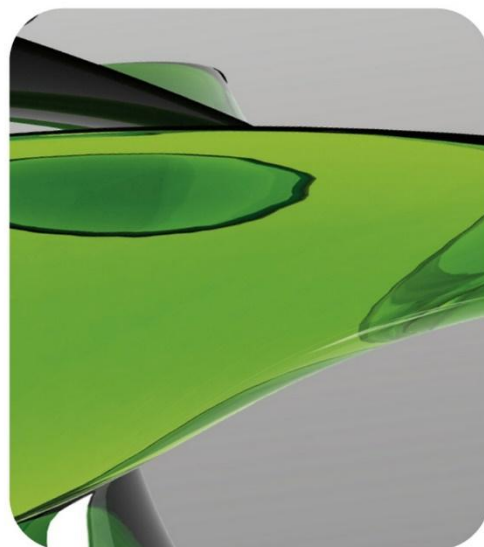




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® MMP-3

Ref 3168



Instruções de utilização

Índice

1	Finalidade	1
2	Aplicação clínica e princípio de teste	1
3	Conteúdo do kit.....	2
4	Armazenamento e estabilidade.....	2
5	Advertências e medidas de precaução	3
6	Colheita de amostras, preparação e armazenamento	4
7	Procedimento de teste	4
8	Avaliação quantitativa	7
9	Dados técnicos	8
10	Dados de teste / Características de teste.....	8
11	Bibliografia.....	11
12	Símbolos regulamentares	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 Finalidade

O **AESKULISA® MMP-3** é um ensaio imunoenzimático de fase sólida que utiliza dois anticorpos anti-MMP-3 humano monoclonais diferentes para a determinação quantitativa da concentração de MMP-3 em soro humano. Os resultados são em ng/ml. O nível padrão de curva é 0-200 ng/ml.

Os ensaios são uma ferramenta no diagnóstico de artrite reumatoide (RA).

2 Aplicação clínica e princípio de teste

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica essencialmente caracterizada pela inflamação das articulações que conduz a uma perda de funcionalidade das articulações e deficiências graves, caso a progressão da doença não seja interrompida atempadamente. O **AESKULISA® MMP-3** ajuda a identificar pacientes com AR que beneficiam de um início precoce da terapia com medicação agressiva. Além disso, o **AESKULISA® MMP-3** pode ser utilizado para o controlo e vigilância do sucesso da terapia.

A metaloproteinase de matriz-3 (MMP-3, estromelisina-1) pertence à família das metaloproteinases, sendo principalmente expressa por células do tecido conjuntivo e desempenha um papel importante nos processos metabólicos da matriz extracelular (ECM). A MMP-3 pode clivar diversos componentes da ECM, por exemplo, proteoglicanos, fibronectina, laminina e vários outros colagénios. Devido a esta grande variedade de substratos e à capacidade de ativar outras enzimas de decomposição, incluindo outras metaloproteinases de matriz, a MMP-3 desempenha um papel fundamental nos processos fisiológicos e patológicos da remodelação dos tecidos.

A MMP-3 é segregada numa forma inativa (pró-MMP-3, 52 kDa) e ativada por proteólise limitada através de endopeptidases. A MMP-3 ativa (45 kDa e 35 kDa) pode ser inibida mediante fixação a inibidores de tecidos de metaloproteinases de matriz (TIMP) ou a $\alpha 2$ -macroglobulina. A regulação da atividade da MMP-3 é necessária para evitar a destruição da ECM e obter o equilíbrio fisiológico em processos de remodelação dos tecidos. Por conseguinte, podem ser encontrados níveis elevados de concentração de MMP-3 em várias condições patológicas, tais como cancro, aterosclerose e artrite.

Demonstrou-se que a concentração de MMP-3 no soro em pacientes com AR é significativamente superior nos indivíduos de controlo saudáveis. Em resultado da inflamação e proliferação maciças do tecido sinovial em pacientes com AR, a expressão e secreção de MMP-3 são superiores no fluido sinovial. A quantidade de MMP-3 no fluido sinovial está correlacionada com a concentração de MMP-3 no soro. A MMP-3 no soro expressa assim o processo inflamatório nas articulações afetadas, sendo um marcador da atividade da doença. Mesmo na fase inicial da doença, os processos destrutivos podem ser correlacionados e previstos nas articulações de pacientes com AR e níveis elevados de MMP-3.

O **AESKULISA® MMP-3** mede o total de MMP-3 (MMP-3 pró e ativa) no soro humano, constituindo uma ferramenta de avaliação do risco de desenvolvimento da destruição das articulações e de controlo da atividade da doença e do sucesso terapêutico em pacientes com AR.

Princípio de teste

As amostras de soro diluídas **1:10** são incubadas nas cavidades, as quais são revestidas com anticorpos monoclonais contra a MMP-3 humana. Neste processo, a MMP-3 do soro do paciente fixa-se ao anticorpo na placa; as componentes do soro que não se fixam são eliminadas na fase de lavagem seguinte. Em seguida, é adicionado um anticorpo monoclonal contra a MMP-3 humana, o qual está marcado com peroxidase de rábano (conjugado). Durante a incubação, o anticorpo liga-se ao complexo MMP3-anticorpos previamente formado. O conjugado que não se fixa é removido no processo de lavagem seguinte. A deteção de MMP-3 fixada gera uma reação de cor enzimática (azul) do substrato, a qual é interrompida com ácido diluído (a cor muda para amarelo). A intensidade do desenvolvimento da cor do cromogéneo depende da quantidade de conjugado fixado ao complexo MMP-3-anticorpos sendo assim diretamente proporcional à concentração de MMP-3 no soro.

3 Conteúdo do kit

Diluir antes de usar				
Componente do kit	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição / Conteúdo
Solução da amostra 5x	1 x 20 ml	Branco	Amarelo	Concentrados 5 vezes Tris, NaCl, BSA, azida de sódio <0,1 % (conservante)
Solução de lavagem 50x	1 x 20 ml	Branco	Verde	Concentrados 50 vezes Tris, NaCl, Tween 20, azida de sódio <0,1 % (conservante)
Pronto a usar:				
Componente do kit	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição / Conteúdo
Controlo negativo	1 x 1,5 ml	Verde	Incolor	BSA, azida de sódio <0,1 % (conservante)
Controlo positivo	1 x 1,5 ml	Vermelho	Amarelo	MMP-3 purificada humana, BSA, azida de sódio <0,1 % (conservante)
Calibradores	6 x 1,5 ml	Branco	Amarelo*	Concentração dos calibradores: 0, 5, 20, 50, 100, 200 ng/ml. MMP-3 purificada humana, BSA, azida de sódio <0,1 % (conservante)
Conjugado	1 x 15 ml	Azul	Azul	Contra MMP-3 humana com marcação através de peroxidase de rábano, BSA
Substrato TMB	1 x 15 ml	Preto	Incolor	TMB estabilizado/H ₂ O ₂
Solução de interrupção	1 x 15 ml	Branco	Incolor	Ácido clorídrico 1M
Tiras de microcavidades	12 x 8 well strips	N/D	N/D	quebrável. Revestimento, ver ponto 1.
* A intensidade da cor aumenta com a concentração				
Materiais necessários, não incluídos no kit:				
Fotómetro para placas de microtitulação com filtro ótico para 450 nm, opcionalmente com comprimento de onda de referência de 620 nm (600-690 nm). Material em vidro (cilindro 100-1000 ml), tubos para diluições, misturador de vórtice, micropipetas (10, 100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipeta ajustável. Unidade de lavagem de placas de microtitulação (multipipeta de 300 µl ou pipeta multicanal ou sistema de lavagem automática), papel de filtro. Os nossos testes foram concebidos para utilização com água purificada, conforme definição dada pela Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 - NF 21) e pela Farmacopeia Europeia (Eur. Ph. 4. ^a Ed.).				

4 Armazenamento e estabilidade

O armazenamento dos reagentes do kit e da placa de microtitulação deverá ser efetuado a 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F em frascos originais. O prazo de validade das soluções diluídas é, no máximo, de um mês a uma temperatura de 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F. As datas de validade indicadas na embalagem e os rótulos dos componentes individuais terão de ser observados. Não use componentes do kit cujo prazo de validade expirou! A solução do substrato TMB deve ser protegida contra a exposição à luz. As placas de microtitulação deverão ser sempre mantidas na película de embalagem e fechadas no saco de secagem.

5 Advertências e medidas de precaução

5.1 Risco para a saúde

Este produto só pode ser utilizado para DIAGNÓSTICO IN VITRO.

A aplicação deve ser realizada por pessoal que tenha sido informado e formado relativamente ao uso de dispositivos médicos em diagnósticos in vitro. Os reagentes contidos neste produto não deverão ser considerados tóxicos nem perigosos em condições normais de utilização. Todavia, deverá ser observado o seguinte para garantir a máxima segurança do utilizador:

Recomendações e medidas de precaução

Dado que os componentes individuais do kit contêm reagentes potencialmente perigosos, estes poderão causar irritação nos olhos e na pele.

ATENÇÃO: Os calibradores, controlos e a solução contêm azida de sódio (NaN_3) como conservante. A NaN_3 pode ser tóxica se ingerida ou se for absorvida através da pele ou dos olhos. A NaN_3 pode reagir com chumbo ou cobre das canalizações e formar azidas de metal altamente explosivas. Para evitar a acumulação de azida, deverá lavar essas soluções com uma grande quantidade de água na sua eliminação. Por favor, observe os requisitos das regulamentações locais/nacionais em matéria de descontaminação.

Quando trabalhar com o kit não coma, beba ou fume. Não proceda à pipetagem com a boca, use luvas descartáveis.

Os reagentes fornecidos com este produto de origem humana (controlos e calibradores) apresentaram um resultado negativo no teste do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), hepatite C e HIV 1 e 2. No entanto, em produtos humanos nunca poderá ser excluir-se com certeza absoluta a existência dos agentes patogénicos indicados ou outros, ou de agentes patogénicos ainda não conhecidos ou diagnosticados. Por conseguinte, os controlos e os calibradores, bem como os soros dos pacientes deverão ser considerados como potencialmente infecciosos e manuseados de acordo com a legislação nacional. O produto contém componentes de origem animal, tal como indicado na tabela de componentes: Durante a utilização deverão ser observadas as diretrizes nacionais aplicáveis.

5.2 Indicações gerais

Se as informações do produto, incluindo o rótulo, estiverem erradas ou incorretas, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit.

Os controlos, calibradores e conjugados individuais ou as placas de microtitulação de lotes diferentes não deverão ser trocados, uma vez que essa troca poderia derivar em resultados errados.

Antes do início do teste, todos os componentes do kit deverão ser colocados à temperatura ambiente (20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F) e bem misturados. O protocolo estabelecido para realizar o teste tem de ser imprescindivelmente observado.

Incubação: Na execução do teste (também com sistemas automatizados) não poderá ser ultrapassada a temperatura de 26 °C / 78,8 °F.

Nunca exponha os componentes individuais do kit a temperaturas superiores a 37 °C / 98,6 °F.

A solução de substrato deverá ser sempre pipetada com pontas novas de pipetas para evitar a contaminação. Evite a exposição da solução de substrato à luz intensa. Nunca pipete a solução de conjugado com pontas de pipetas contaminadas com outros reagentes.

Não se deverá fundamentar o diagnóstico clínico definitivo com base nos resultados dos testes realizados, uma vez que este diagnóstico deverá ser feito pelo médico depois de avaliar todos os dados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico deve ser impreterivelmente confirmado por vários métodos de diagnóstico.



6 Colheita de amostras, preparação e armazenamento

Recomenda-se a utilização de amostras de soro fresco. A recolha de sangue tem de obedecer à legislação nacional. Não use amostras de soro ictericas, lipémicas, hemolisadas ou com contaminação bacteriana. No caso de amostras turvas, proceda a uma centrifugação baixa das partículas (<1000 x g). As amostras de sangue deverão ser recolhidas em tubos limpos, secos e vazios.

Após a recolha, as amostras de soro deverão ser utilizadas no prazo de 8h, ou mantidas fechadas durante 48 horas a uma temperatura de 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F. Para períodos de armazenamento mais prolongados, as amostras deverão ser congeladas a uma temperatura de - 20 °C / - 4 °F.

As amostras de plasma não devem ser usadas neste teste!

7 Procedimento de teste

7.1 Preparação

Diluição de reagentes concentrados:

Dilua a solução da amostra concentrada 1:5 com água destilada, por exemplo, 20 ml + 80 ml.

Dilua a solução de lavagem concentrada 1:50 com água destilada, por exemplo, 20 ml + 980 ml.

Para evitar erros, deverá marcar as tampas dos calibradores e controlos.

Diluição das amostras dos pacientes:

Dilua e misture as amostras de soro **1:10** com solução de amostra diluída (1x), por exemplo, 450 µl de solução de amostra + 50 µl de soro.

Lavar:

São necessários 20 ml de solução de lavagem diluída (1x) por cada 8 cavidades ou 200 ml por cada 96 cavidades, por exemplo, 4 ml de concentrado mais 196 ml de água destilada.

Lavagem automática:

Para colocar o instrumento em funcionamento e para o volume morto deverão ser tidas em conta quantidades adicionais da solução de lavagem.

Lavagem manual:

Retire o líquido com cuidado, batendo com a placa em papel de filtro. Pipete 300 µl de solução de lavagem diluída em cada uma das cavidades, aguarde 20 segundos. Repita o processo mais duas vezes.

Placa de microtitulação:

Remova as cavidades não utilizadas e guarde-as bem fechadas na película de embalagem com o saco de secagem num lugar fresco (2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F).

7.2 Esquema de pipetagem

Recomendamos que os calibradores, controlos e amostras sejam pipetados da seguinte forma:

	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	CP	P3	
F	Cal C	CP	P3	
G	Cal D	CN	...	
H	Cal D	CN	...	

Cal A: Calibrador A

Cal B: Calibrador B

Cal C: Calibrador C

Cal D: Calibrador D

Cal E: Calibrador E

Cal F: Calibrador F

CP: Controlo positivo

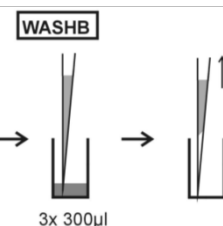
CN: Controlo negativo

P1: Paciente 1

P2: Paciente 2

P3: Paciente 3

7.3 Passos de trabalho

Passo	Descrição
1.	Certifique-se de que os preparativos do capítulo 7.1 foram realizados antes de iniciar.
2.	Siga os seguintes passos de acordo com a interpretação quantitativa pretendida dos resultados.
Calibradores, controlos e amostras	
3.	 Pipete 100 µl em cada uma das cavidades previstas como descrito no capítulo 7.2: • Calibradores (Cal A a Cal F) • Controlo negativo (CN) e controlo positivo (CP) e • Amostras diluídas de pacientes (P1, P2, ...)
4.	 Proceda à incubação a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F durante 30 minutos.
5.	 Lave 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem diluída 1:50.



CONJUGADO

6.

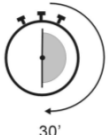
CONJ



+100 µl

Adicione 100 µl de solução de conjugado de enzima em cada uma das cavidades.

7.

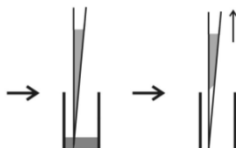


30'

Proceda à incubação a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F durante 30 minutos.

8.

WASHB



3x 300µl

Lave 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem diluída 1:50.

SUBSTRATO

9.

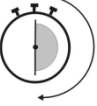
SUB



+100 µl

Pipete 100 µl de solução de substrato TMB em cada uma das cavidades.

10.



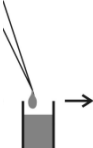
30'

Proceda à incubação a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F durante 30 minutos, ao abrigo da luz intensa.

INTERRUPÇÃO

11.

STOP



+100 µl

Pipete 100 µl de solução de interrupção em cada cavidade na ordem da adição do substrato.

12.



5'

Deixe incubar durante, pelo menos, 5 minutos.

13.

Agite cuidadosamente a placa durante 5 segundos.

14.



450/620 nm

Meça a densidade ótica a 450 nm durante 30 minutos (valor recomendado para 450/620 nm).

8 Avaliação quantitativa

A **avaliação quantitativa** tem por base uma curva padrão, em que é registada a densidade ótica dos calibradores (eixo y) versus a concentração em ng/ml (eixo x). Para a avaliação recomendamos coordenadas log/lin e um ajuste de 4 parâmetros. A partir da curva, é possível determinar a concentração de MMP-3 em ng/ml com base na densidade ótica da amostra.

AESKULISA® MMP-3	Área normal	Limites marginais	Positivo
Mulheres	0 – 20 ng/ml	20 – 30 ng/ml	>30 ng/ml
Homens	0 – 40 ng/ml	40 – 50 ng/ml	>50 ng/ml

Exemplo de avaliação

Não utilize este exemplo para interpretar resultados de pacientes!

Calibradores MMP-3	OD 450/620 nm	CV % (variância)
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

Exemplo de cálculo

Paciente	Replicação (OD)	Média (OD)	Resultado (ng/ml)
P 01	0,264/0,258	0,261	17,2
P 02	1,323/1,326	1,325	97,5

As amostras situadas acima do valor do calibrador mais elevado deverão ser indicadas como >Máx, sendo que deveriam ser adequadamente diluídas e reavaliadas tendo em consideração o fator de diluição. As amostras abaixo do intervalo de medição deverão ser indicadas como <Mín.

Para obter dados específicos aos lotes, consulte o certificado de controlo anexo. Os laboratórios médicos deverão realizar controlos de qualidade internamente, usando controlos próprios e/ou soros agrupados, nos termos dos regulamentos nacionais.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais com base nas suas próprias técnicas, controlos, equipamentos e população de pacientes.

Se os valores dos controlos não satisfizerem os critérios de validação, o teste é considerado inválido e terá de ser repetido.

Deverão ser verificados os seguintes factos técnicos: Datas de validade dos reagentes, condições de armazenamento, pipetas, equipamentos utilizados, fotómetro, condições de incubação e método de lavagem.

Se as amostras testadas apresentarem valores invulgares ou desvios, ou caso os critérios de validação por alguma razão estranha não sejam cumpridos, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit.



9 Dados técnicos

Material da amostra:	Soro
Volume da amostra:	100 µl de uma diluição de amostra 1:10 com 1x solução de amostra
Tempo total de incubação:	90 minutos a 20 – 26 °C / 68 – 78,8 °F
Intervalo de medição:	0-200 ng/ml
Sensibilidade analítica:	5 ng/ml
Armazenamento:	a 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F em frascos originais.
Número de determinações:	96 testes

10 Dados de teste / Características de teste

10.1 Sensibilidade analítica

A realização de 80 testes de soluções de amostras no **AESKULISA® MMP-3** resultou num Limit of Blank de 4 ng/ml, e os testes de 8 soros com uma concentração baixa de MMP-3, com 8 repetições, apresentaram um Limit of Detection de 5 ng/ml.

10.2 Especificidade

As placas de microtitulação são revestidas com anticorpos monoclonais de murino contra a MMP-3 humana. Não foram detetadas reatividades cruzadas com outros antígenos.

10.3 Linearidade

Para determinados soros selecionados foi possível determinar neste teste uma relação linear entre a diluição e a concentração de anticorpos. Devido à heterogeneidade do soro humano, não pode ser excluída a possibilidade de soros individuais apresentarem um comportamento não linear.

N.º da amostra	Diluição	concentração medida (ng/ml)	concentração esperada (ng/ml)	Recuperação (%)
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 Precisão

Para verificar a precisão do ensaio foi calculada a variância com cinco soros em diferentes áreas da curva padrão (variância intra-assay e inter-assay e variância lot-to-lot), tendo a reprodutibilidade sido estudada em 5 ciclos de 8 repetições cada. A variância lot-to-lot foi analisada a partir da análise de cinco soros de 3 lotes diferentes em 8 repetições.

Intra-assay		
N.º da amostra	Média (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-assay		
N.º da amostra	Média (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 Calibração

Devido à falta de normas internacionais de referência, o **AESKULISA® MMP-3** é calibrado contra quantidades definidas de MMP-3 recombinante humana (através de pureza determinada com SEC-MALS: >99 %). Os resultados são apresentados em ng/ml.

10.6 Recuperação

A recuperação foi determinada através da adição de diferentes quantidades definidas de MMP-3 recombinante humana a vários soros humanos. Foram calculadas as seguintes taxas de recuperação com base em regressão linear:

Amostra de soro	% Recuperação	Coefficiente de determinação R ²
1	101,4	0,9934
2	91,8	0,9938
3	88,5	0,9923

10.7 Avaliação clínica

MMP-3 em pessoas saudáveis

Para determinar o intervalo normal, os valores de MMP-3 foram calculados com base num total de 156 amostras de soro de doadores de sangue saudáveis (46 mulheres e 110 homens).

AESKULISA® MMP-3	Número	Mín (ng/ml)	Máx (ng/ml)	Méd (ng/ml)	Percentil 95
Homens saudáveis	110	8,9	56,6	25,3	41,9
Mulheres saudáveis	46	5,1	32,5	14,2	29,7



Com base nos valores determinados, os valores normais são definidas conforme estipulado em seguida:

AESKULISA® MMP-3	Área normal	Limites marginais	Resultados positivos
Mulheres	0 - 20 ng/ml	20-30 ng/ml	>30 ng/ml
Homens	0 - 40 ng/ml	40-50 ng/ml	>50 ng/ml

MMP-3 em várias doenças autoimunes, em comparação com artrite reumatóide e em pessoas saudáveis

Relativamente à concentração de MMP-3 foram testadas 627 amostras de soro (ver tabela Composição). A tabela resume os resultados:

Doença	Número	Mín (ng/ml)	Máx (ng/ml)	Méd (ng/ml)	Pos	Neg
Espondiloartrite	80	0,0	287,4	14,3	29 (36,3 %)	51 (63,8 %)
Doença celíaca	15	5,9	22,8	12,6	1 (6,7 %)	14 (93,3 %)
Doença celíaca + DH	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 %)
Saudável	156	8,9	56,6	22,0	3 (1,9 %)	153 (98,1 %)
Artrite reumatóide	203	0,7	280,2	33,2	139 (68,5 %)	64 (31,5 %)

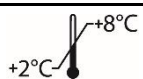
LES = lúpus eritematoso sistémico, DH = dermatite herpetiforme

Tal como descrito na literatura, os níveis de concentração de MMP-3 são superiores em várias doenças inflamatórias. Assim sendo, a MMP-3 não é adequada para diagnosticar a artrite reumatóide. A MMP-3 é um marcador para a atividade da artrite reumatóide. As concentrações de MMP-3 em pacientes com AR estão correlacionadas com a atividade da doença do paciente individual.

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 Símbolos regulamentares

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 - Utilise 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	- Micropiastro 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