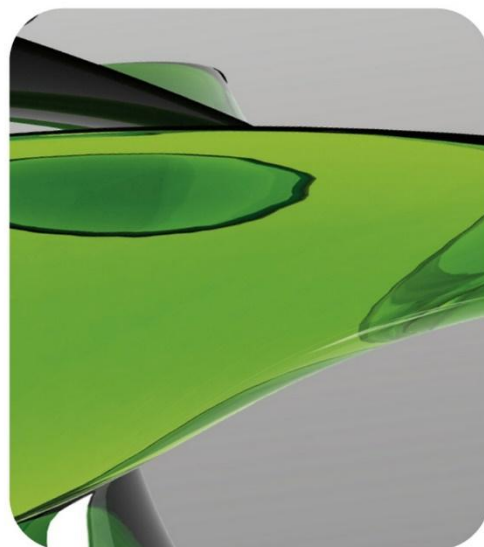




**AESKU.DIAGNOSTICS**  
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



**AESKULISA®**

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

# INSTRUCTION MANUAL

**AESKULISA® MMP-3**

Ref 3168





# Istruzioni per l'uso

## Indice

|    |                                                             |    |
|----|-------------------------------------------------------------|----|
| 1  | Destinazione d'uso.....                                     | 1  |
| 2  | Applicazione clinica e principio del test .....             | 1  |
| 3  | Componenti del KIT .....                                    | 2  |
| 4  | Immagazzinamento e durata di conservazione .....            | 2  |
| 5  | Avvertenze e precauzioni.....                               | 3  |
| 6  | Prelievo del campione, preparazione e immagazzinamento..... | 4  |
| 7  | Svolgimento del test.....                                   | 4  |
| 8  | Valutazione quantitativa.....                               | 7  |
| 9  | Dati tecnici .....                                          | 8  |
| 10 | Dati dei test/Caratteristica dei test.....                  | 8  |
| 11 | Bibliografia.....                                           | 11 |
| 12 | Simboli normativi .....                                     | 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](http://www.aesku.com)  
Mail: [info@aesku.com](mailto:info@aesku.com)

## 1 Destinazione d'uso

**AESKULISA® MMP-3** è un dosaggio immunoenzimatico in fase solida che utilizza due diversi anticorpi monoclonali anti-MMP-3 umana per la determinazione quantitativa della concentrazione di MMP-3 nel siero umano. I risultati sono indicati in ng/ml. Il range della curva standard è 0-200 ng/ml.

Questo test serve alla diagnosi dell'artrite reumatoide (AR).

## 2 Applicazione clinica e principio del test

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata innanzitutto da infiammazioni delle articolazioni, che causa la perdita di funzionalità articolare e gravi disabilità, se non se ne arresta precocemente la progressione. **AESKULISA® MMP-3** aiuta a identificare i pazienti affetti da AR, i quali traggono vantaggi dal precoce inizio di una terapia farmacologica aggressiva. Inoltre **AESKULISA® MMP-3** viene utilizzato per controllare e monitorare l'efficacia della terapia.

La metalloproteinasi di matrice 3 (MMP-3, stromelisin-1) appartiene alla famiglia delle metalloproteinasi. Essa viene espressa principalmente dalle cellule dei tessuti connettivi e svolge un ruolo importante nei processi di reazione della matrice extracellulare (ECM). La MMP-3 può scomporre molti componenti della ECM come per esempio proteoglicani, fibronectina, laminina e diversi altri collagene. A causa della vasta gamma di substrati e della capacità di attivare altri enzimi degradanti, incluse altre metalloproteinasi di matrice, la MMP-3 svolge un ruolo chiave nei processi fisiologici e patologici della modifica dei tessuti.

La MMP-3 viene secreta in forma inattiva (pro-MMP-3, 52 kDa) e attivata per proteolisi limitata da endopeptidasi. La MMP-3 attiva (45 kDa e 35 kDa) può essere inibita mediante legame a inibitori tissutali di metalloproteinasi di matrice (TIMP) oppure  $\alpha 2$  macroglobulina. La regolazione dell'attività della MMP-3 è necessaria per evitare la distruzione della ECM e conservare l'equilibrio fisiologico nei processi di modifica dei tessuti. Conformemente a ciò in vari stati patologici, come per esempio tumori, aterosclerosi e artrite, è possibile trovare elevate concentrazioni di MMP-3.

È stato dimostrato che la concentrazione sierica di MMP-3 in pazienti affetti da AR è significativamente elevata se comparata a soggetti di controllo. In seguito alla forte infiammazione e proliferazione di tessuti sinoviali in pazienti affetti da AR aumenta l'espressione e la secrezione di MMP-3 nel liquido sinoviale. La quantità di MMP-3 nel liquido sinoviale è correlata con la concentrazione di MMP-3 nel siero. La MMP-3 sierica riflette così il processo di infiammazione nelle articolazioni interessate ed è un marcatore della patologia in atto. Persino nello stadio iniziale della malattia i processi degenerativi nelle articolazioni dei pazienti affetti da AR possono essere correlati e pronosticati sulla base di elevate concentrazioni di MMP-3.

**AESKULISA® MMP-3** misura la MMP-3 complessiva (MMP-3 pro e attiva) nel siero umano ed è uno strumento per valutare il rischio di sviluppare degenerazioni articolari e per controllare l'attività della malattia e l'efficacia della terapia in pazienti affetti da artrite reumatoide.

### Principio del test

I campioni di siero diluiti **1:10** vengono incubati in pozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale MMP-3 anti-umano. In questo processo la MMP-3 del siero del paziente si lega agli anticorpi sulla piastra; i componenti del siero non legati vengono lavati via nella successiva fase di lavaggio. Infine viene aggiunto un anticorpo monoclonale MMP-3 anti-umano marcato con perossidasi di rafano (coniugato). Durante l'incubazione questo si lega al complesso MMP3-anticorpo formatosi precedentemente. Il coniugato non legato viene rimosso nella fase di lavaggio successiva. Il legame di MMP-3 viene dimostrato da una reazione cromatica enzimatica (blu) del substrato che viene bloccato con un acido diluito (il colore vira verso il giallo). L'intensità del colore del cromogeno dipende dalla quantità di coniugato legata al complesso MMP-3-anticorpo e quindi è direttamente proporzionale alla concentrazione di MMP-3 nel siero.

### 3 Componenti del KIT

| <i>Diluire prima dell'uso</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |                  |                        |                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Componente del kit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Quantità                | Colore del tappo | Colore della soluzione | Descrizione / Contenuto                                                                                                          |
| 5 tamponi campione                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1 x 20 ml               | bianco           | giallo                 | Tris, NaCl, BSA, azoturo di sodio < 0,1% (conservante) concentrato 5 volte                                                       |
| 50 tamponi di lavaggio                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1 x 20 ml               | bianco           | verde                  | Tris, NaCl, Tween 20, azoturo di sodio < 0,1% (conservante) concentrato 50 volte                                                 |
| <i>Pronto all'uso:</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                         |                  |                        |                                                                                                                                  |
| Componente del kit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Quantità                | Colore del tappo | Colore della soluzione | Descrizione / Contenuto                                                                                                          |
| Controllo negativo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1 x 1,5 ml              | verde            | incolore               | BSA, azoturo di sodio < 0,1% (conservante)                                                                                       |
| Controllo positivo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1 x 1,5 ml              | rosso            | giallo                 | MMP-3 umano purificato, BSA, azoturo di sodio < 0,1% (conservante)                                                               |
| Calibratori                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 6 x 1,5 ml              | bianco           | giallo                 | Concentrazione dei calibratori: 0, 5, 20, 50, 100, 200 ng/ml. MMP-3 umano purificato, BSA, azoturo di sodio < 0,1% (conservante) |
| Coniugato                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1 x 15 ml               | blu              | blu                    | MMP-3 antiumano marcato con perossidasi di rafano, BSA                                                                           |
| substrato di TMB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1 x 15 ml               | nero             | incolore               | TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stabilizzato                                                                                   |
| Soluzione bloccante                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1 x 15 ml               | bianco           | incolore               | 1M di acido cloridrico                                                                                                           |
| Micropozzetti rivestiti                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 12 strisce x 8 pozzetti | Non pertinente   | Non pertinente         | Fragile Per il rivestimento vedi punto 1.                                                                                        |
| *intensità cromatica crescente con concentrazione                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |                  |                        |                                                                                                                                  |
| <i>Materiali necessari, non contenuti nel kit:</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                  |                        |                                                                                                                                  |
| Spettrofotometro per micropiastre con filtri ottici per 450 nm, in opzione con lunghezza d'onda di riferimento di 620 nm (600-690 nm). Vetreria (cilindri graduati da 100-1000 ml), tubi per diluizioni, agitatore Vortex, micropipette (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o pipetta multipla regolabile. Unità di lavaggio per micropiastre (pipetta multipla da 300 µl o pipetta multicanale o sistema di lavaggio automatico), carta di filtraggio. I nostri test sono stati sviluppati per utilizzo con acqua purificata (purified water) secondo la definizione della farmacopea U.S. (USP 26 - NF 21) ed europea (Eur. Ph. IV ed.). |                         |                  |                        |                                                                                                                                  |

### 4 Immagazzinamento e durata di conservazione

I reagenti del kit e la micropiastro devono essere immagazzinati a 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F nei contenitori originali. Le soluzioni diluite possono essere conservate a 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F per un mese. Devono essere rispettate le date di scadenza indicate sulla confezione e sulle etichette dei singoli componenti. Non utilizzare componenti scaduti! Evitare la forte esposizione alla luce della soluzione di substrato TMB. Conservare sempre le micropiastre chiuse nella pellicola della confezione con una bustina di materiale igroscopico.

## 5 Avvertenze e precauzioni

### 5.1 Rischi per la salute

**Il presente prodotto può essere utilizzato esclusivamente per DIAGNOSTICA IN VITRO.**

L'uso è riservato a personale istruito e specializzato nell'utilizzo di prodotti diagnostici in vitro. I reagenti contenuti in questo prodotto, se usati in modo consono alle direttive, non sono classificati come tossici né pericolosi per la salute. Tuttavia per garantire la massima sicurezza dell'utilizzatore devono essere rispettate le seguenti indicazioni:

#### **Raccomandazioni e precauzioni**

I singoli componenti del kit contengono reagenti potenzialmente pericolosi che possono causare irritazione agli occhi e alla pelle.

**ATTENZIONE:** Calibratori, controlli e tamponi contengono azoturo di sodio ( $\text{NaN}_3$ ) quale conservante.  $\text{NaN}_3$  può risultare tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi.  $\text{NaN}_3$  combinato con piombo o tubi di rame può formare azoturi di metallo altamente esplosivi. Per evitare concentrazioni di azoturo, smaltire queste soluzioni insieme ad abbondante acqua. Rispettare le norme locali/nazionali riguardanti la decontaminazione.

**Non mangiare, bere o fumare mentre si lavora con il kit. Non pipettare con la bocca, indossare guanti monouso.**

I reagenti di origine umana contenuti in questo prodotto (controlli e calibratori) sono risultati negativi all'esame dell'antigene superficiale di epatite B (HbsAg), epatite C e HIV 1 e 2. Per i prodotti di origine umana non si può tuttavia mai escludere con sicurezza che non contengano i suddetti o altri agenti patogeni oppure eventuali agenti patogeni non ancora conosciuti o diagnosticati. Per questa ragione i controlli, i calibratori e i sieri dei pazienti devono essere classificati come potenzialmente infetti e devono quindi essere manipolati conformemente alle norme di legge nazionali. Il prodotto contiene componenti di origine animale come indicato nella tabella dei componenti: Nell'uso devono essere rispettate le direttive nazionali.

### 5.2 Avvertenze generali

Nel caso in cui le informazioni sul prodotto, inclusa l'etichettatura, fossero errate o inesatte, vi invitiamo a contattare il produttore o il fornitore del kit.

Evitare di scambiare singoli controlli, calibratori e coniugati o micropiastre di lotti diversi. Questa operazione può falsare i risultati della misurazione.

Portare tutti i componenti del kit a temperatura ambiente (20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F) e miscelarli bene prima di iniziare il test. Rispettare scrupolosamente il protocollo prescritto per l'esecuzione del test.

**Incubazione: durante un'analisi (anche con apparecchi automatici) non superare la temperatura di 26 °C / 78,8 °F.**

Non esporre mai i singoli componenti del kit a temperature superiori a 37 °C / 98,6 °F.

Pipettare sempre la soluzione del substrato con puntali nuovi, per evitare contaminazioni. Evitare che la soluzione del substrato venga a contatto con luce intensa. Non pipettare mai la soluzione del coniugato con puntali contaminati con altri reagenti.

**Una diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi esclusivamente sui risultati del test eseguito, ma deve essere formulata da un medico tenendo in considerazione tutti i referti clinici e di laboratorio. Ogni diagnosi deve assolutamente essere confermata con vari metodi diagnostici.**

## 6 Prelievo del campione, preparazione e immagazzinamento

Si consiglia l'uso di campioni di siero freschi. Il prelievo di sangue deve essere effettuato nel rispetto delle disposizioni di legge nazionali. Non usare campioni di siero che presentino contaminazione itterica, lipemica, emolitica o batterica. In caso di campioni torbidi centrifugare per portare le particelle sul fondo della provetta (<1000 x g). Conservare i campioni di sangue in provette pulite, asciutte e vuote.

I campioni del siero devono essere utilizzati entro 8h dal prelievo oppure essere conservati per 48h a 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F. Per conservare i campioni più a lungo occorre congelarli a - 20 °C / - 4 °F.

**In questo test non devono essere utilizzati campioni di plasma.**

## 7 Svolgimento del test

### 7.1 Preparazione

#### **Diluizione dei reagenti concentrati:**

Diluire il tampone concentrato 1:5 con acqua distillata,  
per esempio 20 ml + 80 ml.

Diluire il tampone di lavaggio concentrato 1:50 con acqua distillata,  
per esempio 20 ml + 980 ml.

Per evitare errori consigliamo di contrassegnare i tappi dei calibratori e dei controlli.

#### **Diluizione dei campioni dei pazienti:**

Diluire i campioni di siero **1:10** con tamponi (1x) diluiti e mescolare,  
per esempio 450 µl di tampone + 50 µl di siero.

#### **Lavaggio:**

Sono necessari tamponi di lavaggio diluiti da 20 ml (1x) ogni 8 pozzetti o 200 ml ogni 96 pozzetti,  
ad esempio 4 ml di concentrato più 196 ml di acqua distillata.

#### **Lavaggio automatizzato:**

Per la messa in funzione dello strumento e il volume morto devono essere tenute in considerazione ulteriori quantità di tamponi di lavaggio.

#### **Lavaggio manuale:**

Rimuovere attentamente il liquido battendo la piastra su carta di filtraggio. Pipettare 300 µl di tampone di lavaggio diluito in ogni pozzetto, attendere 20 secondi. Ripetere l'operazione ancora due volte.

#### **Micropiastre:**

Rimuovere i pozzetti inutilizzati e conservarli ben chiusi nella pellicola della confezione con una bustina di materiale igroscopico (2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F).

## 7.2 Schema di pipettamento

Consigliamo di pipettare calibratori, controlli e campioni nel modo seguente:

|   | 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 | CN    | ... |      |
| H | Cal D | CN    | ... |      |

Cal A: Calibratore A

Cal B: Calibratore B

Cal C: Calibratore C

Cal D: Calibratore D

Cal E: Calibratore E

Cal F: Calibratore F

CP: Controllo positivo

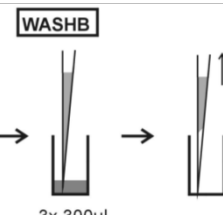
CN: Controllo negativo

P1: Paziente 1

P2: Paziente 2

P3: Paziente 3

## 7.3 Fasi di lavoro

| Fase                              | Descrizione                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.                                | Prima di procedere assicurarsi che i preparativi di cui al capitolo 7.1 siano stati effettuati.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2.                                | Utilizzare i seguenti passaggi secondo l'interpretazione quantitativa voluta dei risultati.                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Calibratori, controlli e campioni |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 3.                                |  <p>Pipettare 100 µl in ciascun pozzetto previsto conformemente alle indicazioni del capitolo 7.2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• calibratori (Cal A fino a Cal F)</li> <li>• Controllo negativo (CN) e controllo positivo (CP) e</li> <li>• campioni di pazienti diluiti (P1, P2,...)</li> </ul> |
| 4.                                |  <p>Incubare per 30 minuti a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F.</p>                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 5.                                |  <p>Lavare 3 volte, ciascuna con 300 µl di tampone diluito a 1:50</p>                                                                                                                                                                                                                                           |

### CONIUGATO

6.

**CONJ**



Inserire 100 µl di soluzione di coniugato enzimatico in ogni pozzetto.

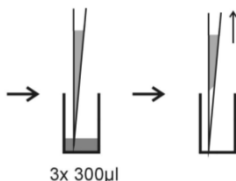
7.



Incubare per 30 minuti a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F.

8.

**WASHB**



Lavare 3 volte, ciascuna con 300 µl di tampone diluito a 1:50

### SUBSTRATO

9.

**SUB**



Pipettare 100 µl di soluzione di substrato TMB in ogni pozzetto.

10.

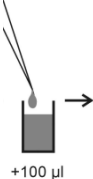


Incubare per 30 minuti a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F, proteggere dalla luce diretta intensa.

### STOP

11.

**STOP**



Pipettare 100 µl di soluzione bloccante per ogni pozzetto nella sequenza di aggiunta del substrato.

12.

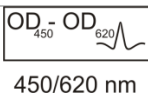


Incubare almeno 5 minuti.

13.

Scuotere la piastra con cautela per 5 secondi.

14.



Misurare la densità ottica a 450 nm entro 30 minuti (si consiglia a 450/620 nm).

## 8 Valutazione quantitativa

La **valutazione quantitativa** viene effettuata sulla base di una curva standard, in cui viene tracciata la densità ottica dei calibratori (asse y) rispetto alla concentrazione in ng/ml (asse x). Per la valutazione si consiglia il metodo log/lin 4-parameter-fit. Sulla base della curva, la concentrazione di MMP-3 viene rilevata dalla densità ottica del campione in ng/ml.

| AESKULISA® MMP-3 | Intervallo di normalità | Valore limite | Positivo   |
|------------------|-------------------------|---------------|------------|
| Donne            | 0 – 20 ng/ml            | 20 – 30 ng/ml | > 30 ng/ml |
| Uomini           | 0 – 40 ng/ml            | 40 – 50 ng/ml | > 50 ng/ml |

### Esempio di analisi

**Questo esempio non deve essere utilizzato per interpretare i risultati dei pazienti.**

| Calibratori MMP-3 | OD 450/620 nm | CV % (Varianza) |
|-------------------|---------------|-----------------|
| 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             |

### Esempio di calcolo

| Paziente | Replica (OD) | Valore medio (OD) | Risultato (ng/ml) |
|----------|--------------|-------------------|-------------------|
| P 01     | 0,264/0,258  | 0,261             | 17,2              |
| P 02     | 1,323/1,326  | 1,325             | 97,5              |

I campioni che superano il valore massimo del calibratore dovrebbero essere riportati come >max e dovrebbero essere opportunamente diluiti e rianalizzati tenendo in considerazione il fattore di diluizione. I campioni inferiori al campo di misurazione dovrebbero essere riportati come <min.

I dati specifici dei lotti sono riportati sul certificato di controllo accluso. I laboratori medici dovrebbero eseguire i controlli interni di qualità con controlli propri e/o pool di sieri secondo le norme nazionali.

Si consiglia che ogni laboratorio elabori propri valori normali basandosi su una propria tecnica, propri controlli, propria attrezzatura e popolazione di pazienti.

Se i valori dei controlli non soddisfano i criteri di validazione, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Controllare le seguenti condizioni tecniche: i dati di conservabilità dei reagenti, le condizioni di immagazzinaggio, le pipette, gli apparecchi utilizzati, i fotometri, le condizioni di incubazione e i metodi di lavaggio.

Se i campioni testati mostrano valori inusuali o differenze, oppure se i criteri di validazione per ragioni inspiegabili non vengono soddisfatti vi invitiamo a contattare il produttore oppure i fornitori del kit.

## 9 Dati tecnici

|                                   |                                                        |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Materiale dei campioni:           | Siero                                                  |
| Volumi dei campioni:              | 100 µl di campione diluito 1:10 con 1 tampone campione |
| Tempo complessivo di incubazione: | 90 minuti a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F                  |
| Campo di misurazione:             | 0-200 ng/ml                                            |
| Sensibilità analitica:            | 5 ng/ml                                                |
| Conservazione:                    | a 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F nei flaconi originali.     |
| Numero delle determinazioni:      | 96 test                                                |

## 10 Dati dei test/Caratteristica dei test

### 10.1 Sensibilità analitica

Da test eseguiti 80 volte su tampone campione in **AESKULISA® MMP-3** è risultato un limit of blank di 4 ng/ml, e dal test di 8 sieri con bassa concentrazione di MMP-3, ripetuto 8 volte, è risultato un limit of detection di 5 ng/ml.

### 10.2 Specificità

Le micropiastre sono rivestite con anticorpi monoclonali murini contro MMP-3 umano. Attività incrociate con altri antigeni non hanno potuto essere dimostrate.

### 10.3 Linearità

Per i sieri selezionati in questo test è stato rilevato un rapporto lineare fra diluizione e concentrazione di anticorpi. A causa dell'eterogeneità del siero umano non è tuttavia possibile escludere che singoli sieri presentino un comportamento non lineare.

| N° campioni | Diluizione | Concentrazione misurata (ng/ml) | Concentrazione attesa (ng/ml) | Recupero (%) |
|-------------|------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------|
| 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 Ripetibilità

Per il controllo di ripetibilità del saggio è stata rilevata la varianza (varianza intra-saggio e inter-saggio nonché varianza lot-to-lot) con cinque sieri in diversi campi della curva standard, in cui è stata analizzata la riproducibilità in 5 passaggi ognuno con 8 ripetizioni. La varianza lot-to-lot è stata studiata analizzando cinque sieri da 3 lotti diversi in 8 ripetizioni.

| Intra-test  |                      |        |
|-------------|----------------------|--------|
| N° campioni | Valore medio (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    |

| Inter-test  |                      |        |
|-------------|----------------------|--------|
| N° campioni | Valore medio (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 Calibrazione

In mancanza di uno standard internazionale di riferimento **AESKULISA® MMP-3** è calibrato su quantità definite di MMP-3 umano ricombinante purificato (purezza rilevata mediante SEC-MALS: >99 %). I risultati sono indicati in ng/ml.

## 10.6 Recupero

Il recupero è stato determinato aggiungendo diverse quantità definite di MMP-3 umano ricombinante a sieri umani. Le seguenti percentuali di recupero sono state rilevate mediante regressione lineare:

| Campione di siero | % di recupero | Coefficiente di determinatezza R <sup>2</sup> |
|-------------------|---------------|-----------------------------------------------|
| 1                 | 101,4         | 0,9934                                        |
| 2                 | 91,8          | 0,9938                                        |
| 3                 | 88,5          | 0,9923                                        |

## 10.7 Valutazione clinica

### MMP-3 in donatori sani

Per determinare il campo normale sono stati determinati complessivamente i valori MMP-3 in 156 campioni di siero di donatori di sangue sani (46 donne e 110 uomini).

| AESKULISA® MMP-3 | Numero | Min (ng/ml) | Max (ng/ml) | Med (ng/ml) | 95° percentile |
|------------------|--------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Uomini sani      | 110    | 8,9         | 56,6        | 25,3        | 41,9           |
| Donne sane       | 46     | 5,1         | 32,5        | 14,2        | 29,7           |

Dai valori rilevati gli intervalli di normalità vengono determinati come segue:

| <b>AESKULISA® MMP-3</b> | <b>Intervallo di normalità</b> | <b>Valore limite</b> | <b>Risultati positivi</b> |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Donne                   | 0 – 20 ng/ml                   | 20-30 ng/ml          | >30 ng/ml                 |
| Uomini                  | 0 – 40 ng/ml                   | 40-50 ng/ml          | >50 ng/ml                 |

### **MMP-3 in varie patologie autoimmuni rispetto all'artrite reumatoide e in campioni sani**

Complessivamente la concentrazione di MMP-3 è stata verificata su 627 campioni di siero (per la composizione vedere la tabella). La tabella riassume i risultati:

| <b>Patologia</b>   | <b>Numero</b> | <b>Min (ng/ml)</b> | <b>Max (ng/ml)</b> | <b>Med (ng/ml)</b> | <b>Pos</b>  | <b>Neg</b>  |
|--------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|
| Spondiloartrite    | 80            | 0,0                | 287,4              | 14,3               | 29 (36,3%)  | 51 (63,8%)  |
| Celiachia          | 15            | 5,9                | 22,8               | 12,6               | 1 (6,7%)    | 14 (93,3%)  |
| Celiachia + DE     | 32            | 8,5                | 142,4              | 28,3               | 19 (59,4%)  | 13 (40,6%)  |
| LES                | 24            | 14,5               | 200,8              | 46,2               | 22 (91,7%)  | 2 (8,3%)    |
| Vasculite          | 117           | 5,2                | 283,5              | 47,9               | 97 (82,9%)  | 20 (17,1%)  |
| Sani               | 156           | 8,9                | 56,6               | 22,0               | 3 (1,9%)    | 153 (98,1%) |
| Artrite reumatoide | 203           | 0,7                | 280,2              | 33,2               | 139 (68,5%) | 64 (31,5%)  |

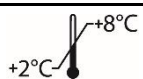
LES = Lupus eritematoso sistemico, DE = Dermatite erpetiforme

Come descritto in letteratura, elevate concentrazioni di MMP-3 sono presenti in varie malattie infiammatorie. La MMP-3 non è quindi adatta a diagnosticare l'artrite reumatoide. La MMP-3 è un marcatore dell'attività dell'artrite reumatoide. Le concentrazioni di MMP-3 in pazienti affetti da AR sono legate all'evoluzione individuale della malattia.

## 11 Bibliografia

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 Simboli normativi

|                                                                                     |                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IVD</b>                                                                          | - Diagnosi in vitro<br>- Pour diagnostic in vitro<br>- In Vitro Diagnostikum<br>- Para uso Diagnóstico in vitro                                                                                             | - For in vitro diagnostic use<br>- Para uso diagnóstico in vitro<br>- In Vitro Διαγνωστικό μέσο                                        |
| <b>REF</b>                                                                          | - Numero d'ordine<br>- Référence Catalogue<br>- Bestellnummer<br>- Número de catálogo                                                                                                                       | - Catalogue number<br>- Número de catálogo<br>- Αριθμός παραγγελίας                                                                    |
| <b>LOT</b>                                                                          | - Descrizione lotto<br>- Lot<br>- Chargen Bezeichnung<br>- Lote                                                                                                                                             | - Lot<br>- Lote<br>- Χαρακτηρισμός παρτίδας                                                                                            |
| <b>UDI</b>                                                                          | - Identificatore univoco del dispositivo<br>- Identifiant unique de l'appareil<br>- eindeutige Produktidentifizierung<br>- Identificador único do dispositivo                                               | - Unique Device Identifier<br>- Identificador único del dispositivo<br>- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής                               |
| <b>CE</b>                                                                           | - Conformità europea<br>- Déclaration CE de Conformité<br>- Europäische Konformität<br>- Declaração CE de Conformidade                                                                                      | - EC Declaration of Conformity<br>- Declaración CE de Conformidad<br>- Ευρωπαϊκή συμφωνία                                              |
|    | - 96 determinazioni<br>- 96 tests<br>- 96 Bestimmungen<br>- 96 Testes                                                                                                                                       | - 96 tests<br>- 96 pruebas<br>- 96 προσδιορισμοί                                                                                       |
|    | - Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso<br>- Voir les instructions d'utilisation électronique<br>- Elektronische Gebrauchsanweisung beachten<br>- Seguir as instruções electrónicas de utilização | - See electronic instructions for use<br>- Siga las instrucciones electrónicas de uso<br>- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης |
|   | - Da utilizzarsi entro<br>- Utilise avant le<br>- Verwendbar bis<br>- Utilizar antes de                                                                                                                     | - Use by<br>- Utilizar antes de<br>- Χρήση μέχρι                                                                                       |
|  | - Conservare a 2-8°C (35,6-46,4°F)<br>- Conserver à 2-8°C (35,6-46,4°F)<br>- Lagerung bei 2-8°C (35,6-46,4°F)<br>- Conservar entre 2-8°C (35,6-46,4°F)                                                      | - Store at 2-8°C (35,6-46,4°F)<br>- Conservar a 2-8°C (35,6-46,4°F)<br>- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35,6-46,4°F)                          |
|  | - Prodotto da<br>- Fabriqué par<br>- Hergestellt von<br>- Fabricado por                                                                                                                                     | - Manufactured by<br>- Fabricado por<br>- Κατασκευάζεται από                                                                           |
| <b>CO-CAL</b>                                                                       | - Calibratore cut-off<br>- Etalon Seuil<br>- Grenzwert Kalibrator<br>- Calibrador de cut-off                                                                                                                | - Cut off Calibrator<br>- Calibrador de cut-off<br>- Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης                                           |
| <b>CON +</b>                                                                        | - Controllo positivo<br>- Contrôle Positif<br>- Positiv Kontrolle<br>- Controllo positivo                                                                                                                   | - Positive Control<br>- Control Positivo<br>- Θετικός ορός ελέγχου                                                                     |
| <b>CON -</b>                                                                        | - Controllo negativo<br>- Contrôle Négatif<br>- Negativ Kontrolle<br>- Controllo negativo                                                                                                                   | - Negative Control<br>- Control Negativo<br>- Αρνητικός ορός ελέγχου                                                                   |
| <b>CAL</b>                                                                          | - Calibratore<br>- Etalon<br>- Kalibrator<br>- Calibrador                                                                                                                                                   | - Calibrator<br>- Calibrador<br>- Αντιδραστήριο βαθμονόμησης                                                                           |
| <b>CONJ</b>                                                                         | - Coniugato<br>- Conjugué<br>- Konjugat<br>- Conjugado                                                                                                                                                      | - Conjugate<br>- Conjugado<br>- Σύζευγμα                                                                                               |
| <b>MP</b>                                                                           | - Micropiastro rivestita<br>- Microplaque sensibilisée<br>- Beschichtete Mikrotiterplatte<br>- Microplaca revestida                                                                                         | - Coated microtiter plate<br>- Microplaca sensibilizada<br>- Επικαλυμμένη μικροπλάκα                                                   |
| <b>WASHB 50x</b>                                                                    | - Tampone di lavaggio<br>- Tampon de Lavage<br>- Waschpuffer<br>- Solução de lavagem                                                                                                                        | - Wash buffer<br>- Solución de lavado<br>- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης                                                                   |
| <b>SUB</b>                                                                          | - Tampone substrato<br>- Substrat<br>- Substratpuffer<br>- Substrato                                                                                                                                        | - Substrate buffer<br>- Tampón sustrato<br>- Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος                                                           |
| <b>STOP</b>                                                                         | - Reagente bloccante<br>- Solution d'Arrêt<br>- Stopreagenz<br>- Solução de paragem                                                                                                                         | - Stop solution<br>- Solución de parada<br>- Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης                                                         |
| <b>SB 5x</b>                                                                        | - Tampone campione<br>- Tampon Echantillons<br>- Probenpuffer<br>- Diluente de amostra                                                                                                                      | - Sample buffer<br>- Tampón Muestras<br>- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων                                                                 |