



# M371-Test

In vitro diagnose – skal kun brukes av fagfolk

**REF** MCS0105

**REF** MCS0115HT

Bruksanvisning

Les denne bruksanvisningen oppmerksomt før testen brukes og følg den nøyaktig for å garantere at testresultatene er pålitelige.



Versjon 12, © mir|detect GmbH, utgave 11.04.2024.



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

## Innhold

1.	Produktets navn og bruksformål .....	4
2.	Teknologisk grunnlag for testprosedyren .....	4
3.	Reagenser inkludert i settet .....	6
3.1.	Komponenter .....	6
3.2.	Reaktive komponenter til M371-Testen .....	7
3.3.	Informasjoner og dokumenter for M371-Test .....	7
3.4.	Alternativt tilbehør for M371-Test .....	7
3.5.	Farestoffer og animalske komponenter for M371-Testsett .....	7
4.	Transport, oppbevaring og stabilitet .....	8
5.	Ytterligere utstyr som er nødvendig .....	9
5.1.	Generelt laboratorieutstyr .....	9
5.2.	Generelle forbruksmaterialer og reagenser .....	9
5.3.	Enhetskrav .....	10
6.	Forsiktighetstiltak .....	10
6.1.	Forsiktighetstiltak på laboratoriet .....	10
6.2.	Forsiktighetstiltak for å beskytte mot infeksjoner .....	10
6.3.	Melding om hendelser i sammenheng med produktet .....	11
6.4.	Avhending av arbeidsmaterialer og reagenser .....	11
7.	Kvalitetskontroll .....	12
8.	Prøveinnsamling og prøvebehandling .....	12
8.1.	Blodprøvetaking og blodlagring .....	12
8.2.	Serumutvinning, -oppbevaring og -transport .....	12
8.3.	Forsiktighetstiltak ved serumutvinning .....	13
8.4.	miRNA-utvinning .....	13
9.	Gjennomføring M371-Test .....	14
9.1.	Generell gjennomføring av testen .....	14
9.2.	Gjennomføring av cDNA-syntese .....	15
9.3.	Gjennomføring av preamplifikasjon .....	17
9.4.	Forberedelse preamplifiserte prøver .....	18
9.5.	Bruk av qPCR-plate .....	18
9.6.	Laste opp qPCR-plate .....	19
10.	Resultatanalyse .....	20
10.1.	M371-Test-evalueringsfil og dataimport .....	20
10.2.	Resultatanalyse .....	21

10.2.1. Negativ kontroll .....	22
10.2.2. Referanse-miR .....	22
10.2.3. Evaluering av prøver .....	22
11. Veiledning for feilsøking (Troubleshooting Guide) .....	23
12. Prosessens grenser .....	24
13. Spesifikke ytelsesdata .....	25
13.1. Analytisk ytelse .....	25
13.1.1. Analytisk sensitivitet .....	25
13.1.2. Analytisk spesifisitet .....	25
13.1.3. Påvisning- og kvantifiseringsgrense .....	25
13.1.4. Linearitet .....	26
13.2. Presisjon .....	26
13.2.1. Gjentakelsespresisjon .....	26
13.2.2. Komparativ presisjon .....	26
13.3. Klinisk ytelsesevne .....	26
13.4. Interferens .....	29
13.4.1. Hemolyse .....	29
13.4.2. Andre medisinske tilstander .....	29
13.4.3. Cross-Reactivity .....	29
13.5. Summary of Safety and Performance (Kort rapport for sikkerhet og ytelse) .....	30
14. Symbolenes betydning .....	30
15. Endringer i forhold til forrige bruksanvisning .....	31
15.1. Endringer i forhold til versjon 10 .....	31
15.2. Endringer i forhold til versjon 11 .....	31
16. Referanser .....	32
17. Informasjoner for kjøper .....	33
17.1. Produsent .....	33
17.2. Trademarks .....	33
17.3. Distributør .....	33
18. Vedlegg .....	34
18.1. Maler for å lage cDNA-syntese-Mastermix (MM) .....	34

## 1. Produktets navn og bruksformål

M371-Testen er en IVDR sertifisert in vitro diagnose (IVD) iht. EU-forordning 2017/746, basert på måling av relativ hyppighet (RQ) av tumormarkør miR-371a-3p. For dette formålet kvantifiseres miR-371a-3p og en endogen kontroll i 200 µl i blodserum ved bruk av qPCR.

M371-Testen er en ikke-automatisk test med en kvalitativ resultatforståelse som påviser testikkelcelletumorer (KCT, type II, engl. Germ Cell Neoplasia in situ derived testicular germ cell tumor (GCNIS-derived TGCT)) og kan brukes til diagnose og oppfølgingskontroller (engelsk "follow-up monitoring") av denne tumoren av fagfolk. Testpopulasjonen omfatter mannlige, voksne pasienter med mistanke om eller bekreftet testikkelcelletumor (type II, GCNIS-avledet TGCT). Testresultatet kan ikke brukes som eneste primærdiagnose av testikkelcelletumor eller for å oppdage residiv. Hver positive M371-Test skal bekreftes gjennom en egnet prosedyre for klinisk diagnostikk.

## 2. Teknologisk grunnlag for testprosedyren

M371-Testsett inneholder alle reagenser som er nødvendige for å gjennomføre blodtest for påvisning av kimcelletumorer i testiklene fra allerede ekstrahert miRNA. For evaluering av prøvene er den alternative M371-Test-evalueringsfilen tilgjengelig.

Påvisningsmetoden er fluorescensbasert påvisning av microRNA (miRNA) miR-371a-3p med hjelp av kvantitativ real-time PCR. For å kunne måle denne tumormarkøren må RNA, inklusiv miRNA, isoleres fra pasientprøven (serum). Reagensene for dette første isolasjonstrinnet er **ikke** inkludert i settet.

I neste trinn blir tumormarkør miR-371a-3p, og en ekstra miRNA som brukes som endogen kontroll (heretter: referanse-miR), transkribert med spesifikke primere i cDNA. I følgende preamplifikasjonstrinn blir cDNA amplifisert i en PCR (preamplifikasjon). Til slutt bestemmes relativ hyppighet av tumormarkør miR-371a-3p med hjelp av kvantitativ PCR og normaliseres via referanse-miR. Jo tidligere et fluorescenssignal påvises under qPCR, jo flere molekyler til tumormarkør hhv. referanse-miR var i prøven. Disse verdiene kalles "Ct"-verdier. Relativ hyppighet (RQ) av miR-371a-3p beregnes iht.  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -metoden (Livak & Schmittgen, 2001) gjennom referanse-miR og en fast verdi (kalibrator). Først beregnes  $\Delta\text{Ct}$ -verdien for hver prøve:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{miR-371a-3p}) - \text{Ct}(\text{referanse-miR})$ . Til slutt dannes differansen til  $\Delta\text{Ct}$ -verdien til prøven til  $\Delta\text{Ct}$ -verdien til kalibrator, dennes relative uttrykk av miR-371a-3p likestilles med 1:  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{prøve}) - \Delta\text{Ct}(\text{kalibrator})$ . Det relative uttrykket beregnes gjennom følgende formel:  $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . RQ-verdien er et multiplum av kalibratoruttrykket. Disse beregningene kan den alternative evalueringsfilen ("M371-Test Evaluation file" se kapittel 3.4. Alternativt tilbehør for M371-Test) utføre etter riktig overføring av de målte Ct-verdiene.

Resultatene av M371-Testen må vurderes med hensynstagen til klinisk scenario, alt etter om testen brukes for å påvise en primærdiagnose eller for påvisning av tilbakefall under oppfølging av pasienter med testikkelkreft (tabell 1). Som en del av en primærdiagnose er en klar uttalelse for prøver med en relativ frekvens mellom 5 og 10 ikke mulig (INDETERMINATE), da kvantifiseringsgrensen til testen befinner seg her. I dette tilfellet skal en ytterligere M371-Test med en fersk prøve gjøres etter noen uker.

Tabell 1: Tolkning av M371-Testresultater, avhengig av klinisk scenarie.

<b>Primærdiagnose (påvisning av primærtumorer)</b>	
RQ < 5	Negativ, lav tumorsannsynlighet
$5 \leq RQ < 10$	Ubestemt (INDETERMINATE), gjentas etter noen uker
RQ $\geq 10$	Positiv, høy tumorsannsynlighet
<b>Oppfølging (påvisning av tilbakefall)</b>	
RQ < 15	Negativ, lav sannsynlighet for tilbakefall
RQ $\geq 15$	Positiv, høy sannsynlighet for tilbakefall

Se kapittel "13. Spesifikke ytelsesdata" i denne bruksanvisningen for ytterligere forklaringer for vitenskapelige bevis.

Hver prosess gjennomføres med en negativkontroll (NC). Se kapittel "10. Resultatanalyse" i denne bruksanvisningen for evaluering og gyldighet av kontroller.

### 3. Reagenser inkludert i settet

#### 3.1. Komponenter

M371-Testen finnes i to varianter (artikkelnummer MCS0105 og artikkelnummer MCS0115HT).

**Artikkelnummer MCS0105** – inneholder reagenser for fem pasientprøver og fem negativ kontroller. Brukeren kan måle hver prøve enkeltvis med en negativ kontroll (se tabell 2).

**FORSIKTIG:** Negativ kontrollen måles kun **én gang** i preamplifikasjonen og qPCR!

Tabell 2: Innhold i M371-Testsett MCS0105.

Reagens	Beholder	Volum [ $\mu$ l]
cDNA Solution (sort)	1 rør	<b>135</b>
Reverse Transcriptase (gul)	1 rør	<b>19,68</b>
RNase Inhibitor (gjennomsiktig)	1 rør	<b>3,74</b>
PreAmp Solution (grønn)	1 rør	<b>418</b>
Target Solution (blå)	1 rør	<b>410</b>
Control Solution (fiolett)	1 rør	<b>410</b>
PCR-grade water (hvit)	1 rør	<b>1000</b>

**Artikkelnummer MCS0115HT** – inneholder reagenser for femten pasientprøver og fem negativ kontroll. Brukeren må måle alle prøver i **én** gjennomgang (se tabell 3).

Tabell 3: Innhold i M371-Testsett MCS0115HT.

Reagens	Beholder	Volum [ $\mu$ l]
cDNA Solution (sort)	1 rør	<b>153</b>
Reverse Transcriptase (gul)	1 rør	<b>22,30</b>
RNase Inhibitor (gjennomsiktig)	1 rør	<b>4,24</b>
PreAmp Solution (grønn)	1 rør	<b>786</b>
Target Solution (blå)	1 rør	<b>770</b>
Control Solution (fiolett)	1 rør	<b>770</b>
PCR-grade water (hvit)	1 rør	<b>1000</b>

## 3.2. Reaktive komponenter til M371-Testen

### **cDNA Solution (sort)**

- miRNA-spesifikk Stemloop-primer for mål- og referanse-miRNA

### **Reverse Transcriptase (gul)**

- Revers transkriptase

### **PreAmp Solution (grønn)**

- miRNA-spesifikk primer for mål- og referanse-miRNA
- DNA polymerase

### **Target Solution (blå)**

- miRNA-spesifikk primer og sonde for mål-miRNA
- DNA polymerase

### **Control Solution (fiolett)**

- miRNA-spesifikk primer og sonde for referanse-miRNA
- DNA polymerase

## 3.3. Informasjoner og dokumenter for M371-Test

Bruksanvisning, sikkerhetsdatablad og video-tutorials for gjennomføring av testen finnes på mir|detect-nettside på <https://www.mirdetect.de/download>. Dersom en revidert bruksanvisning offentliggjøres får kundene informasjon om ny versjon på e-post.

## 3.4. Alternativt tilbehør for M371-Test

M371-Test-evalueringsfil ("M371-Test Evaluation File"; finnes kun på engelsk) er en alternativ tabellkalkuleringsprogramvare med integrerte formler for evaluering av prøver og sendes i elektronisk form (via e-post). Oppdaterte versjoner sendes også via e-post.

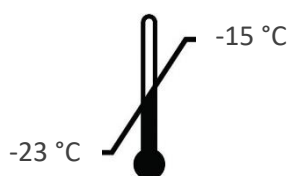
## 3.5. Farestoffer og animalske komponenter for M371-Testsett

Komponentene PreAmp Solution, Target Solution og Control Solution inneholder formamid i svært små konsentrasjoner. Alle komponenter i M371-Testen er ikke helsefarlige. For nøyaktig informasjon om konsentrasjonene kan sikkerhetsdatabladet til M371-Testen leses (<https://www.mirdetect.de/download>).

Et råstoff som brukes til produksjon av Target Solution og Control Solution inneholder animalsk gelatin. Produsenten av råstoffet forsikrer at risikoen for BSE/TSE-kontaminering er ubetydelig. I tillegg minimeres risikoen gjennom bruk av arbeidsklær (hansker, laboratoriefrakker og vernebriller, se kapittel "6. Forsiktighetstiltak") og arbeid under en PCR-arbeidsbenk under gjennomføring av M371-Testen. M371-Testen får kun brukes av spesialister.

## 4. Transport, oppbevaring og stabilitet

M371-Testen sendes < 0 °C via ekspress forsendelse. **Ved transportskader må du henvende deg umiddelbart til transportbedriften og også til mir|detect GmbH hhv. Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH.** Kontaktopplysninger er oppgitt i kapittel "17. Informasjoner for kjøper". Reagensrør med skader får ikke brukes, de må avhendes umiddelbart. Komponenter med forskjellige kit-lots skal ikke blandes med hverandre.



Alle reagenser til settet skal oppbevares før og etter første åpning ved -23 °C til -15 °C. Target Solution (blå) og Control Solution (fiolett) må beskyttes mot lys. Hver komponent kan tines og fryses igjen inntil åtte ganger.



Under overholdelse av lagringsbetingelsene kan det brukes inntil forfallsdatoen som er oppgitt på utsiden av settet (maksimal mulig holdbarhet: Ti måneder). Ikke bruk materialer etter utløpt forfallsdato.



## 5. Ytterligere utstyr som er nødvendig

### 5.1. Generelt laboratorieutstyr

Følgende laboratorieutstyr er nødvendig for å utføre M371-Testen.

- Alternativt tilbehør: M371-Test-evalueringsfil ("M371-Test Evaluation file")\*
- PCR-arbeidsbenk
- Standard-PCR-instrument
- Kjøleblokk for reaksjonskarene som brukes
- Vortex blander
- Pipette med volumer som kan endres i egnede størrelser
- Alternativ: Elektronisk dispenser
- Bordsentrifuge med en rotor for 0,2/1,5 ml reaksjonskar
- Platesentrifuge for PCR-plater
- Real-time PCR-instrument\*\*

\* Evalueringsfil for M371-Test ble validert med Microsoft Excel for Microsoft 365 MSO.

\*\* M371-Test ble validert med følgende real-time PCR-Cyclere:

- LightCycler® 480 II qPCR instrument (Roche Diagnostics) med 96-Well varmeblokk og programvareversjon 1.5.x
- QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) med 96-Well varmeblokk og "Design and Analysis" programvareversjon 1.4.x
- AriaDx (Agilent) med programvareversjon 2.0

### 5.2. Generelle forbruksmaterialer og reagenser

Alle forbruksmaterialer som brukes skal være av polypropylen og må være uten RNasen, DNasen, DNA og PCR-inhibitorer.

- Blodprøverør\*
- Kryorør, selvstående
- miRNA Extraktions-Kit\*\*
- 1,5 ml reaksjonskar med konisk bunn og sikkerhetslokk (PP)
- 0,2 ml PCR-reaksjonskar (f.eks. 8-er-striper)
- Pipettspisser med filter
- Alternativ: Del for elektronisk dispenser
- PCR-plater med klebefolie
- Applikator for påføring av klebefolier

\* nødvendig for seruminnsamling. Anbefales med Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® serum-gel (7,5 ml hhv. 9 ml Z-gel); nøyaktig informasjon for seruminnsamling i kapittel "8. Prøveinnsamling og prøvebehandling".

\*\* nødvendig for utvinning av miRNA. Test med QIAGEN GmbH miRNeasy serum/plasma kit anbefales.

### 5.3. Enhetskrav

Installasjon, kalibrering, funksjonskvalifisering og vedlikehold av alle enheter og enhetsdeler som brukes må gjennomføres tilsvarende produsentens opplysninger og er ansvaret til brukeren av testen. Denne er også ansvarlig for å bestemme tilsvarende kvalitetskontroller.

## 6. Forsiktighetstiltak

Spesialisten er ansvarlig for å overholde alle laboratorieforskrifter som brukes. Under arbeid med kjemikalier må det alltid brukes en egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller.

### 6.1. Forsiktighetstiltak på laboratoriet

Forskrifter som f.eks. DIN EN ISO 17025 eller DIN EN ISO 15189 skal overholdes for å unngå faren for en krysskontaminering av pasientprøver før, under og etter RNA-utvinning. Unngå å introdusere nukleaser i prøvene. Bruk kun engangs-pipettspisser med filter for å unngå en krysskontaminering mellom pasientprøver.

Måleresultater kan påvirkes av svært høye utetemperaturer. Reagenser og prøver som lagres utenfor kjøleskap må alltid lagres i kjøleblokker.

Reagenser for qPCR (Control Solution (fiolett) og Target Solution (blå)) er ømfintlige mot lys og skal derfor oppbevares beskyttet mot lys. For mye lyseksposering kan påvirke fluorescenssondene.

Reagensene til M371-Testene kan tines opptil åtte ganger. Utover dette bør ikke reagensene brukes lenger.

M371-Testen får kun brukes av spesialister som er kjent med metoder for serumutvinning, RNA-utvinning og qPCR.

### 6.2. Forsiktighetstiltak for å beskytte mot infeksjoner

Menneskelige blod- og serumprøver som undersøkes med denne testen skal prinsipielt behandles som potensielt infektøse og alle forsiktighetstiltak skal overholdes som i direktiv for mikrobiologisk og biologisk sikkerhet for laboratorier, "Direktiv 2000/54/EF om å beskytte arbeidstakere mot risiko pga. biologiske arbeidsstoffer under arbeidet" eller andre forskrifter for biologisk sikkerhet.

### 6.3. Melding om hendelser i sammenheng med produktet

Alle alvorlige tilfeller eller hendelser som oppstår i forbindelse med produktet må umiddelbart meldes til mir|detect GmbH ([info@mirdetect.de](mailto:info@mirdetect.de)) og de ansvarlige myndighetene. Ikke ta medisinske, relevante avgjørelser uten å ha kontaktet en helseekspert først.

### 6.4. Avhending av arbeidsmaterialer og reagenser

Alle reagenser til M371-Testen er ikke helsefarlige. Utløpte reagenser eller tomme reagensbeholdere kan avhendes med husholdningsavfallet. Vær oppmerksom på lokale bestemmelser ved dette. **Folien til brukte qPCR-plater må aldri fjernes** og se til at avhendingen gjøres uten skader.

Les oppmerksomt gjennom merknadene i bruksanvisningene til tilsvarende sett, og følg disse nøyaktig i omgang med serumprøver og deres avhending hhv. arbeidsmaterialer og -reagenser som brukes til RNA-utvinning.

## 7. Kvalitetskontroll

I overensstemmelse med ISO 13485-sertifisert kvalitetsstyringssystem til mir|detect GmbH blir hver charge av M371-Testen testet iht. oppgitte spesifikasjoner for å garantere en jevn produktkvalitet. Dette holder batch-to-batch-variabiliteten lav. Charge-sertifikater kan fås hos produsenten.

## 8. Prøveinnsamling og prøvebehandling

### 8.1. Blodprøvetaking og blodlagring

Blodprøvetaking skal utføres av kvalifisert fagpersonell for å redusere tilknyttede risikoer for pasientene og senere blodlagring og serumutvinning skal gjøres på følgende måte:

- S-Monovette® serum-gel rør skal brukes for blodprøvetaking i henhold til produsentens opplysninger. Ikke bruk plasma-, EDTA-, heparin- eller PAXgene-rør.
- Serumet bør separeres fra blodcellekomponentene så raskt som mulig etter blodprøvetaking (se 8.2. Serumutvinning, -oppbevaring og -transport).
- **Fullblodsprøver må ikke fryses**, for dette vil føre til hemolyse.

### 8.2. Serumutvinning, -oppbevaring og -transport

- Blodet i blodrørene inverteres noen ganger og inkuberes stående i 30 min. ved romtemperatur (15 – 25 °C).
- Sentrifuger blodrøret i 10 min. ved 2500 g.
- Blodrøret fjernes forsiktig fra sentrifugen.
- Serum pipetteres i et påskrevet kryorrør. Det skal utvinnes omtrent 3-5 ml serum fra totalt 10 ml fullblod.
- Serumet kan lagres i inntil 6 timer ved 2 – 8 °C, dersom RNA-utvinning gjøres samme dag.
- For langtidslagring må serumet alikvoteres og lagres ved -20 °C eller -80 °C.
- Serumet skal transporteres fryst i en egnet beholder. Stabilitet kan opprettholdes for følgende varighet:
  - 90 timer ved < -1 °C
  - 16 dager ved < -20 °C

### 8.3. Forsiktighetstiltak ved serumutvinning

Ved en påfallende rødfarging av serumet anbefales en fotometrisk måling med en absorpsjon på 414 nm. En verdi over 0,3 tyder på en eventuelt problematisk grad av hemolyse som påvirker måleresultatet til M371-Testen negativt (Myklebust *et al.*, 2019). I dette tilfellet er en ny blodprøve tilrådelig og det hemolytiske serumet skal avhendes.

En svært lav Ct-verdi <12 på referanse-miR kan også henvise om en eksisterende hemolyse og forfalske resultatet (se kapittel "10.2.2. Referanse-miR").

Dersom det ser ut som at serumet er spesielt fettholdig, lar du det hvile en stund ved romtemperatur. Da dannes et fettlag som kan fjernes forsiktig senere.

Se til at laget til Buffy Coats (leukocytffilm) ikke blir ødelagt eller overført etter sentrifugeringstrinnet over de røde blodcellene. Dette trinnet er svært viktig, for en overføring er den størst mulige kilden til kontaminering med cellulært miRNA hhv. RNA.

### 8.4. miRNA-utvinning

Materialer for utvinning av RNA hhv. miRNA fra pasientserum er ikke en del av M371-Testen.

For å unngå nedbrytning av prøvematerialet under RNA-utvinning må man se til at det ikke brukes arbeidsmidler med RNase, DNase og DNA, samt at det brukes personlig verneutstyr. Krysskontamineringer mellom pasientprøvene må også unngås.

**OBS:** Unngå forlengede inkubasjoner og tining flere ganger, for dette kan føre til nedbrytning!

RNA-utvinning gjøres i henhold til bruksanvisningen. mir|detect GmbH anbefaler å gjennomføre RNA-utvinning fra **200 µL serum**. For å garantere en jevn, effektiv utvinning må produsentens opplysninger for utvinningssettet (Extraktions-Kit) følges nøye.

- Utvunnet miRNA kan brukes direkte for gjennomføring av M371-Tester.
- miRNA bør lagres ved -20 °C eller -80 °C.
- **OBS:** Gjentatt frysing og opptining av miRNA bør unngås, for dette kan føre til nedbrytning!

## 9. Gjennomføring M371-Test

Alle reagenser til M371-Testsett er "ready-to-use" og kan brukes direkte for å gjennomføre testen.

### 9.1. Generell gjennomføring av testen

Før første bruk av M371-Testen anbefales det å gjennomføre en prøvegjennomgang med kjente prøver. For hjelp og råd, kontakt **mir|detect GmbH** (kontaktskjema via <https://www.mirdetect.de/Service/>) hhv. **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** (17.3. Distributør).

For overvåkning og jevn gjennomføring av M371-Tester i alle laboratorier anbefaler mir|detect GmbH deltakelse i regelmessige laboratoriesammenligninger (kontaktskjema via <https://www.mirdetect.de/Service/>).

En negativ kontroll (NC) fra PCR-grade water må den behandles i hver prosess for å være gyldig. Kontrollen omskrives ved dette til cDNA-syntese, men - annerledes som ved en pasientprøve - analyseres kun enkelt i den avsluttende miR-371a-3p- og referanse-miR-målingen.

#### Viktige merknader:

- Komponentene Reverse Transcriptase (gul) og RNase Inhibitor (gjennomsiktig) skal **ikke** blandes med en Vortex blander. Knips røret med fingeren i stedet. Resten av komponentene blandes før bruk i ca. 3 sek. ved ca. 2 800 o/min. i en Vortex blander, for å sikre en homogen løsning.
- Sentrifuger alle løsninger til settet - før bruk i ca. 3 sek. ved 2000 g, for å fjerne dråper på lokket.
- Ta alle løsninger fra settet ut fra lagerbetingelsene kun for gjennomføring av M371-Tester. Bruk cDNA-syntese Mastermix (MM) direkte etter produksjon. Etter bruk skal alle løsninger fryses øyeblikkelig hhv. tomme beholdere skal avhendes.
- Det anbefales å bruke tilsvarende kjøleblokker/Cooling racks for alle reaksjonskar, inkl. 8-er-striper og 96-well-plate. Dette gjør håndteringen lettere og sikrer en kontinuerlig kjøling av reagensene.
- Temperaturprogrammene (tab. 6, 8 og 9) angir de nødvendige betingelsene for de gjeldende reaksjonene. I tillegg må varmelokket aktiveres (anbefalt: 105 °C). Vær oppmerksom på bruksanvisningen til enheten din.

## 9.2. Gjennomføring av cDNA-syntese

- cDNA Solution (sort) PCR-grade water (hvit) tines kort opp ved romtemperatur eller i kjøleskap.
- cDNA Solution blandes i ca. 3 sek. i Vortex blander, sentrifugeres og oppbevares i kjøleblokk.
- Reverse Transcriptase (gul) og RNase Inhibitor (gjennomsiktig) blandes ved å knipse (ikke med Vortex), sentrifugeres og oppbevares i kjøleblokk.

De neste trinnene utføres under en ren PCR-bank.

- Mastermix (MM) for cDNA-syntese pipetteres sammen i et egnet reaksjonskar, tilsvarende antall prøver, fra cDNA Solution, Reverse Transcriptase og RNase Inhibitor. Vær oppmerksom på forholdet fra tabell 4.
- Mastermix (MM) blandes ved å knipse eller pipettering flere ganger opp og ned og sentrifugeres. Mastermix (MM) oppbevares i kjøleblokk.
- 9 µl av cDNA-syntese Mastermix (MM) hver pipetteres per pasientprøve og kontroll i en 8-er-PCR-stripe (se tabell 5).
- 6 µl hver tilføres prøve eller kontroll.

Tabell 4: Pipetteringsskjema for oppretting av en cDNA-syntese-Mastermix (MM)

Rxn = Reaksjoner.

Reagens	Mastermix (MM)	Enkelblanding	MM (2 prøver)
		1 Rxn [µl]	3 Rxn (inkl. NC og 10 % overskudd) [µl]
cDNA Solution (sort)		7,81	25,77
Reverse Transcriptase (gul)		1,00	3,3
RNase Inhibitor (gjennomsiktig)		0,19	0,63
<b>Totalt volum</b>		<b>9,00</b>	<b>29,7</b>

Tabell 5: Fordeling av cDNA-syntese-Mastermix (MM) og prøver i PCR-reaksjonskar (8-er-striper). Visning av gjennomføring for to prøver og en negativ kontroll (NC).

PCR-reaksjonskar
MM + prøve 1
MM + prøve 2
---
---
MM + NC
---
---
---

- cDNA-syntese-blandinger blandes ved å knipse eller pipettering flere ganger opp og ned og sentrifugeres.
- cDNA-syntese-blandinger inkuberes i minst 5 min. i kjøleskap hhv. på is ved +4 °C.
- cDNA-syntese gjennomføres tilsvarende tabell 6. Vær oppmerksom på aktivering av varmelokket.
- Ferdig cDNA kan oppbevares i kjøleskap (+4 °C) over natten. Fryses ved -20 °C for langtidslagring.

Tabell 6: Parameter til cDNA-syntese-program for et standard-PCR-instrument.

<b>Måltemperatur [°C]</b>	<b>Varighet [tt:mm:ss]</b>	<b>Segment</b>
16	00:30:00	Annealing
42	00:30:00	Reverse Transkription
85	00:05:00	Enzyminaktivering
≥ 4 til ≤ 10	∞	Nedkjøling



### 9.3. Gjennomføring av preamplifikasjon

- PreAmp Solution (grønn) tines kort ved romtemperatur eller i kjøleskapet, deretter blandes den i ca. 3 sek. i Vortex blander, sentrifugeres og oppbevares i kjøleblokk.

De neste trinnene utføres under en ren PCR-bank.

- Per pasientprøve fremlegges **tre** blandinger av 16 µl PreAmp Solution i PCR 8-er-striper og legg til 4 µl hver av nylig syntetisert cDNA (se tabell 7).
- For negativ kontroll er **en** 16 µl PreAmp Solution og 4 µl cDNA-blanding tilstrekkelig.
- Preamplifikasjons-blandinger blandes ved å knipse eller pipettering flere ganger opp og ned og sentrifugeres.
- Preamplifikasjon gjennomføres tilsvarende tabell 8. Vær oppmerksom på aktivering av varmelokket.
- Ferdig preamplifikater kan oppbevares i kjøleskap (+4 °C) over natten. Fryses ved -20 °C for langtidslagring.

Tabell 7: Visning av gjennomføring av en preamplifikasjon for to prøver og en negativ kontroll (NC).

PCR-reaksjonskar
Prøve 1
Prøve 1
Prøve 1
Prøve 2
Prøve 2
Prøve 2
---
NC

Tabell 8: Parameter til preamplifikasjonsprogram for et standard-PCR-instrument.

Sykluser	Måltemperatur [°C]	Varighet [tt:mm:ss]	Segment
1	95	00:01:00	Enzymaktivering
15	95	00:00:15	Denaturering
	60	00:04:00	Annealing + Elongation
1	≤10	∞	Nedkjøling

**Merknad:** Vær oppmerksom på at riktig antall sykluser innprogrammeres, for innføring av syklusene i forskjellige PCR-Cycler-systemer kan variere (totalt antall sykluser eller antall syklusjentagelser).

#### 9.4. Forberedelse preamplifiserte prøver

- Target Solution (blå) og Control Solution (fiolett) tines lysbeskyttet i kjøleskap eller kort ved romtemperatur, også lysbeskyttet. PCR-grade water (hvit) tines opp ved romtemperatur. Reagenser oppbevares i kjøleblokk.
- Ev. tines preamplifikater kort opp ved romtemperatur eller i kjøleskap, sentrifugeres og oppbevares i kjøleblokk til ytterligere bruk.

De neste trinnene utføres under en ren PCR-arbeidsbenk.

- For hver pasientprøve 60 µl PCR-grade water (hvit) i et reaksjonskar.
- Alle tre blandinger av hver prøve legges til PCR-grade water (3 × 20 µl preamplifikat = 60 µl + 60 µl PCR-grade water).
- For negativ kontroll fremlegges 20 µl PCR-grade water i et reaksjonskar og gjeldende preamplifikat legges til.

#### 9.5. Bruk av qPCR-plate

- Target Solution (blå) og Control Solution (fiolett) blandes i ca. 3 sek. i Vortex blander, sentrifugeres og oppbevares i kjøleblokk.
- For hver pasientprøve er det nødvendig med seks Wells (tre for Target Solution, tre for Control Solution). For hver negativ kontroll, to Wells hver (se fig. 1).
- 15 µl av Target Solution hhv. Control Solution pipetteres i tilsvarende posisjoner på qPCR-platen.
- Fortynnet preamplifikater blandes i ca. 3 sek. i Vortex blander før bruk, sentrifugeres og oppbevares i kjøleblokk
- 5 µl av fortynnet preamplifikat pipetteres i tilsvarende posisjoner på qPCR-platen.
- qPCR-platen lukkes med en optisk dekkfolie og strykes glatt og boblefri med en applikator for folier.
- PCR-platen sentrifugeres med en platesentrifuge (f.eks. 2 × 30 sek. ved 500 g).

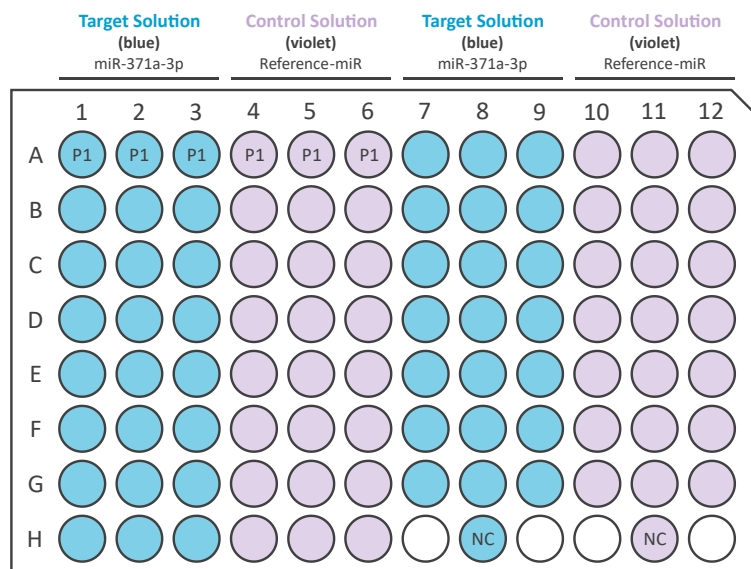


Fig. 1: Anbefalt platebruk av qPCR-platen for måling av en prøve (P1) og en negativ kontroll (NC).

## 9.6. Laste opp qPCR-plate

Vær oppmerksom på informasjon fra produsenten angående programmering av din real-time PCR-Cycler.

- I qPCR-Cycler-programvaren opprettes et qPCR-program tilsvarende tabell 9.
- Enhetens spesifikke, maksimale oppvarmings- og kjølehastigheter kan beholdes (tabell 10).
- Foreta følgende generelle innstillinger:  
Reaksjonsvolumer: 20 µl  
Deteksjonskanal: FAM
- Lasteklaffen til qPCR-instrumentet åpnes og qPCR-platen legges i rammen. Se til at platen passer nøyaktig i rammen. Lukk lasteklaffen.
- qPCR-prosessen startes og legg til et navn som tydelig kan identifiseres.
- Etter avsluttet prosess tas qPCR-platen ut av qPCR-instrumentet og avhendes, uten av beskyttelsesfolien fjernes.

**Spesiell egenskap LightCycler® 480II (Roche):** For platenes tildelingsordning må prøvene defineres i de parallelt pågående målingene til miR-371a-3p og referanse-miR som triplikater til hverandre.

- Under punktet "Sample Editor" må de tre blandingene for hver pasientprøve og hver miRNA merkes som replikater. Velg ut tre posisjoner og trykk på knappen "Make Replicates"
- F.eks.: A1-A3 = Ett replikat, A4-A6 = Ett replikat (se fig. 1)

Tabell 9: Temperaturprofil til qPCR.

Antall sykluser	Trinn	Temperatur [°C]	Varighet [mm:ss]	Deteksjon
1	Aktivering polymerase	95	10:00	
40	Denaturering	95	00:15	
	Annealing/elongation	60	01:00	Fluorescensmåling på slutten av hver syklus
1	Nedkjøling	37	01:00	

Tabell 10: Enhetens spesifikke oppvarmings- og kjølehastigheter validert qPCR-Cycler

qPCR-Cycler	Maksimal oppvarmings- hhv. kjølehastighet [°C/s]
LightCycler® 480 II	4,4 (oppvarming), 2,2 (kjøling)
QuantStudio™ 5	3,66
AriaDx	6,0

## 10. Resultatanalyse

**Merknad:** Cp (= Crossing point) og Ct (= Cycle threshold) er identiske og utskiftbare. I denne bruksanvisningen brukes begrepet Ct.

### 10.1. M371-Test-evalueringsfil og dataimport

M371-Test-evalueringsfil et alternativt tilbehør og er en programvare som sendes i elektronisk form **via e-post** når settet kjøpes. Filen med betegnelsen "M371-Test Evaluation File" er kun tilgjengelig på engelsk. For en pålitelig og sikker evaluering skal alltid den aktuelle versjonen av M371-Test-evalueringsfilen brukes. For å garantere en sikker bruk inneholder M371-Test-evalueringsfilen sperrede områder, **som ikke kan endres og heller ikke får lov til å endres**. Celler som kan skrives i er fremhevet i lysegrønt, som f.eks. betegnelse på prøvene og området for innføring av opplysninger fra qPCR. Etter innføring av opplysninger fra qPCR-prosessen i M371-Test-evalueringsfilen beregnes relativ hyppighet (RQ) til miR-371a-3p automatisk og testresultatet vises.

## 10.2. Resultatanalyse

### Analyseinnstillinger:

Tabell 11: Enhetsspesifikke analyseinnstillinger.

qPCR-Cycler	Terskelverdi	Basislinje
LightCycler® 480 II	Abs Quant/2nd Derivative Max	Start- og sluttsyklus skal velges slik at det ikke blir tatt hensyn til støy i begynnelsen og at basislinjen før deteksjon ender i en betydelig fluorescens.
QuantStudio™ 5	Auto threshold	
Aria Dx	Auto threshold	

Følgende beskrives resultatanalyse med valgfri M371-Test-evalueringsfil. Prosessen som beskrives her referer til Roche Diagnostics LightCycler® 480 II qPCR instrument med 96-Well varmeblokk og programvareversjon 1.5.x. Ved bruk av andre validerte qPCR-Cyclere må man se til at det gjøres en riktig overføring av mediane Ct-verdier i inntastingsvinduet til M371-Test-evalueringsfilen. Enhetens spesifikke analyseinnstillinger til de validerte qPCR-Cycler-systemene finnes i tabell 11.

- I LightCycler® 480 programvaren velges forrige eksperiment og klikk på fanen "Analysis".
- "Abs Quant/2nd Derivative Max" velges for alle prøver og klikk på "OK".
- "Median" velges i stedet for "Mean" i dropdown-menyen på nedre, høyre side og beregnes med "Calculate" på nedre, venstre side.
- Medianen til Ct-verdiene til miR-371a-3p og referanse-miR beregnes automatisk for hver prøve og vises i resultattabellen "Replicate Statistics" nede til venstre.
- Alle resultater fra resultattabellen "Replicate Statistics" må overføres til M371-Test-evalueringsfilen. Klikk i feltet "Replicate Statistics", marker alle data med Ctrl + A og deretter kopierer du data med Ctrl + C.
- Skift til M371-Test-evalueringsfilen og følg anvisningene for dataoverføring der.
- Resultatene fra negativ kontroll for miR-371a-3p og referanse-miR-måling må føres inn manuelt i evalueringsfilen. Ved å holde markøren (musepeker) over tilsvarende Well-posisjon i LightCycler® programvaren vises målt Ct-verdi.
- Evalueringsfilen inneholder separate resultatspalter for primærdiagnose og oppfølging. På grunn av disse forskjellige terskelverdiene kan resultatene i disse spaltene være forskjellige. **Se til at resultatet fra gjeldende scenario leses fra tilsvarende spalte.**

### 10.2.1. Negativ kontroll

I hver qPCR-prosess må en negativ kontroll (NC, PCR-grade water) brukes både for miR-371a-3p og referanse-miR-målingen for å bekrefte at testen ble vellykket utført.

En qPCR-prosess er **GYLDIG** når negativ kontroll for miR-371a-3p og negativ kontroll for referanse-miR-måling er **NEGATIV**. Den negative kontrollen er negativ når Ct-verdien for begge målte miRNA ligger minst 10 sykluser senere enn høyeste verdi til tilsvarende miRNA til en prøve eller ligger på en verdi på 35 eller mer.

En qPCR-prosess er **UGYLDIG** når negativ kontroll er **POSITIV**. Den negative kontrollen for miR-371a-3p og referanse-miR-måling er positiv når Ct-verdien for gjeldende, spesifikt målt miRNA er mindre enn 10 sykluser senere enn den høyeste verdien til en prøve.

Er de negative kontrollene **POSITIVE** kan **ikke** prøvene som ble behandlet med kontrollene vurderes. M371-Testen må i slike tilfeller gjentas for alle prøvene.

M371-Test-evalueringsfilen viser om alle kontroller er beståtte (M371-Test-evalueringsfil → Controls: NC miR-371a og NC Reference-miR).

### 10.2.2. Referanse-miR

Referanse-miR informerer om det var en tilstrekkelig miRNA-mengde i gjeldende blanding for hver prøve. Resultatet til miR-371a-3p qPCR er avhengig av resultatet til referanse-miR.

Normalt område for Ct-verdi til referanse-miR er med LightCycler® 480 II instrument mellom 12 og 22. I dette tilfellet finnes det tilstrekkelig miRNA og resultatene er gyldige.

Er Ct-verdien til referanse-miR i en prøve **høyere enn 22** peker dette på svært lave utgangsmengder etter RNA-utvinning og setter eventuelt en tydelig diagnose i fare.

Er Ct-verdien til referanse-miR i en prøve **lavere enn 12** var det muligens en hemolyse i prøven og det er ikke mulig å gjøre et klart utsagn om tumorstatus iht. denne prøven.

**Pasientprøver, hvor Ct-verdien til referanse-miR er under 12 eller over 22, bør det utvinnes på nytt og behandles med M371-Testen.**

### 10.2.3. Evaluering av prøver

Evaluering av testresultater, avhengig av klinisk scenarie, beskrives i kapittel "2. Teknologisk grunnlag for testprosedyren".

## 11. Veiledning for feilsøking (Troubleshooting Guide)

- Er en negativ kontroll ikke bestått for qPCR-prosessen, så skal hele prosessen gjentas (prøver inkl. negativ kontroll for miR-371a-3p og referanse-miR-måling).
- Uønskede signaler i negativ kontroll kan bero på at varmelokket ikke er aktivert i cDNA-syntese eller preamplifikasjon. På grunn av kondensasjon på lokene til reaksjonskarene oppstår uønskede konsentrasjonsforskyvninger. For å unngå dette skal en varmelokktemperatur på 105 °C innprogrammeres.
- Ligger Ct-verdien til referanse-miR over 22 for en prøve, bør prøven utvinnes på nytt og behandles med M371-Testen, for det var ikke tilstrekkelig mengde med utgangsmaterial.
- Ligger Ct-verdien til referanse-miR under 12, bør prøven utvinnes på nytt og behandles med M371-Testen, for prøven var sannsynligvis hemolytisk.
- Dersom RQ ligger mellom 5 og 10 (ubestemt område) for en prøve fra **primærdiagnose** blir pasienten bedt om blodprøvetaking igjen om noen uker og målingen gjentas.
- LightCycler®-programvare: Hvis tabellen "Replicate Stats" mangler kontrollerer du om replikatene fra en pasientprøve er tilordnet hverandre som replikater.

## 12. Prosessens grenser

- Testen er kun egnet for in vitro diagnose.
- Testen skal kun brukes til deteksjon av testikkelcelletumorer type II (Germ Cell Neoplasia *in situ* derived GCTs).
- Testen har ingen prognostisk funksjon (prediksjon av residiv etter intervensjon), men kan brukes til follow-up monitoring av pasienter med testikkelkreft.
- Kun qPCR-Cycler som nevnes i kapittel "5.1. Generelt laboratorieutstyr" ble validert.
- Dette produktet ble utviklet for analyse av serum. Kun S-Monovette® serum-gel blodprøverør 7,5 og 9 ml Z-gel fra firmaet Sarstedt AG & Co. KG ble validert.
- Andre typer pasientprøver og andre blodprøverør ble ikke validert.
- Merknadene for prøveinnsamling og prøvebehandling i kapittel "8. Prøveinnsamling og prøvebehandling" må observeres
- Dette produktet får kun brukes av personer med erfaring i å gjennomføre PCR-tester.
- Testresultatet kan ikke brukes som eneste primærdiagnose av testikkelcelletumor eller for å oppdage residiv. Hver positive M371-Test skal bekreftes gjennom en egnet prosedyre for klinisk diagnostikk.
- Testresultatet til M371-Testen må evalueres i sammenheng med andre kliniske parametre.
- Rene teratomer viser nesten ingen økt ekspresjon av tumormarkør miR-371a-3p-3p, derfor kan ikke denne tumorenheten påvises (Dieckmann et al., 2017; 2019).
- Referanse-miR uttrykkes ved økte nivåer i hjernevevet til Alzheimer-pasienter (Song et al., 2019). Det er ennå ikke kjent om denne også gjelder konsentrasjonen av referanse-miR i serum til disse pasientene. I slike tilfeller kan feile negative testresultater oppstå.
- Positive testresultater ble observert hos gravide kvinner, som ikke tilhører målgruppen av pasienter som skal analyseres med M371-Testen (Gu et al., 2013).
- En økt hemolyse fører til en økt frigjøring av referanse-miR som ble påvist i testen. Det fører til en betydelig reduksjon av Ct-verdiene til referanse-miR, noe som kan føre til forfalskede RQ-verdier og i uheldige tilfeller til feil negativt testresultat (Myklebust et al., 2019).
- Det kan ikke utelukkes at miR-371a-3p uttrykkes økt for Covid-19-pasienter (Goebel et al., 2022).



## 13. Spesifikke ytelsesdata

### 13.1. Analytisk ytelse

#### 13.1.1. Analytisk sensitivitet

Minste målbar forskjell i RQ-verdier og Ct-verdier ble målt med tre fortytningstrinn av mimic-miRNA-prøver, bestående av miR-371a-3p og referanse-miR. Hver fortytning ble målt i 10 replikater med et kit-charge. Det resulterte i at minste målbare forskjell ligger på 0,52 pmol/l.

#### 13.1.2. Analytisk spesifisitet

Tre forskjellige pasientsimulerende prøver (høy, middels, ingen miR-371a-3p-uttrykk) ble målt med sterk, lav og uten forurensning (DNA, protein-kontaminering). For alle målinger ble samme M371-Test-kit-charge brukt. Resultatene ble undersøkt gjennom en regresjonsanalyse.

Ct-verdien til miR-371a-3p økte i sterkt uttrykkende prøver på grunn av forurensning. Dette kan føre til en lavere RQ ( $p=0,005$ ,  $R^2=0,698$ ).

For moderat uttrykkende prøver førte forurensning med DNA/protein til betydelig høyere Ct-verdier på miR-371a-3p og referanse-miR, samt RQ-verdier ( $p=0,001$ ,  $R^2=0,798$ ;  $p=0,004$ ,  $R^2=0,711$ ;  $p=0,001$ ,  $R^2=0,812$ ).

Med hensyn til resultatene må man være spesielt oppmerksom på en riktig miRNA-utvinning iht. produsentens protokoll for å unngå en mulig kontaminering av en pasientprøve.

#### 13.1.3. Påvisning- og kvantifiseringsgrense

Påvisning- og kvantifiseringsgrense (Limit of Detection (LoD) & Limit of Quantification (LoQ)) til M371-Testen ble bestemt i en fortyttingsrekke av miR-371a-3p med seks fortytningstrinn og referanse-miR i konstant konsentrasjon med seks replikater. Alle målinger ble gjennomført med et M371-Test-kit-charge.

Påvisningsgrensen (LoD) ble på forhånd definert slik at minst 5/6 fortytninger må påvises. I forsøk var dette var tilfellet inntil en konsentrasjon på 7,575 fM. Variasjonskoeffisienten var på 77,33 %.

Kvantifiseringsgrensen (LoQ) ble på forhånd definert slik at variasjonskoeffisienten skal være maks. 50 %. Dette var tilfellet inntil en konsentrasjon på 30,3 fM. For denne konsentrasjonen er variasjonskoeffisienten på 44,07 %. Middels RQ til LoD er på 1,05; middels RQ til LoQ er på 8,71. Dette betyr at LoQ ligger knapt over cut-off-verdien til RQ = 5. Siden verdier under 8,71 ikke kan kvantifiseres nøyaktig, ble cut-off-verdien for primærdiagnosen utvidet til et cut-off-område som omfatter RQ-verdier på 5 til 10. Verdier innenfor dette området kan ikke måles nøyaktig og gjelder som ubestemte (INDETERMINATE).

#### 13.1.4. Linearitet

For måling av linearitet ble en mimic-miRNA-prøve i en konsentrasjon på 500 pM fortynnet seks ganger 1:10. Hver fortynning ble målt tre ganger uavhengig av samme operatør med et M371-Test-kit-charge på forskjellige dager. Dette resulterte i en gjennomsnittlig PCR-effektivitet på 90 %, korrelasjonskoeffisienten ( $R^2$ ) var på 0,993-0,997. Observasjon av miR-371a-3p-Ct-verdiene viste at konsentrasjoner fra 5 fM til 500 fM var i lineært område. Ved en konsentrasjon på 0,5 fM kunne ikke miR-371a-3p påvises.

### 13.2. Presisjon

#### 13.2.1. Gjentakelsespresisjon

Reproduserbarheten til testresultatene ble formidlet gjennom gjentatte tester av prøver med fire forskjellige konsentrasjoner (høye, middels, lave og ingen miR-371a-3p-uttrykk). Hver prøve ble behandlet i 30 replikater med en charge av et M371-Testsett av en operatør. Variasjonskoeffisienten for prøver med høyt og middels uttrykk er på ca. 14 %. For prøver med lavt uttrykk er variasjonskoeffisienten på inntil 85 %, på grunn av dette må kvantifiseringsgrensen observeres under evalueringen. Prøver som representerer tumorfrie pasienter kan ha variasjonskoeffisienter på 127 %. Dette ble observert ved en konsentrasjon på 5 fM. Siden denne konsentrasjonen ligger under påvisningsgrensen (7,575 fM) er en høyere variasjonskoeffisient uproblematisk.

#### 13.2.2. Komparativ presisjon

Følgende parameter ble undersøkt for komparativ presisjon:

- Forskjellige operatører
- Forskjellige forbruksmaterialer (qPCR-plater)
- Forskjellige laboratorier (forskjellige PCR-Cyclere og qPCR-Cycler-instrumenter (LightCycler® 480II))

Per operatør ble fire forskjellige konsentrasjoner målt på prøver i to replikater (høye, middels, lave og ingen miR-371a-3p-uttrykk). Per platetype ble fire konsentrasjoner målt (høye, middels, lave og ingen miR-371a-3p-uttrykk) med fire replikater hver. Per laboratorie ble fire konsentrasjoner målt (høye, middels, lave og ingen miR-371a-3p-uttrykk) med fire replikater hver.

Operatører og forbruksmaterialer som qPCR-plater hadde ingen betydelig påvirkning på RQ til de undersøkte prøvene ( $p= 0,09 - 0,33$ , Kruskal Wallis hhv.  $p= 0,25 - 0,81$ , Mann-Whitney U). Ved sammenligning av to laboratorier var det i høyere område til RQ en betydelig forskjell ( $p=0,014$ , Mann-Whitney U i RQ-område 200-2000). Dette gjaldt imidlertid ikke den kliniske beslutningsgrensen ( $RQ= 10$ ) og beveget seg for variasjonskoeffisienten i et område på 21-22 %.

### 13.3. Klinisk ytelsesevne

Den kliniske ytelsesevnen til M371-Testen ble blant annet påvist i en multisenter-studie på 37 klinikker fra Tyskland, Østerrike, Sveits, Ungarn og Italia (Dieckmann et al., 2019). For studien ble serumprøver fra 616 pasienter med kimcelletumorer og fra 258 kontrollpasienter målt med M371-Testen. For bestemmelse av klinisk ytelsesevne for primærdiagnose ble prøver fra 522 tumorpasienter, derav 323 seminomer og 199 nonseminomer, sammenlignet med prøver fra 258 kontrollpasienter.

I primærdiagnose av kimcelletumorer påviste M371-Testen en sensitivitet på 91,8 % og en spesifisitet på 96,1 %. AUC (område under ROC-kurve) var på 0,970 og positiv prediktiv verdi var på 97,2 % (tabell 12).

Tabell 12: Kliniske ytelseegenskaper til M371-Testen (fra Dieckmann et al. 2019).

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

\*De kliniske ytelseegenskapene til PPV og NPV baserer på n = 155 KCT og n = 90 kontroller. AUC: Area under the curve (område under kurven), CS: Clinical stage (klinisk stadie), KCT: Kimcelletumor, LR+: Positiv likelihood-ratio, LR-: Negativ likelihood-ratio, PPV: Positiv prediktiv verdi, NPV: Negativ prediktiv verdi. Verdier i parentes = 95 % konfidensintervall.

Residiv fra KCT-pasienter kunne bestemmes riktig i 10 av 10 hhv. 4 av 4 residiv med middels økt miR-371a-3p-uttrykk (Dieckmann et al., 2017; van Agthoven et al., 2017). En annen gruppe viste på prøver til 10 TGCT-pasienter en økning av miR-371a-3p-uttrykket under et tilbakefall (Terbuch et al., 2018).

Dieckmann et al. viste en sensitivitet på 83 % ved n = 46 TGCT-residiver med en normalisering av miR-371a-3p-serumverdiene etter vellykket residivterapi (Dieckmann et al., 2019). En økning av miR-371a-3p ved residiv ble også konstatert av Rosas Plaza et al. (Rosas Plaza et al., 2019).

I en serie på n = 151 kliniske TGCT-pasienter i stadium 1 fant Lobo og kolleger n = 34 tilfeller tilbakefall. Derav kunne de påvise n = 32 (94 %) med miR-371a-3p-måling, mens klassisk gullstandard (AFP og bHCG) kun var økt i 38 % av tilfellene (Lobo et al., 2020).

Påliteligheten av påvisning av residiv med miR-371a-3p-uttrykk kunne i tillegg bekreftes av Fankhauser et al. I en studie med 30 pasienter kunne et økt miR-371a-3p-uttrykk i 10/10 pasienter med residiv konstateres, mens miR-371a-3p kun økte i en pasient uten residiv (Fankhauser et al., 2022). Denne økningen normaliserte seg allerede ved neste måling, noe som tyder på at økningen av miR-371a-3p bør overvåkes selv etter økt uttrykk. Residiv kunne i median måles to måneder tidligere enn med de vanlige metodene, hos én pasient til og med over fem måneder tidligere (Fankhauser et al., 2022).

Den mest omfattende studien av ytelseevnen til M371-Testen i oppfølging av pasienter med testikkelcelletumorer i klinisk stadium I inkluderte 258 pasienter og disse ble observert over en median periode på 18 måneder. For alle 39 pasienter som utviklet residiv i denne perioden var testen positiv. Residiv ble registrert med en sensitivitet på 100 %, samtidig ble en spesifisitet på 96,3 % oppnådd (Belge et al., 2024). I denne oppfølgingsstudien må man være oppmerksom på at et relativt uttrykk av RQ = 15 som cut-off ble brukt til påvisning av residiv, som er forskjellig fra cut-off som brukes i primærdiagnosen (RQ = 5, Dieckmann et al., 2019) (se også "2. Teknologisk grunnlag for testprosedyren"). Med de klassiske serummarkørene bHCG og AFP kunne residiv påvises med en spesifisitet på 91,8 %, men de oppnådde kun en sensitivitet på 45,2 %. Ytterligere detaljer om sensitivitet, spesifisitet og positive og negative prediktive verdier av M371-Testen sammenlignet med de klassiske serummarkørene i oppfølging av pasienter med kimcelletumorer i klinisk stadium I er sammenfattet i tabell 13.

Tabell 13. Kliniske ytelseegenskaper til M371-Testen under oppfølging av CS I KCT-pasienter, sammenlignet med klassiske serummarkører (fra Belge et al., 2024).

Markør	Klin. Bekreftede residiv				Residivfrie tilfeller				PPV [%]	NPV [%]
	n	SP	FN	Sensitivitet [%]	n	SN	FP	Spesifisitet [%]		
M371, alle KCT	39	39	0	100,0 (100,0 – 100,0)	219	211	8	96,3 (93,9 – 98,8)	83,0 (72,2 – 93,7)	100,0 (100,0 – 100,0)
M371, S	17	17	0	100,0 (100,0 – 100,0)	172	166	6	96,5 (93,8 – 99,3)	73,9 (56,9 – 91,8)	100,0 (100,0 – 100,0)
M371, NS	22	22	0	100,0 (100,0 – 100,0)	47	45	2	95,7 (92,9 – 100,0)	91,7 (80,7 – 100,0)	100,0 (100,0 – 100,0)
bHCG	31	11	20	35,5 (19,2 – 54,6)	196	192	4	98,0 (94,9 – 99,4)	73,3 (51,0 – 95,7)	90,6 (86,6 – 94,5)
AFP	32	8	24	25,0 (11,5 – 43,4)	196	184	12	93,9 (89,5 – 96,8)	40,0 (18,5 – 61,5)	88,5 (84,1 – 92,8)
bHCG / AFP	31	14	17	45,2 (27,3 – 64,0)	196	180	16	91,8 (87,1 – 95,3)	46,7 (28,8 – 64,5)	91,4 (87,4 – 95,3)

KCT: Kimcelletumor, S: Seminom, NS: Nonseminom, bHCG/AFP: Tilfeller med minst en positiv serummarkør bHCG og/eller AFP, n: Registrert antall saker, SP: Sant-positiv, FN: Feil-negativ, SN: Sant-negativ, FP: Feil-positiv, NPV: Negativ prediktiv verdi, PPV: Positiv prediktiv verdi. Verdier i parantes = 95 % konfidensintervall.

## 13.4. Interferens

### 13.4.1. Hemolyse

En økt hemolyse fører til en økt frigjøring av referanse-miR som ble påvist i testen. Det fører til en betydelig reduksjon av Ct-verdiene til referanse-miR, noe som kan føre til forfalskede RQ-verdier og i uheldige tilfeller til feil negativt testresultat. Tyve serum fra pasienter ble undersøkt for hemolyse basert på misfarging og fotometrisk måling (414 nm). Hver prøve ble enkelt målt med M371-Testen. Grad av hemolyse hadde en betydelig påvirkning på målingen av referanse-miR ( $p=0,002$ ). En høyere grad av hemolyse fører til en lavere Ct-verdi til referanse-miR ( $R^2=0,437-0,743$ ).

### 13.4.2. Andre medisinske tilstander

For pasienter med Alzheimer ble økte konsentrasjoner av referanse-miR observert i hjernevevet (Song et al., 2019). Om det også finnes økte konsentrasjoner av referanse-miR i serum til disse pasientene, noe som kan forfalske testresultatet, er ennå ikke kjent. Positive testresultater ble observert hos gravide kvinner, som ikke tilhører målgruppen av pasienter som skal analyseres med testen. Nye studier tyder på at miR-371a-3p kan være økt for pasienter med Covid-19 (Goebel et al., 2022). Dersom disse studiene bekreftes, anbefales det i mistenkte tilfeller å undersøke Covid-19-statusen til pasientene parallelt.

### 13.4.3. Cross-Reactivity

Følgende stoffer ble testet for interferens med M371-Testen: DNA-kontaminering, proteiner, EDTA, sitrater, heparin, lignende miR-sekvenser (miR-372-3p).

For interferenstesten ble CLSI Interference Testing in Clinical Chemistry 3rd ed. brukt. Først ble en serumprøve for hver interferent delt opp i to grupper, hvor den ene ble beriket med en konsentrasjon av interferent som er tre ganger høyere enn forventet. Den andre gruppen ble ikke beriket med interferenter og ble brukt som kontroll. Hver gruppe ble målt i 7 replikater. Dersom forskjellen til resultatet oversteg et forhåndsbestemt nivå (50 %) mellom testgruppen og kontrollgruppen, ble det utført et dose-response eksperiment.

Ved kontaminering med DNA, protein og heparin ble RQ påvirket og resultatet til testen, allerede ved svært lave kontamineringer.

Selv om anbefalt miRNA-isolering og lignende metoder fjerner DNA og protein fra serumprøver, kan manglende overholdelse av produsentens protokoll føre til kontaminering av pasientprøvene med DNA eller protein. Denne kontamineringen kan føre til forfalskede resultater. mir|detect GmbH anbefaler derfor på det sterkeste å følge produsentens protokoller nøyaktig.

Siden allerede små mengder heparin kan påvirke resultatene til pasientprøvene, anbefaler mir|detect GmbH å bruke Sarstedt AG & Co. KG S-Monovette® serum-gel for blodprøvetaking hhv. serumutvinning.

Det kan ikke utelukkes at ytterligere, mulige interferenser oppdages i fremtiden.

## 13.5. Summary of Safety and Performance (Kort rapport for sikkerhet og ytelse)













Aktuell kort rapport for sikkerhet og ytelse ("Summary of Safety and Performance") fås hos EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>) eller via kontaktskjemaet på [www.mirdetect.de/Service](http://www.mirdetect.de/Service).

## 14. Symbolenes betydning

Bruk av symboler i henhold til DIN EN ISO 15223-1:2021 (medisinprodukter - symboler for medisinsk utstyr til bruk på etiketter, som merking og til informasjon - del 1: Generelle krav (ISO 15223-1:2016, korrigert utgave 2017-03); tysk utgave EN ISO 15223-1:2016).

Følgende vises symbolene med sine betydninger (se tabell 14).

Tabell 14: Visning av symboler og deres betydning.

	CE-merking + kode til meldt organ (XXXX)
	<i>In vitro</i> diagnose
	Vær oppmerksom på bruksanvisningen
	Artikkelnummer
	Chargenummer
	Produsent
	Distributør
	Tilstrekkelig for <n> tester
	Beskyttes mot sollys
	Temperaturbegrensning
	Kan brukes til
	Må ikke brukes dersom emballasjen er skadet

## 15. Endringer i forhold til forrige bruksanvisning

### 15.1. Endringer i forhold til versjon 10

- Oppdatering av distributørens firmanavn
- Legg til en tabell for tolkning av M371-Testresultater, avhengig av klinisk scenarie, i kapittel 2 Teknologisk grunnlag for testprosedyren.
- Forklaring av RQ-beregning i kapittel 2 Teknologisk grunnlag for testprosedyren
- Henvisning til dokumentene som er tilgjengelig for nedlastning på mirdetect nettside i kapittel 3.3 Accessoires
- Legge til kapittel 3.4 Farestoffer og animalske komponenter for M371-Testsett
- Korrektur av transporttemperatur i kapittel 4
- Nytt bilde for qPCR-platebruk i kapittel 9.5
- Fjerning av symbolet "non-sterile" fra tabell i kapittel 14
- Oppdatering av kapittel 10.2 resultatanalyse (LightCycler® instrument)
- Oppdatering av kapittel 12 Prosessens grenser
- Oppdatering av kapittel 13 Spesifikke ytelsesdata

### 15.2. Endringer i forhold til versjon 11

- Korrektur av formuleringer og rettskrivingsfeil
- Legge til koden til meldt organ ved siden av CE-symbolet på omslagsarket
- Henvisning om IVDR-sertifisering av M371-Test i kapittel 1
- Opplisting av reaktive komponenter til M371-Test i kapittel 3.2
- Bilde av real-time PCR-Cycler QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) med 96-Well varmeblokk og "Design and Analysis" programvareversjon 1.4.x og Aria Dx (Agilent) med programvareversjon 2.0 i kapittel 5.1
- Fjerning av alternativ positiv prøve fra kapittel 3 og 9, tilhørende tabeller og kapittel 18.1 for beregning av Mastermix-blanding
- Bytte kapittel "Accessoires" med kapittel "3.3 Informasjoner og dokumenter for M371-Test" og "3.4 Alternativt tilbehør"
- Henvisning om alternativ M371-Test-evalueringsfil, som kun er tilgjengelig som engelsk versjon "M371-Test Evaluation File" i kapittel 3.4 og 10.1
- Visning av viktige merknader i kapittel 9.1 i underpunkter for bedre oversikt og legge til to nye merknader for bruk av kjøleblokker/Cooling Racks og aktivering av varmelokk på PCR-cyclere.
- Endring av betegnelsen "Primer Hybridisering" til "Annealing" i tabell 6 og 8
- Henvisning om aktivering av varmelokk i kapittel 9.2, 9.3 og 11
- Ny henvisning om blanding og sentrifugering av preamplifikater i kapittel 9.5
- Legge til en tabell for varme- og kjøle hastighetene til validerte cycler-systemer, samt enklere tabell for qPCR-cycler-temperaturprofil i kapittel 9.6
- Henvisning om de to separate resultatspaltene i M371-Test-evalueringsfil og legge til en tabell for enhetsspesifikke analyseinnstillinger til validerte cycler-systemer i kapittel 10.2
- Detaljert beskrivelse av økt uttrykk av referanse-miR for Alzheimer-pasienter i kapittel 12 og 13.4.2
- Korrektur av analytisk sensitivitet til 0,52 pmol/l i kapittel 13.1.1
- Ytterligere opplisting av endringer i versjon 10 i kapittel 15.1
- Oppdatering av e-post-adresse til distributør i kapittel 17.3

## 16. Referanser

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

## 17. Informasjoner for kjøper

### 17.1. Produsent



mir|detect GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven, Tyskland

For ytterligere informasjon og hjelp ber vi deg om å besøke våre nettsider eller send oss en e-post/ring oss:

Nettside: <https://www.mirdetect.de>

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

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

### 17.2. Trademarks

Alle varemerker, merker og navn nevnt i dette dokumentet tilhører deres respektive selskaper.

### 17.3. Distributør



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

E-post: [Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com)

Phone: +49 6074 23698-0

## 18. Vedlegg

### 18.1. Maler for å lage cDNA-syntese-Mastermix (MM)

Tabell 15: Pipetteringsskjema for oppretting av en cDNA-syntese-Mastermix for 2, 3, 4 og 5 prøver (inkl. 10% overskuddsvolumer), Rxn = Reaksjoner.

Mastermix (MM) Reagens	MM (2 prøver)	MM (3 prøver)	MM (4 prøver)	MM (5 prøver)
	3 Rxn (inkl. NC og overskudd) [µl]	4 Rxn (inkl. NC og overskudd) [µl]	5 Rxn (inkl. NC og overskudd) [µl]	6 Rxn (inkl. NC og overskudd) [µl]
cDNA Solution (sort)	25,77	34,36	42,96	51,55
Reverse Transcriptase (gul)	3,3	4,4	5,5	6,6
RNase Inhibitor (gjennomsiktig)	0,63	0,84	1,05	1,25
<b>Totalt volum</b>	<b>29,7</b>	<b>39,6</b>	<b>49,5</b>	<b>59,4</b>