-371a-3p Upregulation Resulting in Influence on Male Fertility. *Biomedicines*. 2022; 10: 858. doi: [10.3390/biomedicines10040858](https://doi.org/10.3390/biomedicines10040858).

Heidenreich A, Niemzok T, Kämper M, Belge G, Klemke M, Dieckmann KP, Diesend J. Measuring microRNA-371a-3p in testicular germ cell tumors-making the test ready for clinical routine practice. *Discov Oncol*. 2026; 17: 840. doi: [10.1007/s12672-026-05345-x](https://doi.org/10.1007/s12672-026-05345-x).

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

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

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

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

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

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

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

## 17. Informazioni per gli acquirenti

### 17.1. Fabbricante



mir|detect GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven, Germania

Per ulteriori informazioni e per ricevere assistenza, visitare il nostro sito web, inviare una e-mail o contattarci telefonicamente:

Sito web: <https://www.mirdetect.de>

E-mail: [info@mirdetect.de](mailto:info@mirdetect.de)

Telefono: +49 (0) 421 / 40 89 37 11-0

### 17.2. Marchi commerciali

Tutti i simboli, marchi e nomi citati in questo documento sono di proprietà delle rispettive società.

### 17.3. Distributori



Potete trovare i nostri partner di distribuzione sul nostro sito web: <https://www.mirdetect.de>

## 18. Allegato

### 18.1. Modelli per la preparazione del Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA (MM)

Tabella 16: Schema di pipettaggio per la preparazione di un Mastermix (MM) per la sintesi del cDNA per 2, 3, 4 e 5 campioni (incl. il 10% di volume in eccesso) con Rxn = reazioni.

| <b>Mastermix (MM)</b><br><br><b>Reagenti</b> | <b>MM (2 campioni)</b>               | <b>MM (3 campioni)</b>               | <b>MM (4 campioni)</b>               | <b>MM (5 campioni)</b>               |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                                              | 3 Rxn (incl. NC & eccedenza)<br>[μl] | 4 Rxn (incl. NC & eccedenza)<br>[μl] | 5 Rxn (incl. NC & eccedenza)<br>[μl] | 6 Rxn (incl. NC & eccedenza)<br>[μl] |
| <b>cDNA Solution (nero)</b>                  | 25,77                                | 34,36                                | 42,96                                | 51,55                                |
| <b>Reverse Transcriptase (giallo)</b>        | 3,3                                  | 4,4                                  | 5,5                                  | 6,6                                  |
| <b>RNase Inhibitor (trasparente)</b>         | 0,63                                 | 0,84                                 | 1,05                                 | 1,25                                 |
| <b>Volume totale</b>                         | <b>29,7</b>                          | <b>39,6</b>                          | <b>49,5</b>                          | <b>59,4</b>                          |