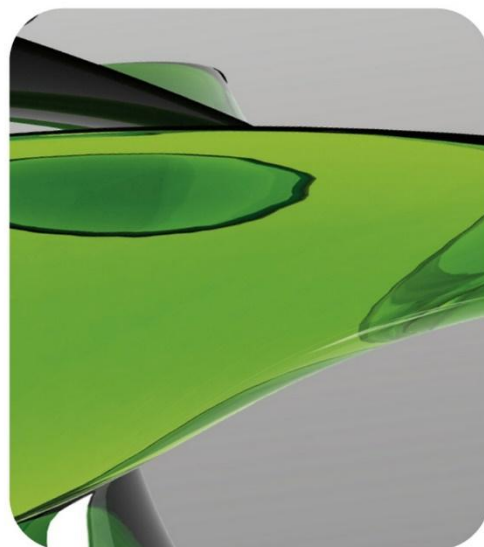




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® MMP-3

Ref 3168



Gebrauchsanweisung

Inhaltsverzeichnis

1	Zweckbestimmung	1
2	Klinische Anwendung und Testprinzip.....	1
3	KIT Bestandteile	2
4	Lagerung und Haltbarkeit.....	2
5	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	3
6	Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung	4
7	Testdurchführung.....	4
8	Quantitative Auswertung	7
9	Technische Daten	8
10	Testdaten/Testcharakteristik	8
11	Literatur	11
12	Regulatorische Symbole	12



Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
 Mikroforum Ring 2
 55234 Wendelsheim
 Germany
 Phone: +49 6734 9622-0
 Fax: +49 6734 9622-2222
 Website: www.aesku.com
 Mail: info@aesku.com

1 Zweckbestimmung

Der **AESKULISA® MMP-3** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen human MMP-3 zur quantitativen Bestimmung der MMP-3 Konzentration in humanem Serum. Ergebnisse werden in ng/ml angegeben. Der Standard-Kurvenbereich liegt bei 0-200 ng/ml.

Der Test dient zur Überwachung der Aktivität der Rheumatoiden Arthritis.

2 Klinische Anwendung und Testprinzip

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die in erster Linie durch Gelenkentzündungen charakterisiert ist und zu Funktionalitätsverlust der Gelenke und schweren Behinderungen führt, wenn das Fortschreiten der Krankheit nicht rechtzeitig aufgehalten wird. Der **AESKULISA® MMP-3** hilft RA Patienten zu identifizieren, die von einem frühen Beginn mit aggressiver Medikamenten-Therapie profitieren. Desweiteren kann der **AESKULISA® MMP-3** zur Kontrolle und Überwachung des Therapie-Erfolges genutzt werden.

Die Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3, Stromelysin-1) gehört zur Familie der Metalloproteinasen. Sie wird hauptsächlich von Bindegewebszellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei den Stoffumsatz-Prozessen der extrazellulären Matrix (ECM). MMP-3 kann viele Komponenten der ECM spalten wie z.B. Proteoglykane, Fibronectin, Laminin und verschiedene andere Kollagene. Aufgrund dieser großen Substratbreite und der Fähigkeit, weitere abbauende Enzyme inklusive anderer Matrix Metalloproteinasen aktivieren zu können, spielt MMP-3 eine Schlüsselrolle bei den physiologischen und pathologischen Prozessen des Gewebeumbaus.

MMP-3 wird in einer inaktiven Form (pro-MMP-3, 52 kDa) sekretiert und durch limitierte Proteolyse durch Endopeptidasen aktiviert. Aktives MMP-3 (45 kDa und 35 kDa) kann durch Bindung an Gewebeinhibitoren von Matrix Metalloproteinasen (TIMP) oder α2-Macroglobulin inhibiert werden. Die Regulation der MMP-3 Aktivität ist notwendig um die Zerstörung der ECM zu verhindern und das physiologische Gleichgewicht bei Gewebeumbauprozessen zu erhalten. In Übereinstimmung damit können bei verschiedenen pathologischen Zuständen wie z.B. bei Krebs, Atherosklerose und Arthritis erhöhte MMP-3 Konzentrationen gefunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Serum MMP-3 Konzentration in RA Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ist. In Folge der massiven Entzündung und Proliferation von synovialen Gewebe bei RA Patienten erhöhen sich die MMP-3 Expression und Sekretion in die Synovialflüssigkeit. Die Menge an MMP-3 in der Synovialflüssigkeit korreliert mit der MMP-3 Konzentration im Serum. Serum MMP-3 spiegelt dadurch den Entzündungsprozess in den betroffenen Gelenken wieder und ist ein Marker für die Aktivität der Erkrankung. Sogar im frühen Stadium der Erkrankung können die destruktiven Prozesse in den Gelenken von RA Patienten mit erhöhten MMP-3 Konzentrationen korreliert und prognostiziert werden.

Der **AESKULISA® MMP-3** misst Gesamt-MMP-3 (pro- und aktives MMP-3) in menschlichem Serum und ist ein Werkzeug zur Risikoeinschätzung der Entwicklung von Gelenksdestruktionen und zur Kontrolle der Krankheitsaktivität und des Therapie-Erfolges bei RA Patienten.

Testprinzip

Die 1:10 verdünnten Serumproben werden in den Kavitäten, welche mit einem monoklonalen anti-human MMP-3 Antikörper beschichtet sind, inkubiert. Hierbei bindet MMP-3 aus dem Patientenserum an den Antikörper auf der Platte; ungebundene Serumkomponenten werden im folgenden Waschschrift gewaschen. Anschließend wird ein monoklonaler anti-human MMP-3 Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase markiert ist (Konjugat), zugegeben. Während einer Inkubation bindet dieser an den zuvor gebildeten Antikörper-MMP3-Komplex. Nicht gebundenes Konjugat wird im folgenden Waschschrift entfernt. Der Nachweis von gebundenem MMP-3 erfolgt mit einer enzymatischen Farbreaktion (blau) des Substrates, die mit verdünnter Säure abgestoppt wird (Farbumschlag nach gelb). Die Intensität der Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an den Antikörper-MMP-3-Komplex gebundenen Konjugatmenge und somit direkt proportional zur MMP-3 Konzentration im Serum.

3 KIT Bestandteile

Vor Gebrauch verdünnen				
Kitbestandteil	Menge	Farbe des Verschluss	Farbe der Lösung	Beschreibung / Inhalt
Probenpuffer 5x	1 x 20 ml	Weiß	Gelb	5 fach konzentriert Tris, NaCl, BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Waschpuffer 50x	1 x 20 ml	Weiß	Grün	50 fach konzentriert Tris, NaCl, Tween 20, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Gebrauchsfertig:				
Kitbestandteil	Menge	Farbe des Verschluss	Farbe der Lösung	Beschreibung / Inhalt
Negativ Kontrolle	1 x 1,5 ml	Grün	Farblos	BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Positiv Kontrolle	1 x 1,5 ml	Rot	Gelb	Gereinigtes humanes MMP-3, BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Kalibratoren	6 x 1,5 ml	Weiß	Gelb*	Konzentration der Kalibratoren: 0, 5, 20, 50, 100, 200 ng/ml. Gereinigtes humanes MMP-3, BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Konjugat	1 x 15 ml	Blau	Blau	Anti-human MMP-3 markiert mit Meerrettichperoxidase, BSA
TMB Substrat	1 x 15 ml	Schwarz	Farblos	Stabilisiertes TMB/H ₂ O ₂
Stop Lösung	1 x 15 ml	Weiß	Farblos	1M Salzsäure
Mikrowell-Streifen	12 x 8 well strips	N/A	N/A	brechbar. Beschichtung siehe Punkt 1.
*Farbintensität mit Konzentration steigend				
Erforderliche Materialien, nicht im Kit enthalten:				
Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 620nm (600-690 nm). Glaswaren (Zylinder 100-1000ml), Röhrchen für Verdünnungen, Vortexer, Mikropipetten (10, 100, 200, 500, 1000 µl) oder einstellbare Multipipette. Wascheinheit für Mikrotiterplatten (300µl Multipipette oder Mehrkanalpipette oder automatisches Waschsysteem), Filterpapier. Unsere Tests wurden für die Verwendung mit gereinigtem Wasser (purified water) nach der Definition der U.S. Pharmacopoe (USP 26 - NF 21) und der Europäischen Pharmacopoe entwickelt (Eur. Ph. 4te Ed.).				

4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Lagerung der Kitreagenzien und der Mikrotiterplatte soll bei 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F in den Originalflaschen erfolgen. Verdünnte Lösungen sind bei 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F einen Monat haltbar. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen! Eine starke Lichteinwirkung auf die Substratlösung TMB ist zu vermeiden. Mikrotiterplatten stets in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel verschlossen aufbewahren.

5 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

5.1 Gesundheitsrisiko

Dieses Produkt darf ausschließlich zur IN VITRO DIAGNOSTIK verwendet werden.

Die Anwendung muss durch Personal erfolgen, das speziell in der Verwendung von in vitro-Diagnostika unterrichtet und ausgebildet wurde. Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien sind bei vorschriftsmäßigem Gebrauch weder als toxisch noch als gesundheitsgefährlich einzustufen, dennoch sollte zur Gewährleistung der maximalen Sicherheit des Anwenders folgendes eingehalten werden:

Empfehlungen und Vorsichtsmaßnahmen

Da einzelne Komponenten des Kits potentiell gefährdende Reagenzien enthalten, können diese eine Reizung der Augen und der Haut hervorrufen.

ACHTUNG: Kalibratoren, Kontrollen und Puffer enthalten Natriumazid (NaN_3) als Konservierungsstoff. NaN_3 kann toxisch wirken, sofern es eingenommen oder über die Haut oder Augen adsorbiert wird. NaN_3 kann mit Blei oder Kupferrohren hochexplosive Metallazide bilden. Zur Vermeidung von Azid-Anreicherungen sollte bei der Entsorgung dieser Lösungen bitte mit einer großen Menge Wasser nachgespült werden. Bitte die Vorgaben örtlicher/ nationaler Vorschriften zur Dekontamination beachten.

Während des Arbeitens mit dem Kit nicht essen, trinken oder rauchen. Nicht mit dem Mund pipettieren, Einmal-Handschuhe tragen.

Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien humanen Ursprungs (Kontrollen und Kalibratoren) erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HbsAg), Hepatitis C und HIV 1 und 2 als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierte Krankheitserreger enthalten sind. Daher sind Kontrollen, Kalibratoren sowie Patientenseren als potentiell infektiös einzustufen und entsprechend der nationalen Rechtslage zu handhaben. Das Produkt enthält Bestandteile tierischen Ursprungs wie in der Tabelle der Bestandteile angegeben: Beim Umgang sind entsprechende nationale Richtlinien zu beachten.

5.2 Allgemeine Hinweise

Sollten Produktinformationen, einschliesslich Labeling falsch oder inkorrekt sein, kontaktieren sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits.

Einzelne Kontrollen, Kalibratoren und Konjugate oder Mikrotiterplatten verschiedener Chargen sollten nicht ausgetauscht werden, da dies zu Verfälschungen der Messergebnisse führen kann.

Alle Kit-Komponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F) bringen und gut durchmischen. Das vorgeschriebene Protokoll zur Durchführung des Tests ist unbedingt einzuhalten.

Inkubation: Für eine Testabarbeitung (auch mit Automaten) darf eine Temperatur von 26 °C / 78,8 °F nicht überschritten werden.

Setzen Sie die einzelnen Kit-Komponenten niemals höheren Temperaturen als 37 °C / 98,6 °F aus.

Die Substrat-Lösung immer mit verkaufsneuen Pipettenspitzen pipettieren, um Kontaminationen zu vermeiden. Intensiven Lichtkontakt der Substratlösung vermeiden. Konjugat-Lösung niemals mit Pipettenspitzen pipettieren, welche mit anderen Reagenzien kontaminiert sind.

Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht alleine auf den Ergebnissen des durchgeführten Tests erfolgen, sondern vom Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde erstellt werden. Die Diagnose sollte unbedingt mit verschiedenen diagnostischen Methoden bestätigt werden.

6 Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung

Die Verwendung frischer Serumproben wird empfohlen. Die Blutentnahme hat nach der nationalen Rechtslage zu erfolgen. Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Serumproben nicht verwenden. Bei trüben Proben die Partikel niedrig abzentrifugieren ($<1000 \times g$). Blutproben in saubere, trockene und leere Röhrchen aufnehmen.

Nach der Gewinnung sollten Serenproben innerhalb von 8h verwendet werden, bzw. verschlossen für 48h bei $2 - 8^{\circ}\text{C}$ / $35,6 - 46,4^{\circ}\text{F}$ aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt sollten die Proben -20°C / -4°F tiefgefroren werden.

Plasma-Proben dürfen in diesem Test nicht benutzt werden!

7 Testdurchführung

7.1 Vorbereitung

Verdünnung konzentrierter Reagenzien:

Konzentrierten Probenpuffer 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnen, z.B. 20 ml + 80 ml.

Konzentrierten Waschpuffer 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnen, z.B. 20 ml + 980 ml.

Um Fehler zu vermeiden empfehlen wir die Deckel der Kalibratoren und Kontrollen zu kennzeichnen.

Verdünnung der Patientenproben:

Serumproben **1:10** mit verdünntem Probenpuffer (1x) verdünnen und mischen, z.B. 450 μl Probenpuffer + 50 μl Serum.

Waschen:

Es werden 20 ml verdünnten Waschpuffers (1x) pro 8 Kavitäten oder 200 ml pro 96 Kavitäten benötigt, z.B. 4 ml Konzentrat plus 196 ml destilliertes Wasser.

Automatisiertes Waschen:

Für die Inbetriebnahme des Instrumentes und das Totvolumen sind zusätzliche Waschpuffermengen zu berücksichtigen.

Manuelles Waschen:

Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf Filterpapier entfernen. 300 μl verdünnten Waschpuffer in jede Kavität pipettieren, 20 Sekunden warten. Den Vorgang noch zweimal wiederholen.

Mikrotiterplatte:

Unbenutzte Kavitäten entfernen und fest verschlossen in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel kühl lagern ($2 - 8^{\circ}\text{C}$ / $35,6 - 46,4^{\circ}\text{F}$).

7.2 Pipettierschema

Wir empfehlen, die Kalibratoren, Kontrollen und Proben wie folgt zu pipettieren:

	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	...	
H	Cal D	NC	...	

Cal A: Kalibrator A

Cal B: Kalibrator B

Cal C: Kalibrator C

Cal D: Kalibrator D

Cal E: Kalibrator E

Cal F: Kalibrator F

PC: Positiv-Kontrolle

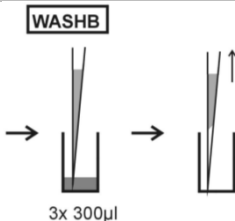
NC: Negativ-Kontrolle

P1: Patient 1

P2: Patient 2

P3: Patient 3

7.3 Arbeitsschritte

Schritt	Beschreibung
1.	Stellen Sie sicher, dass die Vorbereitungen aus Kapitel 7.1 vor Beginn durchgeführt worden sind.
2.	Verwenden Sie die folgenden Schritte entsprechend der beabsichtigten quantitativen Interpretation der Ergebnisse.
Kalibratoren, Kontrollen & Proben	
3.	 Pipettieren Sie jeweils 100 µl in die vorgesehenen Kavitäten entsprechend Kapitel 7.2: • Kalibratoren (Cal A bis Cal F) • Negativ Kontrolle (NC) und Positiv Kontrolle (PC) und • Verdünnte Patienten Proben (P1, P2,...)
4.	 30 Minuten bei 20 - 26 °C / 68 - 78,8 °F inkubieren.
5.	 3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.



KONJUGAT

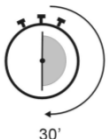
6.

CONJ



100 µl Enzymkonjugatlösung in jede Kavität geben.

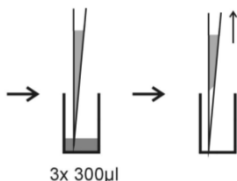
7.



30 Minuten bei 20 - 26 °C / 68 - 78,8 °F inkubieren.

8.

WASHB



3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.

SUBSTRAT

9.

SUB



100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.

10.

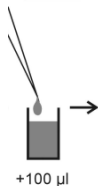


30 Minuten bei 20 - 26 °C / 68 - 78,8 °F inkubieren, vor intensiver Lichteinstrahlung schützen.

STOP

11.

STOP



100 µl Stopplösung pro Kavität in der Reihenfolge der Substratzugabe pipettieren.

12.

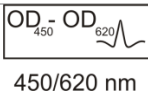


Mindestens 5 Minuten inkubieren.

13.

Platte vorsichtig 5 Sekunden schütteln.

14.



Optische Dichte bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten messen (empfehlenswert bei 450/620 nm).

8 Quantitative Auswertung

Die **quantitative Auswertung** erfolgt anhand einer Standardkurve, bei der die optische Dichte der Kalibratoren (y-Achse) gegen die Konzentration in ng/ml (x-Achse) aufgetragen wird. Eine log/lin Auftragung und ein 4-Parameter-Fit wird zur Auswertung empfohlen. Anhand der Kurve wird aus der optischen Dichte der Probe die MMP-3-Konzentration in ng/ml ermittelt.

AESKULISA® MMP-3	Normalbereich	Grenzwertig	Positiv
Frauen	0 – 20 ng/ml	20 – 30 ng/ml	> 30 ng/ml
Männer	0 – 40 ng/ml	40 – 50 ng/ml	> 50 ng/ml

Auswertungsbeispiel

Dieses Beispiel darf nicht zur Interpretation der Patientenresultate benutzt werden !

Kalibratoren MMP-3	OD 450/620 nm	CV % (Varianz)
0 ng/ml	0,033	2,2
5 ng/ml	0,105	4,0
20 ng/ml	0,336	1,7
50 ng/ml	0,727	1,2
100 ng/ml	1,328	1,6
200 ng/ml	2,228	3,7

Berechnungsbeispiel

Patient	Replikat (OD)	Mittelwert (OD)	Ergebnis (ng/ml)
P 01	0,264/0,258	0,261	17,2
P 02	1,323/1,326	1,325	97,5

Proben die über dem höchsten Kalibratorwert liegen sollten als >Max berichtet werden. Sie sollten entsprechend verdünnt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors neu bewertet werden. Proben niedriger als der Meßbereich sollten als <Min berichtet werden.

Chargen spezifische Daten entnehmen Sie bitte dem beiliegenden Kontrollzertifikat. Medizinische Laboratorien sollten In-house Qualitätskontrollen mit eigenen Kontrollen und/oder Poolseren nach nationalem Reglement durchführen.

Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

Sollten die Werte der Kontrollen nicht die Validierungskriterien erfüllen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Die folgenden technischen Fakten sollten überprüft werden: Haltbarkeitsdaten der Reagenzien, Lagerbedingungen, Pipetten, verwendete Geräte, Photometer, Inkubationsbedingungen und Waschmethode.

Sollten die getesteten Proben ungewöhnliche Werte oder Abweichungen zeigen, oder werden die Validierungskriterien aus unerfindlichen Gründen nicht erfüllt kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits.

9 Technische Daten

Probenmaterial:	Serum
Probenvolumen:	100 µl einer 1:10 Probenverdünnung mit 1x Probenpuffer
Gesamt-Inkubationszeit:	90 Minuten bei 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F
Messbereich:	0-200 ng/ml
Analytische Sensitivität:	5 ng/ml
Lagerung:	bei 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F in Originalflaschen.
Zahl der Bestimmungen:	96 Tests

10 Testdaten/Testcharakteristik

10.1 Analytische Sensitivität

80 maliges Testen von Probenpuffer im **AESKULISA® MMP-3** ergab einen Limit of Blank von 4 ng/ml, und das Testen von 8 Seren mit niedriger MMP-3 Konzentration in 8 facher Wiederholung ergab ein Limit of Detection von 5 ng/ml.

10.2 Spezifität

Die Mikrotiterplatten sind mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen human MMP-3 beschichtet. Kreuzreaktivitäten mit anderen Antigenen konnten nicht nachgewiesen werden.

10.3 Linearität

Für ausgewählte Seren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und Antikörperkonzentration in diesem Test ermittelt werden. Aufgrund der Heterogenität humanem Serums ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Seren ein nichtlineares Verhalten zeigen.

Proben Nr.	Verdünnung	gemessene Konzentration (ng/ml)	erwartete Konzentration (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	1 / 10	178,4	178,4	100,0
	1 / 20	86,1	89,2	96,5
	1 / 40	45,0	43,0	104,6
	1 / 80	23,2	22,5	103,0
2	1 / 10	88,8	88,8	100,0
	1 / 20	44,1	44,4	99,4
	1 / 40	22,8	22,1	103,1
	1 / 80	11,3	11,4	99,5

10.4 Präzision

Zur Kontrolle der Assaypräzision wurde mit fünf Seren in verschiedenen Bereichen der Standardkurve die Varianz (Intra- und Inter-Assay-Varianz sowie die Lot-to-Lot Varianz) ermittelt, indem die Reproduzierbarkeit in 5 Durchgängen mit je 8 Wiederholungen untersucht wurde. Die Lot-to-Lot Varianz wurde untersucht, indem fünf Seren aus 3 verschiedenen Chargen in 8 Wiederholungen untersucht wurden.

Intraassay		
Proben Nr.	Mittelwert (ng/ml)	CV (%)
1	12,6	4,9
2	30,5	3,6
3	59,3	3,2
4	101,0	3,6
5	195,1	3,4

Interassay		
Proben Nr.	Mittelwert (ng/ml)	CV (%)
1	12,6	7,6
2	30,5	4,5
3	59,3	4,5
4	101,0	4,8
5	195,1	4,6

10.5 Kalibration

Mangels eines internationalen Referenzstandards ist der **AESKULISA® MMP-3** gegen definierte Mengen von gereinigtem, rekombinantem human MMP-3 kalibriert (mittels SEC-MALS ermittelte Reinheit: >99 %). Die Ergebnisse werden in ng/ml angegeben.

10.6 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde durch die Zugabe von verschiedenen, definierten Mengen an rekombinantem human MMP-3 zu verschiedenen human Seren bestimmt. Folgende Wiederfindungsraten wurden mittels linearer Regression ermittelt:

Serum Probe	% Wiederfindung	Bestimmtheitsmaß R^2
1	101,4	0,9934
2	91,8	0,9938
3	88,5	0,9923

10.7 Klinische Auswertung

MMP-3 bei Gesunden

Zur Bestimmung des Normalbereiches wurden die MMP-3 Werte in insgesamt 156 Serumproben von Gesunden Blutspendern (46 Frauen und 110 Männern) bestimmt.

AESKULISA® MMP-3	Anzahl	Min (ng/ml)	Max (ng/ml)	Med (ng/ml)	95 Percentile
Gesunde Männer	110	8,9	56,6	25,3	41,9
Gesunde Frauen	46	5,1	32,5	14,2	29,7

Aus den ermittelten Werten werden die Normalbereiche wie folgt festgelegt:

AESKULISA® MMP-3	Normalbereich	Grenzwertig	Positive Ergebnisse
Frauen	0 - 20 ng/ml	20-30 ng/ml	>30 ng/ml
Männer	0 - 40 ng/ml	40-50 ng/ml	>50 ng/ml

MMP-3 bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen im Vergleich zur Rheumatoiden Arthritis und in Gesunden

Insgesamt 627 Serumproben (Zusammensetzung siehe Tabelle) wurden auf ihre MMP-3 Konzentration getestet. Die Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Erkrankung	Anzahl	Min (ng/ml)	Max (ng/ml)	Med (ng/ml)	Pos	Neg
Spondylarthritis	80	0,0	287,4	14,3	29 (36,3%)	51 (63,8%)
Zöliakie	15	5,9	22,8	12,6	1 (6,7%)	14 (93,3%)
Zöliakie + DH	32	8,5	142,4	28,3	19 (59,4%)	13 (40,6%)
SLE	24	14,5	200,8	46,2	22 (91,7%)	2 (8,3%)
Vaskulitis	117	5,2	283,5	47,9	97 (82,9%)	20 (17,1%)
Gesunde	156	8,9	56,6	22,0	3 (1,9%)	153 (98,1%)
Rheumatoide Arthritis	203	0,7	280,2	33,2	139 (68,5%)	64 (31,5%)

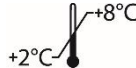
SLE = Systemischer Lupus Erythematoses, DH = Dermatitis herpetiformis

Wie in der Literatur beschrieben kommen erhöhte MMP-3 Konzentrationen bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen vor. MMP-3 ist daher nicht geeignet, um eine Rheumatoide Arthritis zu diagnostizieren. MMP-3 ist ein Marker für die Aktivität der Rheumatoiden Arthritis. Die MMP-3 Konzentrationen von RA Patienten korrelieren mit der individuellen Krankheitsaktivität.

11 Literatur

1. Y. Okada, H. Nagase, and E. D. Harris, Jr. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J.Biol.Chem.* 261 (30):14245-14255, 1986.
2. K. Obata, K. Iwata, Y. Okada, Y. Kohrin, E. Ohuchi, S. Yoshida, M. Shinmei, and T. Hayakawa. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin-1) using monoclonal antibodies. *Clin.Chim.Acta* 211 (1-2):59-72, 1992.
3. J. Martel-Pelletier, R. McCollum, N. Fujimoto, K. Obata, JM. Cloutier, JP. Pelletier. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 70 (6):807-15, 1994.
4. S. Sasaki, H. Iwata, N. Ishiguro, K. Obata, and T. Miura. Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin.Rheumatol.* 13 (2):228-233, 1994.
5. Y. Yoshihara, K. Obata, N. Fujimoto, K. Yamashita, T. Hayakawa, and M. Shimmei. Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38 (7):969-975, 1995.
6. H. Yamanaka, Y. Matsuda, M. Tanaka, W. Sendo, H. Nakajima, A. Taniguchi, and N. Kamatani. Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43 (4):852-858, 2000.
7. M. D. Posthumus, P. C. Limburg, J. Westra, M. A. Van Leeuwen, and M. H. van Rijswijk. Serum matrix metalloproteinase 3 levels during treatment with sulfasalazine or combination of methotrexate and sulfasalazine in patients with early rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 29 (5):883-889, 2002.
8. Katrib, M. D. Smith, M. J. Ahern, J. Slavotinek, L. Stafford, C. Cuello, J. V. Bertouch, H. P. McNeil, and P. P. Youssef. Reduced chemokine and matrix metalloproteinase expression in patients with rheumatoid arthritis achieving remission. *J.Rheumatol.* 30 (1):10-21, 2003.
9. Tchvetverikov, L. R. Lard, J. DeGroot, N. Verzijl, J. M. TeKoppele, F. C. Breedveld, T. W. Huizinga, and R. Hanemaaijer. Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 62 (11):1094-1099, 2003.
10. M. J. Green, A. K. Gough, J. Devlin, J. Smith, P. Astin, D. Taylor, and P. Emery. Serum MMP-3 and MMP-1 and progression of joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology.(Oxford)* 42 (1):83-88, 2003.
11. Litinsky, D. Paran, D. Levartovsky, I. Wigler, I. Kaufman, I. Yaron, M. Yaron, D. Caspi, O. Elkayam. The effects of leflunomide on clinical parameters and serum levels of IL-6, IL-10, MMP-1 and MMP-3 in patients with resistant rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 33 (2):106-10, 2006.
12. S. Visvanathan, M. U. Rahman, E. Keystone, M. Genovese, L. Klareskog, E. Hsia, M. Mack, J. Buchanan, M. Elashoff, and C. Wagner. Association of serum markers with improvement in clinical response measures after treatment with golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite receiving methotrexate: results from the GO-FORWARD study. *Arthritis Res.Ther.* 12 (6):R211, 2010.
13. Mahemara, T. Sugimoto, D. Sugiyama, S. Morinobu, G. Tsuji, S. Kawano, A. Morinobu, and S. Kumagai. Serum Matrix Metalloproteinase-3 as Predictor of Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis, Treated with Non-biological Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs. *Kobe J. Med. Sci.* 56 (3):98-107, 2010.
14. Y. Urata, R. Uesato, D. Tanaka, Y. Nakamura, and S. Motomura. Treating to target matrix metalloproteinase 3 normalisation together with disease activity score below 2.6 yields better effects than each alone in rheumatoid arthritis patients: T-4 Study. *Ann.Rheum.Dis.*, 2011.
15. N. Nishimoto, K. Amano, Y. Hirabayashi, T. Horiuchi, T. Ishii, M. Iwahashi, M. Iwamoto, H. Kohsaka, M. Kondo, T. Matsubara, T. Mimura, H. Miyahara, S. Ohta, Y. Saeki, K. Saito, H. Sano, K. Takasugi, T. Takeuchi, S. Tohma, T. Tsuru, Y. Ueki, J. Yamana, J. Hashimoto, T. Matsutani, M. Murakami, and N. Takagi. Drug free REmission/low disease activity after cessation of tocilizumab (Actemra) Monotherapy (DREAM) study. *Mod.Rheumatol.*, 2013.
16. Hiura, S. Iwaki-Egawa, T. Kawashima, S. I. Fujisawa, T. Takeda, H. Komori, and Y. Watanabe. The diagnostic utility of matrix metalloproteinase-3 and high-sensitivity C-reactive protein for predicting rheumatoid arthritis in anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative patients with recent-onset undifferentiated arthritis. *Rheumatol.Int.*, 2013.

12 Regulatorische Symbole

IVD	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
REF	- Numero d'ordine - Référence Catalogue - Bestellnummer - Número de catálogo	- Catalogue number - Número de catálogo - Αριθμός παραγγελίας
LOT	- Descrizione lotto - Lot - Chargen Bezeichnung - Lote	- Lot - Lote - Χαρακτηρισμός παρτίδας
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo - Identifiant unique de l'appareil - eindeutige Produktidentifizierung - Identificador único do dispositivo	- Unique Device Identifier - Identificador único del dispositivo - Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
CE	- Conformità europea - Déclaration CE de Conformité - Europäische Konformität - Declaração CE de Conformidade	- EC Declaration of Conformity - Declaración CE de Conformidad - Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- 96 determinazioni - 96 tests - 96 Bestimmungen - 96 Testes	- 96 tests - 96 pruebas - 96 προσδιορισμοί
	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso - Voir les instructions d'utilisation électronique - Elektronische Gebrauchsanweisung beachten - Seguir as instruções electrónicas de utilização	- See electronic instructions for use - Sigla las instrucciones electrónicas de uso - Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Da utilizzarsi entro - Utiliser avant le - Verwendbar bis - Utilizar antes de	- Use by - Utilizar antes de - Χρήση μέχρι
	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F) - Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F) - Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Prodotto da - Fabriqué par - Hergestellt von - Fabricado por	- Manufactured by - Fabricado por - Κατασκευάζεται από
CO-CAL	- Calibratore cut-off - Etalon Seuil - Grenzwert Kalibrator - Calibrador de cut-off	- Cut off Calibrator - Calibrador de cut-off - Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
CON +	- Controllo positivo - Contrôle Positif - Positiv Kontrolle - Controllo positivo	- Positive Control - Control Positivo - Θετικός ορός ελέγχου
CON -	- Controllo negativo - Contrôle Négatif - Negativ Kontrolle - Controllo negativo	- Negative Control - Control Negativo - Αρνητικός ορός ελέγχου
CAL	- Calibratore - Etalon - Kalibrator - Calibrador	- Calibrator - Calibrador - Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
CONJ	- Coniugato - Conjugué - Konjugat - Conjugado	- Conjugate - Conjugado - Σύζευγμα
MP	- Micropiastre rivestita - Microplaque sensibilisée - Beschichtete Mikrotiterplatte - Microplaca revestida	- Coated microtiter plate - Microplaca sensibilizada - Επικαλυμμένη μικροπλάκα
WASHB 50x	- Tampone di lavaggio - Tampon de Lavage - Waschpuffer - Solução de lavagem	- Wash buffer - Solución de lavado - Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
SUB	- Tampone substrato - Substrat - Substratpuffer - Substrato	- Substrate buffer - Tampón sustrato - Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP	- Reagente bloccante - Solution d'Arrêt - Stopreagenz - Solução de paragem	- Stop solution - Solución de parada - Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
SB 5x	- Tampone campione - Tampon Echantillons - Probenpuffer - Diluente de amostra	- Sample buffer - Tampón Muestras - Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων