遠腎佳糖尿病腎病變 uPTM-FetA 酵素連結免疫吸附檢測試劑
DNlite-DKD uPTM-FetA ELISA Kit

IVD **本產品僅供體外診斷使用，並限專業人員操作使用。**
使用前請務必詳閱下列使用說明書並遵照指示使用。

許可字號：衛部醫器製字第 007623 號
REF: 8103105

預期用途

本產品以比色免疫測定法定量人類尿液中具有特定轉譯後修飾的胎球蛋白-A 片段 (uPTM-FetA，以下簡稱 E103）的濃度。本產品為非自動化的預後用體外診斷試劑且應由專業人員在合格的臨床實驗室進行操作。藉由本產品所測得的 E103 濃度應使用該病患之尿肌酸酐(urine creatinine)進行校正，方能在臨床上應用。經校正後的 E103 濃度搭配其他臨床功能指標，以協助醫生進行臨床評估第 2 型糖尿病腎功能的預後。

檢測原理

此檢測試劑的偵測原理是利用競爭性 (competitive) 酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA) 來進行尿液中 E103 的測定。首先將標準品或尿液檢體加入已塗覆 E103 的微孔盤中，藉著檢體與微孔盤中的 E103 競爭性地與 anti-E103 單株抗體結合。後續透過清洗步驟去除未結合於微孔盤上的所有物質，接著加入 HRP 共軛物辨識，與盤上塗覆的 E103 結合的抗 E103 單株抗體。再經過清洗步驟移除未結合的 HRP 共軛物，以 TMB 呈色液進行呈色反應。最後加入終止液終止呈色反應，利用微量盤式分析儀 (ELISA reader) 量測波長 450 nm 的吸光值。使用不同濃度的標準品繪製標準曲線，即得樣品的測定 E103 濃度。

產品規格

組成	數量	符號	包裝
E103 微孔盤	96 wells: 12 x 8-well strips	MICROPLATE	-20°C 包裝盒
標準品	2 vials	STANDARD	
1000 倍濃縮抗 E103 單株抗體	1 vial, 10 µL	mAb anti-E103	
4000 倍濃縮 HRP 共軛物	1 vial, 10 µL	CONJUGATE	
品管物質-H	2 vials	CONTROL H	
品管物質-L	2 vials	CONTROL L	
稀釋液	1 bottle, 50 mL	DILUENT	4°C 包裝盒
10 倍濃縮清洗緩衝液	1 bottle, 50 mL	10X WASH	
呈色液 (TMB)	1 bottle, 20 mL	TMB	
終止液	1 bottle, 20 mL	STOP	

警告、注意事項與使用限制

1. 微孔盤不可重複使用。
2. 不可使用過期試劑。
3. 不適當的溫度儲存和操作條件會對結果產生不利影響。標準品、品管物質-H 和-L 在回溶後，不可重複凍融。

4. 實驗需全程配戴防護手套。
5. 呈色液所含之 TMB 為光敏感物且可能導致皮膚紅腫，應避免光線直接暴露並避免皮膚直接接觸。此外，TMB 呈色液具可燃性，應儲存在低溫(2～8°C)，並遠離火源。
6. 終止液為 0.5 N 的硫酸溶液，可能導致皮膚紅腫或灼傷，應避免皮膚直接接觸。
7. 處置試劑盒中所有試劑、任何廢棄的材料，應遵循當地現行法規和良好實驗室規範的要求。
8. 此試驗的測試結果與使用者的操作技術與操作環境具高度關聯性，藉著熟悉試劑組所附的使用說明書及遵守良好的實驗室操作規範，便可獲得可靠且可重複的結果。
9. 本產品測得的 E103 值應先用尿肌酸酐(urine creatinine)進行校正，然後才能對測試結果進行臨床評估。
10. 若發生與本產品相關的嚴重事件，請盡速通知本公司或主管機關。

試劑穩定性

未開封效期為 12 個月，開封後效期見下表

<table>
<tr><th>物件</th><th colspan="2">開封後儲存條件</th></tr>
<tr><td>標準品</td><td colspan="2">回溶後的濃縮標準品 (5 µg/mL) 在 -20°C 下可穩定保存 7 天，且應避免反覆解凍。</td></tr>
<tr><td>品管物質-H、品管物質-L</td><td colspan="2">回溶後的品管物質在-20°C 下可穩定保存 14 天，且應避免反覆解凍。</td></tr>
<tr><td>E103 微孔盤</td><td rowspan="7">4 週</td><td>需放置於含乾燥劑的鋁箔袋中並存放於-10～-30°C</td></tr>
<tr><td>1000 倍濃縮抗 E103 單株抗體</td><td rowspan="2">-10～-30°C</td></tr>
<tr><td>4000 倍濃縮 HRP 共軛物</td></tr>
<tr><td>稀釋液</td><td rowspan="4">2～8°C</td></tr>
<tr><td>10 倍濃縮清洗緩衝液</td></tr>
<tr><td>呈色液 (TMB)</td></tr>
<tr><td>終止液</td></tr>
</table>

運輸條件

本產品建議在 0～9°C 條件下運送，並且不超過 5 天。

沒有提供但必須的儀器或材料

1. 可讀 450 ± 10 nm 波長之微量盤分析儀(ELISA reader)
2. 各體積的單爪微量吸管 (micropipettes) 及多爪式微量分注吸管 (multi-channel pipettes)
3. 拋棄式塑膠尖管
4. 500 mL 量筒
5. 微量離心管
6. 配製試劑所需的容器
7. 混合震盪器
8. 微型離心機
9. 去離子水
10. 盤式震盪器
11. 96 孔盤封膜

檢體採集、處理及保存

1. 收集上午的中段尿液於乾淨且乾燥的容器中(一般尿液試管)，且應避免交叉污染。
2. 尿液樣本不需額外添加保存劑或防腐劑。
3. 尿液樣品存放於不同溫層，應於下列時間內完成測量:

存放溫度	20 ~ 25°C	2 ~ 8°C	-10 ~ -30°C
最多存放時間	3 小時	3 天 (72 小時)	2 週

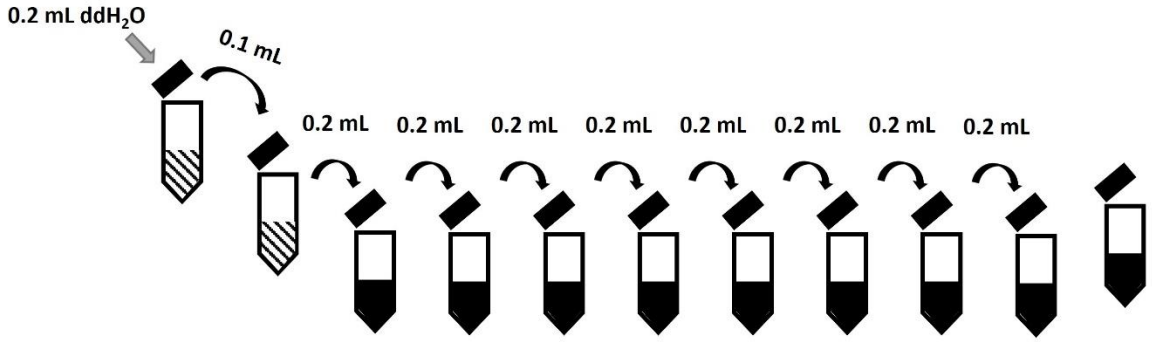
4. 尿液樣本應避免重複解凍。
5. 執行試驗之前需將尿液樣本置於室溫下回溫。
6. 尿液樣本需以 1000±20 x g 的速度離心 5 分鐘，取其上清液，並立即測定。
7. 若需要進行樣本稀釋，可利用本檢測試劑中的稀釋液進行稀釋。

試劑準備

A. 各濃度標準品配製

(1) 回溶，配製成5 µg/mL濃縮標準品：
加入 0.2 mL去離子水至本產品提供之標準品(凍乾粉末)，並靜置於室溫下10分鐘後，輕輕混合確保完全溶解。

(2) 回溶後的標準品根據下圖進行稀釋，並獲得#1 ~ #8各濃度標準品



Conc. (ng/mL) / Content in tube	Standards										
	-	-	-	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
	5000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.813	3.906	0
ddH_2O (mL)	0.2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diluent (mL)	X	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

2 x serial dilution

註： (a) 回溶的 5 µg/mL 濃縮標準品可於-20°C穩定存放7天。
(b) 配製好的#1 ~ #8標準品僅供當次使用，剩餘部分應丟棄。

B. 品管物質配製

加入 0.2 mL去離子水至本產品提供之品管物質-H與品管物質-L，並靜置於室溫下10分鐘後，輕輕混合確保完全溶解。

C. 1 倍清洗緩衝液

(1) 配製前需先將10倍濃縮清洗緩衝液恢復至室溫，並確保溶液中鹽類完全溶解無析出。
(2) 計算該次試驗所需的1倍清洗緩衝液體積。
(3) 以施作一個微孔盤為例，需將50 mL之10倍濃縮清洗緩衝液以450 mL去離子水稀釋，溫和地混合均勻後，配製成1倍清洗緩衝液方可使用。

D. 1 倍抗 E103 抗體溶液

(1) 計算該次試驗所需的1倍單株抗體溶液。
(2) 以施作一個微孔盤為例，需將8 µL之1000倍濃縮抗E103單株抗體以8 mL稀釋液進行1000倍稀釋，溫和地混合均勻後，配製成1倍單株抗體溶液方可使用。

E. 1 倍 HRP 共軛物溶液

(1) 計算該次試驗所需的1倍HRP共軛物溶液。
(2) 以施作一個微孔盤為例，需將3 µL之4000倍濃縮HRP共軛物以12 mL稀釋液進行4000倍稀釋，溫和地混合均勻後，配製成1倍HRP共軛物溶液方可使用。

檢驗流程

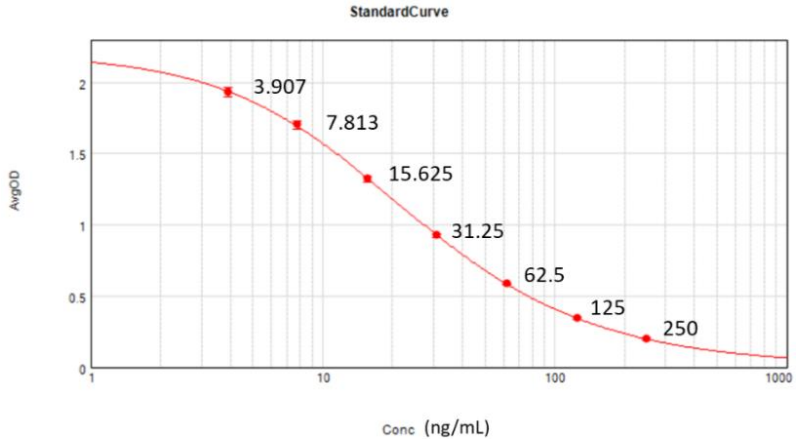
計算所需的E103微孔盤孔洞數量(含標準品、品管物質、樣品)，並將其固定於微孔盤支架中。試劑使用前需將其恢復到室溫。標準品與品管物質建議至少以二重複進行檢測。

1. 分別將50 µL之各濃度標準品(#1 ~ #8)、品管物質、樣本加入E103微孔盤之孔洞中。
2. 加入 50 µL 之 1 倍抗 E103 抗體溶液至每個孔洞中。
3. 置於盤式震盪器，於 25°C、200 rpm 的振盪條件下反應 2 小時。
4. 甩出孔洞中的液體。
5. 加入300 ~ 400 µL之1倍清洗緩衝液至每個孔洞中進行清洗。倒扣微孔盤並於吸水紙上拍打，以除去殘留的液體。此步驟另重複3次，共洗滌4次。
6. 加入100 µL之1倍HRP共軛物溶液至每個孔洞中，之後以96孔盤封膜封貼微孔盤，置於盤式震盪器，於 25°C、200 rpm的振盪條件下反應30分鐘。
7. 重複步驟4 ~ 5，進行沖洗。
8. 加入 100 µL呈色液(TMB)至每個孔洞中，並於室溫下靜置、避光反應30分鐘。
9. 加入 100 µL 終止液至每個孔洞中，輕微晃動使溶液混合均勻。
10. 在30分鐘內以微量盤分析儀讀取OD 450±10 nm 的吸光值，隨後進行檢驗結果計算及判讀。

檢驗結果計算及判讀

A. 標準曲線建立

(1) 本產品使用S形4或5參數邏輯方程式(sigmoidal 4- or 5- parameter logistic equation)製作標準曲線，可經由任何具此函數的計算軟體獲得。
(2) 以至少二重複之各濃度標準品(#1 ~ #8)的OD 450值代入方程式製作標準曲線並取得公式。Y 軸：OD 450值 (線性刻度)，X軸：標準品濃度 (ng/mL；對數刻度)。請參考下方範例圖示。
(3) 將樣本的OD 450值代入上述標準曲線公式，即可回推樣本的E103濃度(ng/mL)，以E103濃度計算E103/UCr與IVD103值（計算方法見C）。



B. 試驗品質判定

每次檢測應搭配本產品所提供的品管物質-H、品管物質-L，來判定檢測結果的品質，需在參考範圍內才可接受，規格如下：

名稱	參考範圍(ng/mL)
品管物質-H	82.78 ~ 144.35
品管物質-L	11.55 ~ 30.87

C. E103/UCr 及 IVD103 數值計算

藉由本產品所測得的 E103 濃度，需藉由尿肌酸酐(urine creatinine; UCr)進行校正才能臨床使用。計算方式如下：

$$\mathrm{E103/UCr} = \frac{\text{E103 濃度 (ng/mL)}}{\text{urine creatinine (mg/mL)}}$$

*另可用對數換算表示: $\mathrm{IVD103} = \mathrm{Log}_{10}(\mathrm{E103/UCr})$。

D. 腎功能惡化風險判讀

藉由 E103/UCr 或 IVD103 進行腎功能惡化風險判讀，流程如下:

1. 若 E103 濃度<量測範圍之下限 5.428 ng/mL，則報告 E103 數值為 “< 5.428 ng/mL”，並判定風險為“低度風險”。
2. 若 E103 濃度≥量測範圍之上限 250 ng/mL，則報告 E103 數值為 “≥ 250 ng/mL”，並判定風險為“高度風險”。
3. 若 E103 濃度在量測範圍(5.428 ~ 250 ng/mL)內，則計算 E103/UCr 或 IVD103。
   3.1. 若 E103/UCr 值< 7.53 ng/mg (或 IVD103 值< 0.877)，則判定風險為“低度風險”。
   3.2. 若 E103/UCr 值≥ 7.53 ng/mg (或 IVD103 值≥ 0.877)，則判定風險為“高度風險”。

產品性能參數

(1) 偵測極限

空白極限 (Limit of Blank)： 0.216 ng/mL;
檢測極限 (Limit of Detection)：1.901 ng/mL;
定量極限 (Limit of Quantitation)：5.428 ng/mL

(2) 線性範圍

4.90 ~ 255.39 ng/mL

(3) 量測範圍

5.428 ~ 250 ng/mL

(4) 精密度

重複性 - 藉由每天執行 3 批(三重複)重複測量 6 個樣品，並持續 20 天完成實驗室內精密度中的重複性分析，結果如下:

Sample	Mean conc. of E103 (ng/mL)	Within-run (%CV)	Run-to-run (%CV)	Day-to-day (%CV)	Total CV
Sample A	11.32	8.12	8.45	6.69	13.49
Sample B	32.09	7.57	11.63	0	13.88
Sample C	40.46	4.06	9.1	0	9.97
Sample D	59.39	5.22	3.42	4.45	7.67
Sample E	130.38	5.2	4.31	4.6	8.17
Sample F	172.92	5.51	9.17	0	10.69

再現性 - 藉由每天在 3 個地點且執行 2 批(三重複)測量 6 個樣品，並持續 5 天完成不同實驗室間的再現性驗證，結果如下:

Sample	Mean conc. of E103 (ng/mL)	Within-run (%CV)	Run-to-run (%CV)	Day-to-day (%CV)	Site-to-site (%CV)	Total CV
Sample a	8.72	12.38	9.13	16.95	10	24.98
Sample b	26.83	8.98	6.64	13.74	13.91	22.51
Sample c	39.71	8.6	5.56	12.55	15.17	22.2
Sample d	67.26	6.34	5.04	10.62	11.27	17.48
Sample e	142.57	5.66	5.11	8.33	11.05	15.8
Sample f	167.38	6.13	4.91	9.01	10.81	16.12

(5) 干擾因子

潛在干擾物	**測定最高無干擾濃度(mg/L)**
Acetaminophen	600
Ascorbic Acid	90
Albumin	1500
Direct bilirubin	1800
Creatinine	3750
Enalapril	187.5
Glucose	60000
Glibenclamide	6
Hemoglobin	375
Ibuprofen	750
Losartan	300
Metformin HCL	20000
Metronidazole	120
Salicylic Acid	37.5
Simvastatin	45
Sodium Citrate	150
Sodium oxalate	750
Trichloromethiazide	75
Urea	6250
Uric Acid	375
Urobilinogen	37.5

臨床性能與應用

臨床性能研究評估了 E103/UCr (ng/mg)作為 2 型糖尿病患者腎臟疾病進展標誌物的用途。在 294 名台灣患者（平均年齡 61 歲，55% 男性）的主要隊列研究(cohort study)中，得到 E103/UCr 的臨床評估之臨界值為 7.53 ng/mg（換算 IVD103 之臨界值為 0.877）。相較於低風險患者（E103/UCr 低於 7.53 ng/mg），高風險患者（E103/UCr 高於 7.53 ng/mg）具有較高的患者腎功能下降風險，風險比為 9.47，p 值<0.001。在荷蘭的 376 名患者（平均年齡 64 歲，66% 為男性）的研究中得到相同的風險預測結論，相較於低風險患者，高風險患者具有較高的腎功能惡化風險，風險比為 1.85，p 值<0.001。在評估腎功能退化時，E103/UCr 在兩個隊列皆顯示獨立於現行常用指標(如 UACR、eGFR)的預測力(惟在荷蘭的隊列研究中 E103/UCr 於 UACR<30 mg/g 組別對腎功能下降風險的預測能力未達顯著統計意義)，因此在臨床應用上，除了現行常用的 UACR、eGFR 指標外，醫師使用本檢測(E103/UCr)，應更可評估各指標所指示的第 2 型糖尿病的腎功能預後風險。

參考文獻

Chuang, GT et al. (2023) Urinary Fetuin-A Fragments Predict Progressive eGFR Decline in Two Independent Type 2 Diabetes Cohorts of Different Ethnicities. Am J Nephrol, DOI: 10.1159/000534514

醫療器材商/製造業者名稱：新穎生醫股份有限公司
製造業者地址：新竹縣竹北市台元街 18 號 6 樓之 1、之 2、之 3、之 5、之 6
醫療器材商地址：新竹縣竹北市台元街 18 號 6 樓之 1、之 2、之 3、之 5、之 6