AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS





AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® MMP-3

Ref 3168



DIN EN ISO 13485

Οδηγίες χρήσης

Περιεχόμενα

1 Προορισμός 1
2 Κλινική εφαρμογή και αρχές τεστ 1
3 Στοιχεία του KIT 2
4 Αποθήκευση και διάρκεια ζωής 2
5 Επισημάνσεις και μέτρα προστασίας 3
6 Λήψη, προετοιμασία και διατήρηση δειγμάτων 4
7 Διεξαγωγή του τεστ 4
8 Ποσοτική αξιολόγηση 7
9 Τεχνικά στοιχεία 8
10 Δεδομένα τεστ / χαρακτηριστικά τεστ 8
11 Βιβλιογραφία 11

AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, Γερμανία
Τηλ.: +49-6734-9622-0
Φαξ: +49-6734-9622-2222
Info@aesku.com
www.aesku.com

1 Προορισμός

Το ***AESKULISA®* MMP-3** είναι μια ανάλυση ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού στερεάς φάσης η οποία χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ανθρώπινης MMP-3 για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της MMP-3 στον ανθρώπινο ορό. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε ng/ml. Το εύρος τυπικής καμπύλης είναι 0-200 ng/ml.
Οι αναλύσεις αποτελούν ένα εργαλείο για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (PA).

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές τεστ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (PA) είναι μια χρόνια φλεγμονική πάθηση, η οποία χαρακτηρίζεται κατά κύριο λόγο από φλεγμονές των αρθρώσεων και οδηγεί σε απώλεια των λειτουργιών των αρθρώσεων και σοβαρές αναπηρίες, αν δεν ξεκινήσει εγκαίρως η επιβράδυνση της εξέλιξης της πάθησης. Το *AESKULISA®* MMP-3 βοηθά στην εξακρίβωση ασθενών με PA, οι οποίοι επωφελούνται από την έγκαιρη έναρξη θεραπείας με επιθετική φαρμακευτική αγωγή. Το *AESKULISA®* MMP-3 ενδέχεται, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της προόδου της θεραπείας.
Η μήτρα μεταλλοπρωτεϊνάση-3 (MMP-3, στρομελυσίνη-1) ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνάσεων. Εκπιέζεται κυρίως από κύτταρα του συνδετικού ιστού και παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες μετατόπισης ουσιών της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Η MMP-3 είναι σε θέση να διασπάσει πολλά στοιχεία της ECM, όπως π.χ. πρωτεογλυκάνες, ινονεκτίνη, λαμινίνη και άλλα κολλαγόνα. Λόγω του εκτεταμένου εύρους υποστρωμάτων και της ικανότητας να ενεργοποιεί κι άλλα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων και άλλων μητρών μεταλλοπρωτεϊνάσεων, η MMP-3 παίζει ρόλο-κλειδί στις φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες της αναμόρφωσης ιστού.
Η MMP-3 εκκρίνεται σε ανενεργή μορφή (pro-MMP-3, 52 kDa) και ενεργοποιείται μέσω περιορισμένης πρωτεολύσης με πρωτεϊνάσεις. Ενεργή MMP-3 (45 kDa και 35 kDa) μπορεί να ανασταλεί μέσω ένωσης με αναστολείς ιστού από μήτρα μεταλλοπρωτεϊνάση (TIMP) ή α2-μακροσφαιρίνη. Η ρύθμιση της δραστηριότητας της MMP-3 είναι αναγκαία, προκειμένου να αποτραπεί η καταστροφή της ECM και να διατηρηθεί μια φυσιολογική ισορροπία στις διαδικασίες αναμόρφωσης ιστού. Σύμφωνα με αυτήν την αρχή δύναται να βρεθούν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, π.χ. καρκίνο, αρτηριοσκλήρωση και αρθρίτιδα, αυξημένες συγκεντρώσεις MMP-3.
Αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση MMP-3 στον ορό σε ασθενείς με PA σε σύγκριση με υγιή ομάδα μαρτύρων ήταν σημαντικά αυξημένη. Λόγω της εκτεταμένης φλεγμονής και αναπαραγωγής αρθρικού ιστού σε ασθενείς με PA αυξάνονται η έκφραση της MMP-3 και η έκκριση στο αρθρικό υγρό. Η ποσότητα MMP-3 στο αρθρικό υγρό συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της MMP-3 στον ορό. MMP-3 στον ορό αντικατοπτρίζει με αυτό τον τρόπο την πορεία της φλεγμονής στις θιγόμενες αρθρώσεις και αποτελεί δείκτη για την δραστηριότητα της πάθησης. Ακόμα και σε πρώιμο στάδιο της πάθησης ενδέχεται οι καταστροφικές διαδικασίες στις αρθρώσεις ασθενών με PA να συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα MMP-3 και να διαγνωσθούν.
Το *AESKULISA®* MMP-3 μετρά τη συνολική MMP-3 (προ- και ενεργή MMP-3) στον ανθρώπινο ορό και αποτελεί εργαλείο για την εκτίμηση του κινδύνου της ανάπτυξης καταστροφών των αρθρώσεων και τον έλεγχο της δραστηριότητας της πάθησης και της προόδου της θεραπείας σε ασθενείς με PA.

ρχές τεστ
Τα δείγματα ορού που αραιώθηκαν σε αναλογία **1:10** επωάζονται σε κοιλότητες, οι οποίες είναι επενδυμένες με ένα μονοκλωνικό ανθρώπινο αντι-MMP-3 αντίσωμα. Κατά τη διαδικασία αυτή η MMP-3 από τον ορό του ασθενούς ενώνεται με το αντίσωμα στην πλάκα. Μη ενωμένα στοιχεία ορού ξεπλένονται στο επόμενο βήμα πλύσης. Στη συνέχεια προστίθεται ένα μονοκλωνικό ανθρώπινο αντί-MMP-3 αντίσωμα, το οποίο είναι σημαδεμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού (σύζευγμα). Κατά την επώαση αυτό ενώνεται με το προηγουμένως σχηματισμένο σύμπλεγμα αντισώματος-MMP-3. Μη ενωμένο σύζευγμα αφαιρείται στο επόμενο βήμα πλύσης. Η απόδειξη της ενωμένης MMP-3 πραγματοποιείται με μια ενζυμική χρωστική αντίδραση (μπλε) του υποστρώματος, η οποία διακόπτεται με αραιωμένο οξύ (αλλαγή χρώματος σε κίτρινο). Η ένταση της χρωστικής αντίδρασης του χρωμογόνου εξαρτάται από την ποσότητα συζεύγματος που ενώθηκε με το σύμπλεγμα αντισώματος-MMP-3 και έχει συνεπώς άμεση αναλογία με τη συγκέντρωση MMP-3 στον ορό.

3 Στοιχεία του KIT

Αραιώνεται πριν τη χρήση				
Στοιχείο του κιτ	Ποσότητα	Χρώμα πώματος	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / περιεχόμενο
Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 5x	1 x 20 ml	Λευκό	Κίτρινο	5 φορές συμπυκνωμένο Tris, NaCl, BSA, αζίδιο νατρίου < 0,1% (συντηρητική ουσία)
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 50x	1 x 20 ml	Λευκό	Πράσινο	50 φορές συμπυκνωμένο Tris, NaCl, Tween 20, αζίδιο νατρίου < 0,1% (συντηρητική ουσία)
Έτοιμο προς χρήση:				
Στοιχείο του κιτ	Ποσότητα	Χρώμα πώματος	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / περιεχόμενο
Αρνητικός έλεγχος	1 x 1,5 ml	Πράσινο	Άχρωμο	BSA, αζίδιο νατρίου < 0,1% (συντηρητική ουσία)
Θετικός έλεγχος	1 x 1,5 ml	Κόκκινο	Κίτρινο	Καθαρή ανθρώπινη MMP-3, BSA, αζίδιο νατρίου < 0,1% (συντηρητική ουσία)
Βαθμονομητές	6 x 1,5 ml	Λευκό	Κίτρινο*	Συγκέντρωση των βαθμονομητών: 0, 5, 20, 50, 100, 200 ng/ml. Καθαρή ανθρώπινη MMP-3, BSA, αζίδιο νατρίου < 0,1% (συντηρητική ουσία)
Σύζευγμα	1 x 15 ml	Μπλε	Μπλε	Ανθρώπινο αντι-MMP-3, σημαδεμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού, BSA
Σύζευγμα TMB	1 x 15 ml	Μαύρο	Άχρωμο	Σταθεροποιημένο TMB/H2O2
Διάλυμα διακοπής αντίδρασης	1 x 15 ml	Λευκό	Άχρωμο	1M υδροχλωρικό οξύ
Λωρίδα μικροκυμάτων	12 x 8 well strips	Δεν ισχύει	Δεν ισχύει	Επένδυση με ικανότητα θραύσης, βλέπε παρ. 1.

*Αυξανόμενη ένταση με αυξανόμενη συγκέντρωση

Απαραίτητα υλικά που δεν περιέχονται στο κιτ:

Φωτόμετρο μικροπλακών με οπτικό φίλτρο για 450 nm, προαιρετικά με μήκος κυμάτων αναφοράς 620nm (600-690 nm). Γυάλινα υλικά (κύλινδρος 100-1000ml), σωληνάρια για αραιώσεις, διάταξη τύρβης, μικροσιφώνια (10, 100, 200, 500, 1000 µl) ή ρυθμιζόμενο σιφώνιο πολλαπλών χρήσεων. Διάταξη πλύσης για μικροπλάκες (300 µl σιφώνιο πολλαπλών χρήσεων ή αυτόματο σύστημα πλύσης), διηθητικό χαρτί. Τα τεστ μας αναπτύχθηκαν για να χρησιμοποιηθούν με καθαρό νερό (purified water) σύμφωνα με τον ορισμό της Αμερικανικής φαρμακοποιίας (USP 26 - NF 21) και της Ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας (Eur. Ph. 4te Ed.).

4 Αποθήκευση και διάρκεια ζωής

Τα αντιδραστήρια και η μικροπλάκα πρέπει να αποθηκεύονται μέσα στις πρωτότυπες φιάλες σε 2-8°C/35-46°F. Αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται στους 2-8°C/35-46°F ένα μήνα. Οι ημερομηνίες λήξης που αναφέρονται στη συσκευασία και στις ετικέτες πρέπει να τηρούνται. Μην χρησιμοποιείται στοιχεία του κιτ των οποίων η ημερομηνία λήξης έχει λήξει! Το διάλυμα TMB δεν πρέπει να εκτίθεται σε ισχυρή επίδραση φωτός. Διατηρείτε τις μικροπλάκες πάντα μέσα στη μεμβράνη συσκευασίας με ξηρό σάκο.

5 Επισημάνσεις και μέτρα προστασίας

5.1 Κίνδυνος υγείας

Το παρόν προϊόν προορίζεται αποκλειστικά για χρήση στη ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ IN VITRO.

Η εφαρμογή πρέπει να πραγματοποιείται από προσωπικό το οποίο καταρτίστηκε επαρκώς και συγκεκριμένα για τη χρήση διαγνωστικών ουσιών In vitro. Εφόσον τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στο παρόν προϊόν χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης, δεν είναι τοξικά ή επικίνδυνα για την υγεία. Για την διασφάλιση της μέγιστης ασφάλειας του χρήστη θα πρέπει, παρόλα αυτά, να τηρούνται οι εξής προϋποθέσεις:

Συστάσεις και μέτρα προστασίας

Επειδή μεμονωμένα στοιχεία του κιτ περιέχουν επικίνδυνα αντιδραστήρια, δύναται να προκληθεί ερεθισμός των οφθαλμών και του δέρματος.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Οι βαθμονομητές, οι έλεγχοι και τα ρυθμιστικά διαλύματα περιέχουν αζίδιο νατρίου (NaN_3) ως συντηρητική ουσία. Το NaN_3 μπορεί να έχει τοξική δράση, εφόσον καταναλωθεί στοματικά ή απορροφηθεί μέσω του δέρματος ή των οφθαλμών. Το NaN_3 μπορεί μαζί με μόλυβδο ή χάλκινους σωλήνες να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Για την αποφυγή εμπλουτισμού αζιδίων παρακαλούμε να γίνεται κατά την απόρριψη αυτών των διαλυμάτων απόπλυση με άφθονο νερό. Παρακαλούμε τηρείτε τις τοπικές / εθνικές διατάξεις περί απολύμανσης.

Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε κατά την εργασία με το κιτ. Μην αναρροφάτε με σιφώνιο με το στόμα, φοράτε γάντια μιας χρήσης.

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται σε αυτό το προϊόν και είναι ανθρώπινης προέλευσης (έλεγχοι και βαθμονομητές) αποδείχθηκαν κατά την εξέταση αρνητικά όσον αφορά στο επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας B (HbsAg), ηπατίτιδα C και HIV 1 και 2. Παρόλα αυτά, σε προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης δεν μπορεί ποτέ να αποκλειστεί με απόλυτη σιγουριά ότι περιέχονται τα αναφερόμενα, άλλα ή και τυχόν ακόμα άγνωστα ή μη διαγνωσμένα παθογόνα. Για το λόγο αυτό οι έλεγχοι, οι βαθμονομητές και οι οροί των ασθενών θα πρέπει να κατηγοριοποιούνται ως πιθανώς λοιμώδεις και να χειρίζονται σύμφωνα με τη σχετική εθνική νομοθεσία. Το προϊόν περιέχει συστατικά ζωικής προέλευσης, όπως αναφέρει ο πίνακας συστατικών: Τηρείτε κατά το χειρισμό τους τη σχετική εθνική νομοθεσία.

5.2 Γενικές επισημάνσεις

Σε περίπτωση που στη συσκευασία ή την ετικέτα αναφέρονται λάθος ή εν μέρει λάθος πληροφορίες, επικοινωνήστε με τον παραγωγό ή τον προμηθευτή του κιτ.

Δεν επιτρέπεται να αντικαθίστανται μεμονωμένοι έλεγχοι, βαθμονομητές και συζεύγματα ή μικροπλάκες διαφόρων παρτίδων, διότι αυτό ενδέχεται να οδηγήσει σε παραποιήσεις των αποτελεσμάτων των μετρήσεων.

Πριν ξεκινήσετε το τεστ, όλα τα στοιχεία του κιτ θα πρέπει να έχουν θερμοκρασία δωματίου (20-26°C/68-78,8°F) και να ανακατευτούν καλά. Το προβλεπόμενο πρακτικό εκτέλεσης του τεστ πρέπει να τηρείται οπωσδήποτε.

Επώαση: Για την διεξαγωγή του τεστ (ακόμα και με αυτόματες συσκευές), η θερμοκρασία δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει τους 26°C/78,8°F.

Μην εκθέτετε ποτέ τα μεμονωμένα στοιχεία του κιτ σε θερμοκρασίες άνω των 37 °C/ 98,6°F.

Αναρροφάτε το διάλυμα συζεύγματος με καινούργια ρύγχη σιφωνίων, προκειμένου να αποφύγετε μολύνσεις. Αποφεύγετε την επαφή του διαλύματος συζεύγματος με έντονο φως. Μην αναρροφάτε ποτέ το διάλυμα συζεύγματος με ρύγχη σιφωνίων, τα οποία έχουν μολυνθεί από άλλα αντιδραστήρια.

Η τελική κλινική διάγνωση δεν πρέπει να πραγματοποιείται αποκλειστικά βάσει των αποτελεσμάτων των διεξαγμένων τεστ, αλλά από γιατρό, ο οποίος λαμβάνει υπόψη όλα τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η διάγνωση θα πρέπει οπωσδήποτε να διασταυρωθεί με τη βοήθεια διαφόρων διαγνωστικών μεθόδων.

6 Λήψη, προετοιμασία και διατήρηση δειγμάτων

Συνιστάται η χρήση φρέσκων δειγμάτων ορού. Η λήψη αίματος πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία. Μη χρησιμοποιείται ικτερικά, λιπαιμικά, αιμολυτικά και βακτηριδιακά μολυσμένα δείγματα ορού. Σε περίπτωση θολών δειγμάτων, αφαιρέστε τα σωματίδια με φυγοκέντριση (<1000 x g). Τοποθετήστε τα δείγματα ορού σε καθαρά, ξηρά και άδεια σωληνάρια.

Τα δείγματα ορού πρέπει να χρησιμοποιηθούν 8 ώρες μετά τη λήψη τους ή να διατηρηθούν κλειστά για 48 ώρες στους 2-8°C/35-46°F. Για να διατηρήσετε τα δείγματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, καταψύξτε τα στους -20°C/-4°F.

Στο παρόν τεστ δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν δείγματα πλάσματος!

7 Διεξαγωγή του τεστ

7.1 Προετοιμασία

Αραίωση συμπυκνωμένων αντιδραστηρίων:

Αραιώστε συμπυκνωμένα ρυθμιστικά διαλύματα δειγμάτων με αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:5.

π.χ. 20 ml + 80 ml.

Αραιώστε συμπυκνωμένα ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης με αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:50.

π.χ. 20 ml + 980 ml.

Προκειμένου να αποφύγετε λάθη, συνιστούμε τη σήμανση των καπακιών των βαθμονομητών και των ελέγχων.

Αραίωση των δειγμάτων των ασθενών:

Αραιώστε και αναμείξτε δείγματα ορού **1:10** με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (1x),

π.χ. 450 µl ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος + 50 µl ορό.

Πλύση:

Απαιτούνται 20 ml αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (1x) ανά 8 κοιλότητες ή 200 ml ανά 96 κοιλότητες,

π.χ. 4 ml συμπύκνωμα συν 196 ml αποσταγμένο νερό.

Αυτοματοποιημένη πλύση:

Για την έναρξη λειτουργίας του εργαλείου και το νεκρό όγκο πρέπει να ληφθούν υπόψη πρόσθετες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.

Πλύση με το χέρι:

Αφαιρέστε το υγρό προσεκτικά, χτυπώντας την πλάκα πάνω σε διηθητικό χαρτί. Αναρροφήστε με σιφώνιο 300 µl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, περιμένετε 20 δευτερόλεπτα. Επαναλάβετε τη διαδικασία δύο φορές.

Μικροπλάκα:

Αφαιρέστε αχρησιμοποίητες κοιλότητες και αποθηκεύστε τις καλά σφραγισμένες στη μεμβράνη συσκευασίας με ξηρό σάκο σε δροσερό μέρος (2-8°C/35-46°F).

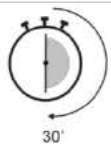
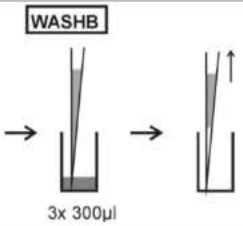
7.2 Σχήμα αναρρόφησης με σιφώνιο

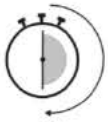
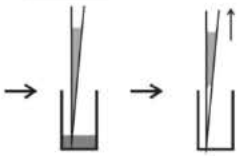
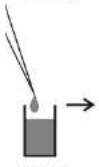
Συνιστούμε την αναρρόφηση των βαθμονομητών, ελέγχων και δειγμάτων με σιφώνιο ως εξής:

	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: Βαθμονομητής A
Cal B: Βαθμονομητής B
Cal C: Βαθμονομητής C
Cal D: Βαθμονομητής D
Cal E: Βαθμονομητής E
Cal F: Βαθμονομητής F
PC: Θετικός έλεγχος
NC: Αρνητικός έλεγχος
P1: Ασθενής 1
P2: Ασθενής 2
P3: Ασθενής 3

7.3 Βήματα εργασίας

Βήμα	*Περιγραφή*
1.	Διασφαλίστε πριν την έναρξη ότι διεξήχθηκαν οι προετοιμασίες του κεφαλαίου 7.1.
2.	Χρησιμοποιήστε τα ακόλουθα βήματα αντίστοιχα με την επιθυμητή ποσοτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
	Βαθμονομητές, έλεγχοι & δείγματα
3.	 Αναρροφήστε με σιφώνιο 100 µl στην κάθε προβλεπόμενη κοιλότητα σύμφωνα με το κεφάλαιο 7.2: • Βαθμονομητές (Cal A ως Cal F) • Αρνητικός έλεγχος (NC) και Θετικός έλεγχος (PC) και • Αραιωμένα δείγματα ασθενών (P1, P2,…)
4.	 Επωάστε 30 λεπτά στους 20-26°C/68-78,8°F.
5.	 Πλύνετε 3 φορές με 300 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, αραιωμένο κάθε φορά 1:50.

	ΣΥΖΕΥΓΜΑ	
6.	CONJ 	Προσθέστε σε κάθε κοιλότητα 100 µl ενζυμικό διάλυμα συζεύγματος.
7.		Επωάστε 30 λεπτά στους 20-26°C/68-78,8°F.
8.	WASHB 	Πλύνετε 3 φορές με 300 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, αραιωμένο κάθε φορά 1:50.
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	
9.	SUB 	Αναρροφήστε με σιφώνιο σε κάθε κοιλότητα 100 µl διάλυμα υποστρώματος TMB.
10.		Επωάστε 30 λεπτά στους 20-26°C/68-78,8°F, προστατεύστε από έντονη επίδραση φωτός.
	ΔΙΑΚΟΠΗ	
11.	STOP 	Αναρροφήστε με σιφώνιο 100 µl διάλυμα διακοπής στη σειρά με την οποία προστίθεται το υπόστρωμα.
12.		Επωάστε τουλάχιστον 5 λεπτά.
13.		Κουνήστε την πλάκα προσεκτικά 5 δευτερόλεπτα.
14.	OD_{450} - OD_{620}  450/620 nm	Μετρήστε την οπτική πυκνότητα σε 450 nm εντός 30 λεπτών (συνιστάται σε 450/620 nm).

8 Ποσοτική αξιολόγηση

Η **ποσοτική αξιολόγηση** πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας στάνταρ καμπύλης, στην οποία η οπτική πυκνότητα των βαθμονομητών (άξονας των ψ) τοποθετείται απέναντι στη συγκέντρωση σε ng/ml (άξονας των χ). Η log/lin τοποθέτηση και ένα Fit 4 παραμέτρων συνιστώνται για την αξιολόγηση. Με τη βοήθεια της καμπύλης ορίζεται από την οπτική πυκνότητα του δείγματος η συγκέντρωση MMP-3 σε ng/ml.

AESKULISA MMP-3	Φυσιολογικές τιμές	Οριακές τιμές	Θετικό
Γυναίκες	0 – 20 ng/ml	20 – 30 ng/ml	> 30 ng/ml
Άντρες	0 – 40 ng/ml	40 – 50 ng/ml	> 50 ng/ml

Παράδειγμα αξιολόγησης

Το παρόν παράδειγμα δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ασθενούς !

Βαθμονομητές MMP-3	OD 450/620 nm	CV % (διασπορά)
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

Παράδειγμα υπολογισμού

Ασθενής	Δείγμα-αντίγραφο (OD)	Μέση τιμή (OD)	Αποτέλεσμα (ng/ml)
P 01	0,264/0,258	0,261	17,2
P 02	1,323/1,326	1,325	97,5

Δείγματα που κυμαίνονται πάνω από την τιμή του βαθμονομητή, πρέπει να καταγράφονται ως >Max. Θα πρέπει να αραιωθούν αντίστοιχα και να αξιολογηθούν εκ νέου, λαμβάνοντας υπόψη τον συντελεστή αραίωσης. Δείγματα με τιμή χαμηλότερη του εύρους μέτρησης πρέπει να καταγράφονται ως <Min.

Για τα δεδομένα της κάθε παρτίδας ανατρέξτε στο συνημμένο πιστοποιητικό ελέγχου. Ιατρικά εργαστήρια θα πρέπει να εκτελούν εσωτερικούς ελέγχους ποιότητας ιδίους ελέγχους ή/και με ομαδικούς ορούς σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία.

Συνιστάται η εκπόνηση φυσιολογικών τιμών από κάθε εργαστήριο, βάσει ιδίας τεχνικής, ιδίων ελέγχων, ιδίου εξοπλισμού και ιδίου πληθυσμού ασθενών.

Σε περίπτωση που οι τιμές ελέγχων δεν πληρούν τα κριτήρια αξιολόγησης, το τεστ θεωρείται άκυρο και πρέπει να επαναληφθεί.

Τα εξής τεχνικά στοιχεία θα πρέπει να εξεταστούν: Στοιχεία ημερομηνίας λήξης των αντιδραστηρίων, συνθήκες αποθήκευσης, σιφώνια, χρησιμοποιούμενες συσκευές, φωτόμετρο, συνθήκες επώασης και μέθοδος πλύσης.

Σε περίπτωση που τα εξεταζόμενα δείγματα οδηγήσουν σε αξιοσημείωτες τιμές ή αποκλείσεις ή δεν πληρούνται τα κριτήρια αξιολόγησης για ακατανόητους λόγους, επικοινωνήστε με τον παραγωγό ή προμηθευτή του κιτ.

9 Τεχνικά στοιχεία

Υλικό δειγμάτων:	Ορός
Μέγεθος δείγματος:	100 µl με αραίωση δείγματος 1:10 με 1x ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος
Συνολικός χρόνος επώασης:	90 λεπτά στους 20-26°C/68-78,8°F
Εύρος μέτρησης:	0-200 ng/ml
Αναλυτική ευαισθησία:	5 ng/ml
Αποθήκευση:	στους 2-8°C/35-46°F στις πρωτότυπες φιάλες.
Αριθμός προσδιορισμών:	96 τεστ

10 Δεδομένα τεστ / χαρακτηριστικά τεστ

10.1 Αναλυτική ευαισθησία

80 φορές τεστ δοκιμαστικών διαλυμάτων δειγμάτων στο *AESKULISA*® MMP-3 οδήγησε σε όριο μάρτυρα (Limit of Blank) των 4 ng/ml. Τεστ 8 ορών με χαμηλή συγκέντρωση MMP-3 με οκταπλή επανάληψη οδήγησε σε όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) των 5 ng/ml.

10.2 Εξειδίκευση

Οι μικροπλάκες είναι επενδυμένες με επιδημικά μονοκλωνικά αντισώματα κατά του ανθρώπινου MMP-3. Δεν υπήρξε εφικτό να αποδειχθεί διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα αντιγόνα.

10.3 Γραμμικότητα

Για επιλεγμένους ορούς επετεύχθη σε αυτό το τεστ ο προσδιορισμός γραμμικού συσχετισμού μεταξύ αραίωσης και συγκέντρωσης αντισωμάτων. Λόγω της ετερογένειας του ανθρώπινου ορού δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι μεμονωμένοι οροί μπορεί να έχουν μη γραμμική συμπεριφορά.

Αρ. δείγματος	Αραίωση	Μετρούμενη συγκέντρωση (ng/ml)	Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
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 Ακρίβεια

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της δοκιμής προσδιορίστηκε με πέντε ορούς σε διάφορα σημεία της καμπύλης στάνταρ η διασπορά (διασπορά εσωτερική διασπορά και διασπορά μεταξύ των δοκιμών καθώς και η διασπορά lot to lot), εξετάζοντας την αναπαραγωγικότητα σε 5 διαδικασίες εργασίας με 8 επαναλήψεις κάθε φορά. Η διασπορά lot to lot εξετάστηκε, εξετάζοντας πέντε ορούς από 3 διαφορετικές παρτίδες με 8 επαναλήψεις.

Εντός των δοκιμών (intra-assay)		
Αρ. δείγματος	Μέση τιμή (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

Μεταξύ των δοκιμών (inter-assay)		
Αρ. δείγματος	Μέση τιμή (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 Βαθμονόμηση

Λόγω της απουσίας διεθνών προτύπων αναφοράς, το AESKULISA MMP-3 βαθμονομήθηκε έναντι καθορισμένων ποσοτήτων καθαρής, ανασυνδυασμένης ανθρώπινης MMP-3 (μέσω SEC-MALS καθορισμένη καθαρότητα: >99 %). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ng/ml.

10.6 Ανάκτηση

Η ανάκτηση προσδιορίστηκε μέσω πρόσθεσης διαφορετικών, προκαθορισμένων ποσοτήτων ανασυνδυασμένης ανθρώπινης MMP-3 σε διαφορετικούς ανθρώπινους ορούς. Τα εξής ποσοστά ανάκτησης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης:

Δείγμα ορού	% ανάκτησης	Εύρος προσδιορισμού R^2
1	101,4	0,9934
2	91,8	0,9938
3	88,5	0,9923

10.7 Κλινική αξιολόγηση

MMP-3 σε υγιή άτομα

Για τον προσδιορισμό του φυσιολογικού εύρους προσδιορίστηκαν οι τιμές MMP-3 σε συνολικά 156 δείγματα ορού από υγιείς δότες (46 γυναίκες και 110 άντρες).

AESKULISA MMP-3	Αριθμός	Min (ng/ml)	Max (ng/ml)	Med (ng/ml)	95 εκατοστημόρια
Υγιείς άντρες	110	8,9	56,6	25,3	41,9
Υγιείς γυναίκες	46	5,1	32,5	14,2	29,7

Από τις προσδιορισμένες τιμές καθορίστηκαν τα φυσιολογικά εύρη ως εξής:

***AESKULISA* MMP-3**	**Φυσιολογικές τιμές**	**Οριακές τιμές**	**Θετικά αποτελέσματα**
Γυναίκες	0 - 20 ng/ml	20-30 ng/ml	> 30 ng/ml
Άντρες	0 - 40 ng/ml	40-50 ng/ml	> 50 ng/ml

MMP-3 σε διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις σε σύγκριση με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και με υγιή άτομα

Συνολικά εξετάστηκαν 627 δείγματα ορού (σύνθεση βλέπε πίνακα) ως προς τη συγκέντρωση της MMP-3. Ο πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα:

Πάθηση	**Αριθμός**	**Min (ng/ml)**	**Max (ng/ml)**	**Med (ng/ml)**	**Θετικό**	**Αρνητικό**
Σπονδυλαρθρίτιδα	80	0,0	287,4	14,3	29 (36,3%)	51 (63,8%)
Κοιλιοκάκη	15	5,9	22,8	12,6	1 (6,7%)	14 (93,3%)
Κοιλιοκάκη και + DH	32	8,5	142,4	28,3	19 (59,4%)	13 (40,6%)
Διάχυτος ερυθηματώδης λύκος	24	14,5	200,8	46,2	22 (91,7%)	2 (8,3%)
Αγγειοπάθεια	117	5,2	283,5	47,9	97 (82,9%)	20 (17,1%)
Υγιή άτομα	156	8,9	56,6	22,0	3 (1,9%)	153 (98,1%)
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	203	0,7	280,2	33,2	139 (68,5%)	64 (31,5%)

SLE = Διάχυτος ερυθηματώδης λύκος, DH = Ερπετοειδής δερματίτιδα

Όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία, σε διάφορες εύφλεκτες παθήσεις παρουσιάζονται αυξημένες συγκεντρώσεις MMP-3. Για το λόγο αυτό, η MMP-3 δεν είναι κατάλληλη για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η MMP-3 είναι ένας δείκτης για τη δραστηριότητα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η συγκεντρώσεις της MMP-3 σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα συσχετίζονται με την ατομική δραστηριότητα της ασθένειας.

11 Βιβλιογραφία

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. Tchetverikov, 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.

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In Vitro Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	¨ Numero d'ordine	¨ Cataloge number
	¨ Référence Catalogue	¨ Numéro de catálogo
	¨ Bestellnummer	¨ Αριθμός παραγγελίας
	¨ Número de catálogo	
LOT	¨ Descrizione lotto	¨ Lot
	¨ Lot	¨ Lote
	¨ Chargen Bezeichnung	¨ Χαρακτηρισμός παρτίδας
	¨ Lote	
CE	¨ Conformità europea	¨ EC Declaration of Conformity
	¨ Déclaration CE de Conformité	¨ Declaración CE de Conformidad
	¨ Europäische Konformität	¨ Ευρωπαϊκή συμφωνία
	¨ Déclaracão CE de Conformidade	
Σ 96	¨ 96 determinazioni	¨ 96 tests
	¨ 96 tests	¨ 96 pruebas
	¨ 96 Bestimmungen	¨ 96 προσδιορισμοί
	¨ 96 Testes	
i	¨ Rispettare le istruzioni per l'uso	¨ See instructions for use
	¨ Voir les instructions d'utilisation	¨ Ver las instrucciones de uso
	¨ Gebrauchsanweisung beachten	¨ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	¨ Ver as instrucões de uso	
	¨ Da utilizzarsi entro	¨ Use by
	¨ Utilise avant le	¨ Utilizar antes de
	¨ Verwendbar bis	¨ Χρήση μέχρι
	¨ Utilizar antes de	
+2°C +8°C	¨ Conservare a 2-8°C	¨ Store at 2-8°C (35-46°F)
	¨ Conserver à 2-8°C	¨ Conservar a 2-8°C
	¨ Lagerung bei 2-8°C	¨ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	¨ Conservar entre 2-8°C	
	¨ Prodotto da	¨ Manufactured by
	¨ Fabriqué par	¨ Fabricado por
	¨ Hergestellt von	¨ Κατασκευάζεται από
	¨ Fabricado por	
CO-CAL	¨ Calibratore cut-off	¨ Cut off Calibrator
	¨ Etalon Seuil	¨ Calibrador de cut-off
	¨ Grenzwert Kalibrator	¨ Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	¨ Calibrador de cut-off	
CON +	¨ Controllo positivo	¨ Positive Control
	¨ Contrôle Positif	¨ Control Positivo
	¨ Positiv Kontrolle	¨ Θετικός ορός ελέγχου
	¨ Controlo positivo	
CON −	¨ Controllo negativo	¨ Negative Control
	¨ Contrôle Négatif	¨ Control Negativo
	¨ Negativ Kontrolle	¨ Αρνητικός ορός ελέγχου
	¨ Controlo negativo	
CAL	¨ Calibratore	¨ Calibrator
	¨ Etalon	¨ Calibrador
	¨ Kalibrator	¨ Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	¨ Calibrador	
RC	¨ Recupero	¨ Recovery
	¨ Corrélation	¨ Recuperado
	¨ Wiederfindung	¨ Ανάκτηση
	¨ Recuperacão	
CONJ	¨ Coniugato	¨ Conjugate
	¨ Conjugé	¨ Conjugado
	¨ Konjugat	¨ Σύζευγμα
	¨ Conjugado	
MP	¨ Micropiastra rivestita	¨ Coated microtiter plate
	¨ Microplaque sensibilisée	¨ Microplaca sensibilizada
	¨ Beschichtete Mikrotiterplatte	¨ Επικαλυμμένη μικροπλάκα
	¨ Microplaca revestida	
WASHB 50x	¨ Tampone di lavaggio	¨ Wash buffer
	¨ Tampon de Lavage	¨ Solución de lavado
	¨ Waschpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	¨ Solucão de lavagem	
SUB	¨ Tampone substrato	¨ Substrate buffer
	¨ Substrat	¨ Tampón sustrato
	¨ Substratpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	¨ Substrato	
STOP	¨ Reagente bloccante	¨ Stop solution
	¨ Solution d'Arrêt	¨ Solución de parada
	¨ Stopreagenz	¨ Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	¨ Solucão de paragem	
SB 5x	¨ Tampone campione	¨ Sample buffer
	¨ Tampon Echantillons	¨ Tampón Muestras
	¨ Probenpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	¨ Diluente de amostra	