

**IVD DNlite uPTM-FetA ELISA Kit**

REF: 8103106


**Enzyme immunoassay for the quantitative determination of human unique Fetuin-A with specific post translational modification (PTM) in urine**
**INTENDED USE**

The DNlite uPTM-FetA ELISA Kit is a colorimetric immunoassay to quantify unique Fetuin-A with specific post translational modification (hereafter called as E103) in urine. This product is a non-automated IVD for prognosis use and should be performed at qualified clinical laboratories by certified medical professionals, such as Medical Technologists. The concentration of E103 should be corrected by urine creatinine before applying to the clinic. The DNlite uPTM-FetA ELISA Kit is to be used in conjunction with clinical evaluation as an aid in assessing the prognosis of kidney function in type 2 diabetes and kidney transplantation recipients.

**INTENDED PATIENT POPULATION**

For patients with type 2 diabetes:	For kidney transplantation recipients:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnosis of type 2 diabetes in accordance with American Diabetes Association</li> <li>• Age <math>\geq 18</math> years</li> <li>• Not dependency of renal replacement therapy</li> <li>• Without current known malignancy</li> <li>• Without current acute or chronic infections</li> <li>• Without primary or secondary renal diseases (other than DKD)</li> <li>• Without illicit drug use</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Age <math>\geq 18</math> years kidney transplant recipient with functioning graft beyond 1 year</li> <li>• Not dependency of renal replacement therapy</li> <li>• Without current known malignancy</li> <li>• Without current acute or chronic infections</li> </ul>

**PRINCIPLE OF THE TEST**

The DNlite uPTM-FetA ELISA Kit is a competitive immunoassay. In this assay, Standards or unknown urine samples are added to a microplate pre-bounded with E103, and then mixed with anti-E103 monoclonal antibody (mAb). The monoclonal antibody recognizes E103 in Standards or unknown samples under competition in microplate wells. After incubation, the Horse Radish Peroxide (HRP) conjugated secondary antibody is added, followed by an incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate. After supplementation of stop solution, the relative reactivity is determined by absorbance measurement at 450 nanometer (nm) wavelength and plotted by comparison with a predetermined E103 standard curve.











**WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. Please note that this is a single-use device. Do not reuse the microplate wells.
2. Do not use reagents after expiration date.
3. Improper temperature exposure during all storage and assay procedures can adversely affect results.
4. Wear protective gloves during all assay procedures.
5. Being light sensitive and skin irritative, TMB Substrate should avoid direct light exposure and skin contact during all storage and assay procedures. In addition, TMB Substrate is flammable, please store it between 2 ~ 8°C and keep it away from any fire source.
6. Avoid skin contact with Stop Solution which contains 0.5 N sulfuric acid. It may cause skin irritation

and burns.


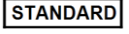
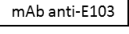
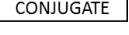
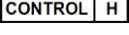
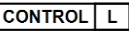
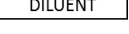

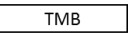

7. Disposal of any discarded materials should be in accordance with local requirements and existing regulations for good laboratory practice.
8. Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is practiced with a complete understanding of the package insert instructions and with adherence to good laboratory practice. The test results will be closely related to the operative skills of the end users.
9. The E103 value measured by this product should be corrected before the test result could be evaluated clinically.
10. If experience any serious incident that has occurred in relation to the device, please report to BPM or EC REP as well as the competent authority in your country as soon as possible.

## SYMBOLS GLOSSARY

	Consult Instructions for Use		Do Not Reuse		Use By Date
	Temperature limitation		Catalogue Number		Batch Code
	Date of manufacture		In vitro diagnostic medical device		
	Manufacturer		Authorized representative in the European Community		

## CONTENTS

Sufficient for 96 determinations

COMPONENT	QUANTITY	SYMBOL	Package
Coated Microplate with E103, READY TO USE Handle with care. See Warnings and Precautions.	96 wells: 12 x 8-well strips		Box (-20°C)
Standard, LYOPHILIZED E103 Powder	2 vials		
1000X mAb anti-E103 Monoclonal antibody anti-E103	1 vial, 10 µL		
4000X HRP Conjugate HRP conjugated anti-mouse IgG	1 vial, 10 µL		
Control-H, LYOPHILIZED E103 Powder	2 vials		
Control-L, LYOPHILIZED E103 Powder	2 vials		
Diluent Phosphate buffer with BSA, Tween-20 and ProClin-300	1 bottle, 50 mL		Box (4°C)
10X Wash Buffer Phosphate buffer with Tween-20	1 bottle, 50 mL		
TMB Substrate 0.1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine with Methanol and Acetone Light sensitive and flammable. See Warnings and Precautions.	1 bottle, 20 mL		
Stop Solution 0.5 N sulfuric acid Handle with care. See Warnings and Precautions.	1 bottle, 20 mL		

## STORAGE AND STABILITY

The shelf life of the DNlite uPTM-FetA ELISA kit is **12 months**, and the components in the reagents should be stored according to the recommendations in the table below.

COMPONENT	Open-vial	
	Expiry date	Temperature (°C)
Standard	Reconstituted Standards (5 µg/mL) are stable for 7 days at -10 ~ -30°C and repeated freeze-thaw cycles should be avoided.	
Control-H & Control-L	Reconstituted Control-H & Control-L are stable for 14 days at -10~-30°C and repeated freeze-thaw cycles should be avoided.	
Coated Microplate	4 weeks (Need to be within the expiry date of each component)	-10 ~ -30°C (Need to be placed in an aluminum foil bag containing desiccant)
1000X mAb anti-E103		-10 ~ -30°C
4000X HRP Conjugate		
Diluent		2 ~ 8°C
10X Wash Buffer		
TMB Substrate		
Stop Solution		

### TRANSPORTATION CONDITION

It is recommended to transport the DNlite uPTM-FetA ELISA Kit at 0°C ~ 9°C for no more than 5 days.

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Urinary creatinine assay with regulatory approval or clearance
- Precision single micropipettes or multi-channel pipettes
- Microcentrifuge tubes and disposable tips
- Vortex mixer and microcentrifuge
- Microplate reader capable of endpoint measurement at 450±10 nm
- Plastic container for the preparation of reagents
- Graduated cylinder 500 mL
- Orbital shaker
- Adhesive plate seals
- ddH<sub>2</sub>O

### SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

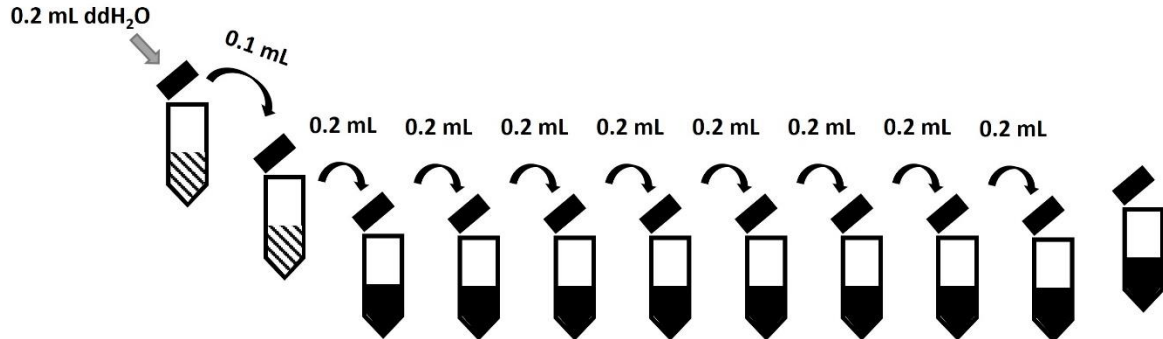
1. Morning urine samples must be collected in clean and dry containers. Avoid cross contamination.
2. No additives or preservatives are required to preserve the integrity of urine samples.
3. Urine samples can be temporarily stored at 20 ~ 25°C for 3 hours or 2 ~ 8°C for 72 hours before measurement. If sample isn't measured within the 24 to 72-hour period mentioned above, urine samples shall be stored at -10 ~ -30°C for up to 2 weeks.
4. Avoid repeated freezing and thawing of the urine samples.
5. Before performing the assay, please bring the sample temperature back to room temperature.
6. Centrifuge urine samples for 5 minutes at 1,000±20 g. Take supernatant and assay immediately.
7. Use Diluent for sample dilution if necessary.

### REAGENTS PREPARATION

#### A. Prepare Standard Solution

Reconstitute the E103 Standard with 0.2 mL distilled or deionized water, sit for 10 minutes at room temperature until completely dissolved and mix gently. The reconstituted E103 Standard is now at a concentration of 5 µg/mL. Dilute the 5 µg/mL E103 Standard with Diluent by 5-fold, then mix gently

to get a 1 µg/mL E103 Standard. Dilute the 1 µg/mL E103 Standard with Diluent by 2-fold, then mix gently to get a 500 ng/mL E103 Standard. Procedures for the serial dilution to generate Standards (Standard #1 ~ #7) for establishing E103 standard curve are shown in the following table and all Standards must be prepared and mixed well immediately prior to use. Please note that Standard #8 only constitutes 0.2 ml of Diluent.



Content in tube	Conc. (ng/mL)	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 <sub>2</sub> O (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**

Note: (a) Reconstituted Standards (5 µg/mL) are stable for 7 days at -10 ~ -30°C  
(b) Standards #1-#8 should be used after each preparation. Unused portion should be discarded.

### B. Control-H and Control-L

Reconstitute the E103 Controls with 0.2 mL distilled or deionized water, sit for 10 minutes at room temperature until completely dissolved and mix gently.

### C. 1X Wash Buffer

Recover 10X Wash Buffer to room temperature prior to use until all the salt crystals are dissolved. Calculate the required amount of 1X Wash Buffer for each assay. For each microplate, mix 50 mL 10X Wash Buffer with 450 mL distilled or deionized water. Mix uniformly but gently.

### D. 1X mAb anti-E103

Calculate the required amount of 1X mAb anti- E103 for each assay, and mix 1000X mAb anti-E103 with Diluent according to the amount required. For each microplate, mix 8 µL 1000X mAb anti-E103 with 8 mL Diluent. Mix uniformly but gently.

### E. 1X HRP Conjugate

Calculate the required amount of 1X HRP Conjugate for each assay, and mix 4000X HRP Conjugate with Diluent according to the amount required. For each microplate, mix 3 µL 4000X HRP Conjugate with 12 mL Diluent. Mix uniformly but gently.

## ASSAY PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all Standards, Controls, and urine samples and secure them in a holder. **Recover all reagents to room temperature prior to use.**

1. Respectively, add 50 µL of Standard solution #1-#8 (in duplicate), Control-H, Control-L, and urine samples into each well of E103 Coated Microplate.

2. Add 50  $\mu\text{L}$  of 1X mAb anti-E103 into each well with either Standard solution (#1-#8) or urine samples already added.
3. Incubate for 2 hours at 25°C and 200 rpm on an orbital shaker. Add adhesive plate seals to the microplate during incubation to prevent substance from unintentionally falling into the wells.
4. After the incubation, discard the contents in the wells.
5. Wash each well with 300-400  $\mu\text{L}$  1X Wash Buffer. Discard the contents and sharply strike the wells on absorbent paper to remove residual liquid. Wash for a total of 4 times.
6. Add 100  $\mu\text{L}$  1X HRP Conjugate into each well. Incubate the microplate for 30 minutes at 25°C and 200 rpm on an orbital shaker. During incubation add adhesive plate seals as in Step 3.
7. After the incubation, discard the contents in the wells and wash the wells as described in Step 4 and Step 5.
8. Add 100  $\mu\text{L}$  TMB Substrate into each well. Incubate in the dark for 30 minutes at room temperature.
9. Add 100  $\mu\text{L}$  Stop Solution into each well. Mix by a brief shaking until the mixture become homogeneous.
10. Determine the absorbance at  $450\pm 10$  nm within 30 minutes and calculate the results.

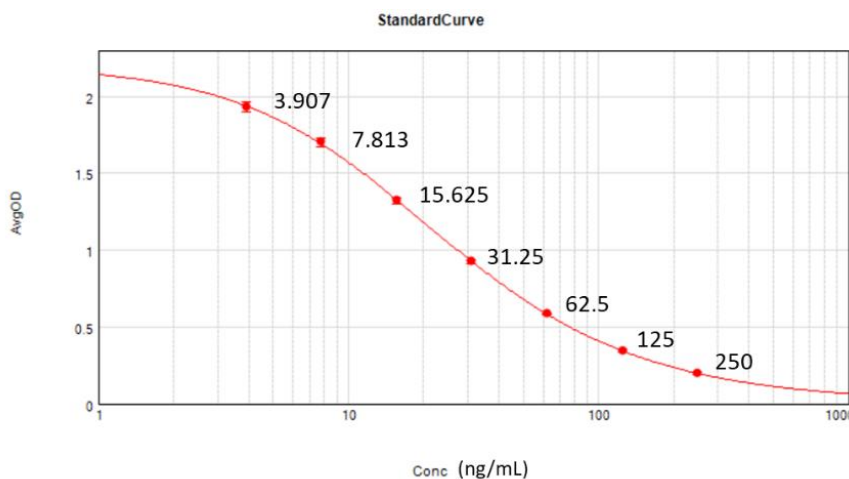
## INDICATION OF INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

When the measurement of the Control-H or Control-L is out of the expected reference range, it may indicate deterioration of the reagents. Associated test results may be invalid and samples need to be retested. Assay recalibration may be necessary.

## DATA ANALYSIS

### A. Calculation

1. The standard curve of this assay fits to a sigmoidal 4- or 5- parameter logistic equation. The results of curve-fitting can be obtained with any computer program having a 4- or 5- parameter logistic function.
2. Graph the standard curve by plotting the OD.450 values on the Y-axis with linear scale against the standard concentrations on the X-axis with logarithm scale. (Use the mean OD.450 values of the duplicate for each concentration of the standard solution.)
3. The concentration of E103 (ng/mL) in patient urine samples can be obtained by inputting the OD.450 value and inversing fitted standard curve.



**B. Quality criteria of assay**

The quality control (Control-H and Control-L) should be included in each experiment for quality assurance. The suggested reference range of quality control is listed below. (Each testing lab shall establish its own reference range.)

	Control-H	Control-L
E103 value (ng/mL)	82.78 ~ 144.35	11.55 ~ 30.87

**C. Clinical application**

All concentration of E103 need to be urinary creatinine-corrected for clinical use. The calculation is as follows:

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

**D. The risk of kidney function decline progression**

1. The risk classification of kidney function decline progression in **type 2 diabetes patients** shall be based on E103/UCr. Please follow the procedure below:
  - I. If E103(ng/mL) < 5.428 ng/mL (LoQ), then E103 shall be reported as “<5.428 ng/mL”, and classify as “low risk”.
  - II. If E103(ng/mL) ≥ 250 ng/mL (upper limit of measuring range), then E103 shall be reported as “≥ 250 ng/mL” and classify as “high risk”.
  - III. If E103(ng/mL) is between 5.428 ~ 250 ng/mL, then calculate E103/UCr ◦
    - i. If E103/UCr < 7.53 ng/mg, then classify as “low risk”.
    - ii. If E103/UCr ≥ 7.53 ng/mg, then classify as “high risk”.
  
2. The risk classification of **graft failure in kidney transplantation recipients** shall be based on E103/UCr. Please follow the procedure below:
  - I. If E103(ng/mL) < 5.428 ng/mL (LoQ), then E103 shall be reported as “< 5.428 ng/mL”, and classify as “low risk”.
  - II. If E103(ng/mL) ≥ 250 ng/mL (upper limit of measuring range), then E103 shall be reported as “≥ 250 ng/mL” and classify as “high risk”.
  - III. If E103(ng/mL) is between 5.428 ~ 250 ng/mL, then calculate E103/UCr ◦
    - i. If E103/UCr < 29.1 ng/mg, then classify as “low risk”.
    - ii. If E103/UCr ≥ 29.1 ng/mg, then classify as “high risk”.

**ANALYTICAL PERFORMANCE**

**1. Detection capability**

Limit of Blank (LoB) = 0.216 ng/mL;  
 Limit of Detection (LoD) = 1.901 ng/mL;  
 Limit of Quantitation (LoQ) = 5.428 ng/mL

**2. Linearity**

4.90 ~ 255.39 ng/mL

**3. Measuring range**

5.428 ~ 250 ng/mL

#### 4. Precision

##### i. Repeatability

Samples were tested in triplicate. Reagents from three different lots were used each day for 20 days. Variation of within-run, run-to-run, and day-to-day are listed below.

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

##### ii. Reproducibility

Samples were tested in triplicate with two runs each day. Tests were performed in three independent laboratories for 5 days. Variation of within-run, run-to-run, day-to-day, and site-to-site are listed below.

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. Interference

Potential interference	The highest non-interference concentration (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

## 6. Metrological Traceability

The E103 Standard value is assigned to be traceable to arbitrarily defined reference materials (ARM) according to international standard ISO17511. The ARM is an analyte manufactured by BPM. The relative bias of all batches E103 standard are less than 15 %. The E103 Control-H and Control-L values are assigned to be traceable to E103 Standard.

## CLINICAL PERFORMANCE AND APPLICATION

These clinical performance studies evaluated the use of E103/UCr (ng/mg) as a marker for (1) kidney disease progression in type 2 diabetes patients and (2) graft failure in kidney transplantation recipients (KTRs).

For (1), the clinical cut-off for E103/UCr was determined in a primary cohort of 294 Taiwanese patients (mean age 61, 55% male) as 7.53 ng/mg. Results showed that patients with E103/UCr above 7.53 ng/mg had a higher risk of kidney function decline compared to those with low values (hazard ratio 8.94, p-value<0.001). Results were validated in a separate cohort of 376 patients from the Netherlands (mean age 64, 66% male) where similar findings were observed. High-risk patients had a significantly higher risk of worsening renal function (hazard ratio 1.87, p-value <0.001).

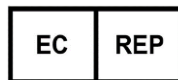
For (2), the E103/UCr clinical cut-off 29.1 ng/mg was determined in a primary set of 267 KTRs (mean age 53.9, 57% male). Results showed that KTRs with E103/UCr above 29.1 ng/mg had a higher risk of kidney graft failure than those with low values (hazard ratio 4.98, p-value<0.001). In the validation set of 267 KTRs (mean age 52.32, 58% male), KTRs with E103/UCr above 29.1 ng/mg had a significantly higher risk of kidney graft failure than those with low E103/UCr values (hazard ratio 4.51, p-value <0.001).

## REFERENCES

1. 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
2. Alkaff, FF et al. (2023) Urinary Post-Translationally Modified Fetuin-A Protein Is Associated with Increased Risk of Graft Failure in Kidney Transplant Recipients. Am J Nephrol, DOI: 10.1159/000534829



**Bio Preventive Medicine Corp.**  
6F-1, 6F-2, 6F-3, 6F-5, 6F-6,  
No.18 Taiyuan St., Zhubei City,  
Hsinchu County, 30265 Taiwan



**EMERGO EUROPE**  
Westervoortsedijk 60,  
6827 AT Arnhem  
The Netherlands

### AUSTRALIAN SPONSOR:

**Emergo Australia**  
Level 20 Tower II, Darling Park  
201 Sussex Street  
Sydney, NSW 2000, Australia

**IVD DNlite uPTM-FetA ELISA**

REF: 8103106

**Inmunoensayo de Encimas para determinación cuantitativa de Fetuina-A única humana con modificación postraduccional (PTM) en orina****USO PREVISTO**

El Kit DNlite uPTM-FetA ELISA es un inmunoensayo colorimétrico para cuantificar la Fetuina-A única con modificación postraduccional específica (de aquí en adelante llamada como E103) en orina. Este producto es un IVD no automatizado para uso de prognosis y debe ser realizado en laboratorios clínicos calificados por profesionales médicos certificados, tales como Técnicos Médicos. La concentración de E103 debe corregirse por creatinina en orina antes de presentarse en la clínica. El Kit DNlite uPTM-FetA ELISA es para ser usado en conjunto con la evaluación clínica como un apoyo en la asistencia del pronóstico de diabetes tipo 2 de la función hepática y receptores de trasplantes renales.

**POPULACIÓN ESPERADA DE PACIENTES**

Para pacientes con diabetes tipo 2:	Para receptores de trasplante renal:
<ul style="list-style-type: none"><li>• Diagnóstico de diabetes tipo 2 de acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes.</li><li>• Edad <math>\geq</math> 18 años.</li><li>• Sin dependencia de una terapia de reemplazo renal.</li><li>• Sin tumores malignos actualmente conocidos.</li><li>• Sin infecciones agudas o crónicas.</li><li>• Sin enfermedad renal primaria o secundaria (excepto nefropatía diabética).</li><li>• Sin consumir drogas ilícitas.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Diagnóstico de diabetes tipo 2 de acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes.</li><li>• Sin dependencia de una terapia de reemplazo renal.</li><li>• Sin tumores malignos actualmente conocidos.</li><li>• Sin infecciones agudas o crónicas.</li></ul>

**PRINCIPIO DE LA PRUEBA**











El Kit DNlite uPTM-FetA ELISA es un inmunoensayo competitivo. En este ensayo, los Estándares o muestras de orina desconocidas se agregan a una microplaca pre-unida con E103, y luego mezclada con anticuerpo monoclonal anti-E103 (mAb). El anticuerpo monoclonal reconoce el E103 en los estándares o muestras desconocidas bajo competición en los pozos de la microplaca. Después de la incubación, se agrega el anticuerpo secundario conjugado Peroxidasa de Rábano (HRP), seguido por una incubación con un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Después de la administración de la Solución Stop, se determina la reactividad relativa mediante la medición de la absorbancia una longitud de onda de 450 nanómetros (nm) y trazada por comparación con una curva estándar de E103 predeterminado.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

1. Tenga en cuenta que este es un dispositivo de un solo uso. No reutilizar los pozos de las microplacas.
2. No utilizar reactivos después de su fecha de expiración.
3. La exposición a temperatura inadecuada durante todo el almacenaje y procedimientos del ensayo puede afectar adversamente los resultados.
4. Utilizar guantes protectores durante todos los procedimientos del ensayo.
5. Al ser sensible a la luz e irritante para la piel, debe evitarse la exposición directa a la luz y el contacto con la piel del Sustrato TMB durante todo su almacenaje y procedimientos de ensayo. El Sustrato TMB es inflamable, por favor almacene entre 2 ~ 8 °C y manténgalo alejado de cualquier fuente de fuego.

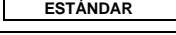
6. Evitar el contacto con la piel con la Solución Stop la cual contiene 0.5 N de ácido sulfúrico. Puede causar irritación en la piel y quemaduras.
7. La eliminación de cualquier material descartado debe hacerse de acuerdo con los requerimientos locales y los reglamentos existentes de buenas prácticas de laboratorio.
8. Los resultados confiables y reproducibles se obtendrán cuando el procedimiento de ensayo sea practicado con un completo entendimiento de las instrucciones del paquete y con adherencia a las buenas prácticas de laboratorio. Los resultados de la prueba estarán muy relacionados con las habilidades operativas de los usuarios finales.
9. El valor del E103 medido por este producto debe ser corregido antes que el resultado de la prueba pueda ser evaluado clínicamente.
10. Si ha experimentado cualquier incidente serio ocurrido en relación con el dispositivo, por favor reportarlo a BPM o EC REP así como a la autoridad competente en su país tan pronto como sea posible.

## GLOSARIO DE SÍMBOLOS

	Consultar Instrucciones de Uso		No Reutilizar		Usar Antes De
	Limitación de Temperatura		Número de Catálogo		Código Lote
	Fecha de Fabricación		Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro		
	Fabricante		Representante Autorizado en la Comunidad Europea		

## CONTENIDO

Suficiente para 96 determinaciones

COMPONENTE	CANTIDAD	SÍMBOLO	Empaque
Microplaca recubierta con E103, LISTA PARA USAR Manejar con cuidado. Ver Advertencias y precauciones.	96 pozos: tiras de pozo de 12 x 8		Caja (-20 °C)
Estándar, Polvo LIOFILIZADO	2 viales		
mAb anti-E103 1000X Anticuerpo monoclonal anti-E103	1 vial, 10 µL		
Conjugado HRP 4000X HRP conjugado anti-mouse IgG	1 vial, 10 µL		
Control-H, Polvo LIOFILIZADO	2 viales		
Control-L, Polvo LIOFILIZADO	2 viales		
Diluyente, LISTO PARA USAR Buffer de fosfato con BSA, Twain-20 y ProClin-300	1 botella, 50 mL		Baja (4 °C)
Tampón de Lavado 10X Buffer de fosfato con Tween-20	1 botella, 50 mL		
Sustrato TMB, LISTO PARA USAR 0,1% 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con metanol y acetona. Sensible a la luz e inflamable. Ver advertencias y precauciones.	1 botella, 20 mL		
Solución Stop, 0.5 N ácido sulfúrico, Manejar con cuidado. Ver Advertencias y precauciones.	1 botella, 20 mL		

## ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

El tiempo de vida del Kit DNlite uPTM-FetA ELISA es de **12 meses**, y los componentes en los reactivos deben ser almacenados de acuerdo con las recomendaciones en la siguiente tabla:

COMPONENTE	Vial Abierto	
	Fecha Expiración	Temperatura °C)
Estándar	Los estándares reconstituidos (5 µg/mL) son estables por 7 días a -10 ~ 30°C y deben evitarse los ciclos de congelado-descongelado repetidos.	
Control-H & Control-L	El Control-H & Control-L son estables por 14 días a -10 ~ 30°C y deben evitarse los ciclos de congelado-descongelado repetidos.	
Microplaca recubierta	4 semanas (Necesitan estar dentro de la fecha de expiración de cada componente)	-10 ~ -30 °C (Necesitan ser colocados en una bolsa de foil de aluminio que contenga disecante)
mAb anti-E103 1000X		-10 ~ -30 °C
Conjugado HRP 4000X		
Diluyente		
Tampón de Lavado 10X		
Sustrato TMB		2 ~ 8 °C
Solución Stop		

## CONDICIONES DE TRANSPORTE

Se recomienda transportar el Kit DNlite uPTM-FetA ELISA a 0 °C ~ 9 °C por no más de 5 días.

## MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROPORCIONADOS

- Análisis de creatinina urinaria con aprobación o autorización regulatoria
- Micropipetas individuales de precisión o pipetas multi canal
- Tubos de micro centrifugación y puntas desechables
- Mezclador de Vórtice y micro centrifugación
- Lector de microplaca capaz de medición de punto final a  $450 \pm 10$  nm
- Recipiente plástico para preparación de reactivos
- Cilindro graduado de 500 mL
- Agitador Orbital
- Sellos adhesivos para para placa
- ddH<sub>2</sub>O

## RECOLECCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

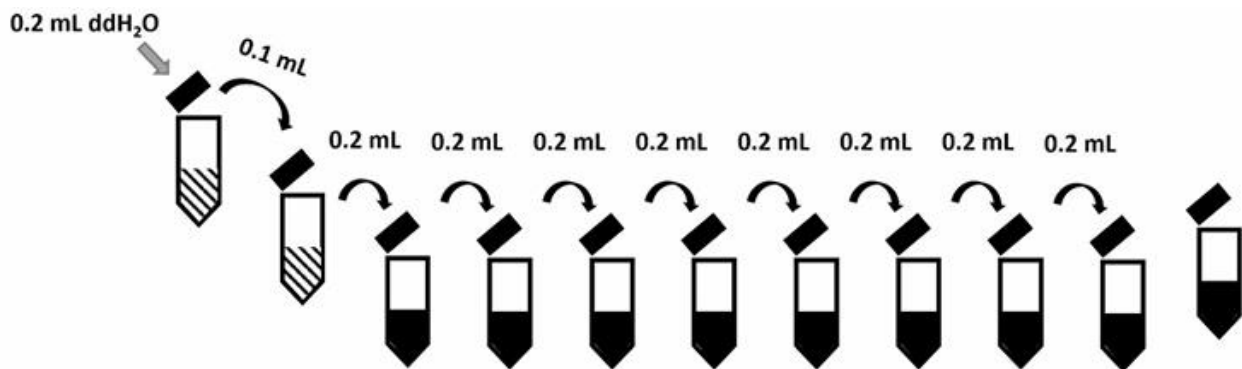
1. Las muestras de orina matutina tienen que ser recolectadas en recipientes limpios y secos. Evitar la contaminación cruzada.
2. No se requieren aditivos o conservantes para mantener la integridad de las muestras de orina.
3. Las muestras de orina pueden ser almacenadas temporalmente entre 20 ~ 25 °C por 3 horas o 2 ~ 8 °C por 72 horas antes de la medición. Si la muestra no se mide dentro del período de 24 a 72 horas antes mencionado, las muestras de orina deberán almacenarse a -10 ~ -30 °C por hasta 2 semanas.
4. Evitar congelar y descongelar repetidamente las muestras de orina.
5. Antes de realizar el ensayo, por favor regrese la temperatura de la muestra a temperatura ambiente.
6. Centrifugar las muestras de orina por 5 minutos a  $1,000 \pm 20$  g. Tomar el sobrenadante y ensayar inmediatamente.
7. Usar el diluyente para diluir la muestra si es necesario.

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### A. Preparar la Solución Estándar

Reconstituir el Estándar E103 con 0.2 mL de agua destilada o desionizada, dejarlo reposar por 10 minutos a temperatura ambiente hasta que esté completamente disuelto y mezclar con cuidado. El Estándar E103 reconstituido está ahora en una concentración de 5 µg/mL. Diluir el Estándar E103 a 5 µg/mL con diluyente por 5 veces, luego mezclarlo con cuidado para obtener un Estándar E103 a 1 µg/mL. Diluir el Estándar E103 a 1 µg/mL por 2 veces, luego mezclarlo cuidadosamente para obtener un Estándar E103 500 ng/mL. Los procedimientos para la dilución serial para general

Estándares (Estándar #1 ~ 7) para establecer la curva del estándar E103 se muestran en la siguiente tabla y todos los estándares tiene que ser preparados y mezclados muy bien inmediatamente antes de su uso. Por favor notar que el Estándar #8 solamente constituye 0.2 ml del Diluyente.



Contenido en el Tubo	Conc. (ng/mL)	Estándares									
	-	-	-	#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 <sub>2</sub> O (mL)	0.2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diluyente (mL)	X	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

**Dilución serial 2 x**

Note: (a) Los estándares reconstituidos (5 µg/mL) son estables durante 7 días a una temperatura de -10 ~ -30°C.  
(b) Los estándares #1-#8 deben utilizarse después de cada preparación. La parte no utilizada se debe desechar.

**B. Control-H & Control-L**

Reconstituir los Controles E103 con 0.2 mL de agua destilada o desionizada, dejar descansar por 10 minutos a temperatura ambiente hasta que esté completamente disuelto y mezclar con cuidado.

**C. Tampón de Lavado 1X**

Recuperar el Tampón de Lavado 10X a temperatura ambiente antes de usarlo, hasta que todos los cristales de sal estén disueltos. Calcular la cantidad requerida de Tampón de Lavado 1X para cada ensayo. Para cada microplaca, mezclar 50 mL de Tampón de Lavado 10X con 450 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar uniformemente, pero con cuidado.

**D. mAb anti-E103 1X**

Calcular la cantidad requerida de mAb anti-E103 1X para cada ensayo, y mezclar mAb anti-E103 1000X con el Diluyente de acuerdo con la cantidad requerida. Para cada microplaca, mezclar 8 µL de mAb anti-E103 1000X con 8 mL de Diluyente. Mezclar uniformemente, pero con cuidado.

**E. Conjugado HRP 1X**

Calcular la cantidad requerida de Conjugado HRP 1X para cada ensayo, y mezclar el Conjugado HRP 4000X con el Diluyente de acuerdo con la cantidad requerida. Para cada microplaca, mezclar 3 µL de Conjugado HRP 4000X con 12 mL de Diluyente. Mezclar uniformemente, pero con cuidado.

**PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

Preparar suficientes módulos de microplacas para todos los Estándares, Controles (CTLs), y muestras de orina y asegurarlos en un retenedor. **Recuperar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de usarlos.**

1. Respectivamente, agregar 50 µL de solución Estándar #1-#8 (en duplicado), CTL-H, CTL-L, y muestras de orina en cada pozo de Microplaca Recubierta E103.
2. Agregar 50 µL de mAb anti-E103 1X en cada pozo ya sea con solución Estándar (#1-#8) o muestras de orina ya agregadas.
3. Incubar por 2 horas a 25 °C y 200 rpm en un agitador orbital. Selle la microplaca con cinta adhesiva durante la incubación para evitar que la sustancia caiga involuntariamente en los pocillos.
4. Después de la incubación, desechar el contenido de los pozos.
5. Lavar cada pozo bien con 300-400 µL de Tampón de Lavado 1X. Desechar el contenido y golpear fuerte-mente los pozos sobre papel absorbente para remover el líquido residual. Lavar un total de 4 veces.
6. Agregar 100 µL de Conjugado HRP 1X en cada pozo. Incubar la microplaca por 30 minutos a 25°C y 200 rpm en un agitador orbital. Durante la incubación, selle la microplaca como en el Paso 3.
7. Después de la incubación, desechar el contenido en los pozos y lavar los pozos como se describe en el paso 4 y 5.
8. Agregar 100 µL de Sustrato TMB en cada pozo. Incubar en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Agregar 100 µL de Solución Stop en cada pozo. Mezclar con un movimiento breve hasta obtener una mezcla se vuelva homogénea.
10. Determinar la absorbancia a  $450 \pm 10$  nm en 30 minutos y calcular los resultados.

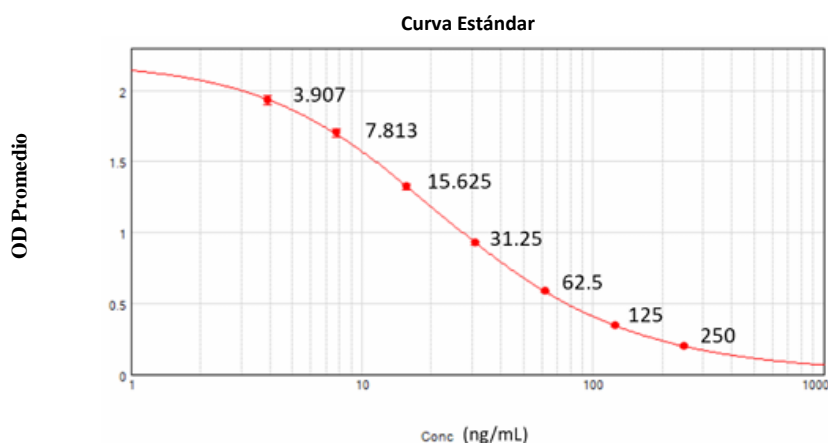
## INDICACIÓN DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando la medición del Control-H o del Control-L está fuera del rango de referencia esperado, puede indicar un deterioro de los reactivos. Los resultados asociados a las pruebas pueden no ser válidos y las muestras deben volver a analizarse. Puede ser necesario recalibrar las pruebas.

## ANÁLISIS DE DATOS

### A. Cálculo

1. La curva estándar de este ensayo se ajusta a la ecuación logística sigmoideal de 4- o 5- parámetros. Los resultados del ajuste de curvas pueden obtenerse con cualquier programa de computadora que tenga función logística de 4- o 5- parámetros.
2. Graficar la curva estándar trazando los valores de OD.450 en el eje-Y con escala lineal contra las concentraciones estándar en el eje-X con escala logarítmica. (Usar la media de los valores OD.450 del duplicado para cada concentración de la solución estándar.)
3. La concentración de E103 (ng/mL) en las muestras de orina de pacientes pueden obtenerse al introducir el valor OD.450 e invirtiendo la curva estándar ajustada.



## B. Criterio de Calidad del ensayo

El control de Calidad (Control-H y Control-L) deben ser incluidos en cada experimento para garantía de calidad. El rango de control de calidad de referencia sugerido se lista abajo. (Cada Lab. de Prueba deberá establecer su propio rango de referencia.)

	Control-H	Control-L
Valor E103 (ng/mL)	82.78 ~ 144.35	11.55 ~ 30.87

## C. Aplicación clínica

Toda concentración de E103 necesita ser corregida para creatinina urinaria para su uso clínico. El cálculo es el siguiente:

$$E103/UCr = \frac{E103 \text{ (ng/mL)}}{\text{Creatinina en orina (mg/mL)}}$$

## D. El riesgo de la progresión del descenso de la función renal

- La clasificación de riesgo de la progresión del descenso de la función renal en **pacientes con diabetes tipo 2** se basará en E103/UCr. Por favor seguir este procedimiento:
  - Si E103 (ng/mL) < 5.428 ng/mL (LoQ), entonces E103 será reportado como “<5.428 ng/mL”, y clasificado como de “bajo riesgo”
  - Si E103 (ng/mL) ≥ 250 ng/mL (límite superior del rango de medición), entonces E103 será reportado como “≥ 250 ng/mL” y clasificado como de “alto riesgo”.
  - Si E103 (ng/mL) está entre 5.428 ~ 250 ng/mL, entonces calcular E103/UCr.
    - Si E103/UCr < 7.53 ng/mg, entonces clasificarlo como de “bajo riesgo”.
    - Si E103/UCr ≥ 7.53 ng/mg, entonces clasificarlo como de “alto riesgo”.
- El riesgo de clasificación de **fallo del injerto en receptores de trasplante renal** se basará en E103/UCr. Por favor seguir este procedimiento:
  - Si E103 (ng/mL) < 5.428 ng/mL (LoQ), entonces E103 será reportado como “<5.428 ng/mL”, y clasificado como de “bajo riesgo”
  - Si E103 (ng/mL) ≥ 250 ng/mL (límite superior del rango de medición), entonces E103 será reportado como “≥ 250 ng/mL” y clasificado como de “alto riesgo”.
  - Si E103 (ng/mL) está entre 5.428 ~ 250 ng/mL, entonces calcular E103/UCr.
    - Si E103/UCr < 29.11 ng/mg, entonces clasificarlo como de “bajo riesgo”.
    - Si E103/UCr ≥ 29.11 ng/mg, entonces clasificarlo como de “alto riesgo”.

## DESEMPEÑO ANALÍTICO

### 1. Capacidad de Detección

Límite del Blanco (LoB) = 0.216 ng/mL;  
 Límite de Detección (LoD) = 1.901 ng/mL  
 Límite de Cuantificación (LoQ) = 5.428 ng/mL

### 2. Linealidad

4.90 ~ 255.39 ng/mL

### 3. Rango de Medición

5.428 ~ 250 ng/mL

#### 4. Precisión

##### i. Repetibilidad

Las muestras fueron probadas en triplicado. Se usaron reactivos de tres diferentes lotes cada día por 20 días. La Variación de dentro de un ciclo, ciclo a ciclo, y día a día se listan abajo.

Muestra	Conc. Media de E103 (ng/mL)	Dentro del Ciclo (CV %)	Ciclo a Ciclo (CV %)	Día a Día (CV %)	Total CV
Muestra A	11.32	8.12	8.45	6.69	13.49
Muestra B	32.09	7.57	11.63	0	13.88
Muestra C	40.46	4.06	9.1	0	9.97
Muestra D	59.39	5.22	3.42	4.45	7.67
Muestra E	130.38	5.2	4.31	4.6	8.17
Muestra F	172.92	5.51	9.17	0	10.69

##### ii. Reproducibilidad

Las muestras se probaron en triplicado con dos ciclos cada día. Las pruebas se realizaron en tres laboratorios independientes por 5 días. La variación de dentro del ciclo, ciclo a ciclo, día a día, y sitio a sitio se lista abajo.

Muestra	Conc. Media de E103 (ng/mL)	Dentro del ciclo (CV %)	Ciclo a Ciclo (CV %)	Día a Día (CV %)	Sitio a Sitio (CV %)	Total CV
Muestra a	8.72	12.38	9.13	16.95	10	24.98
Muestra b	26.83	8.98	6.64	13.74	13.91	22.51
Muestra c	39.71	8.6	5.56	12.55	15.17	22.2
Muestra d	67.26	6.34	5.04	10.62	11.27	17.48
Muestra e	142.57	5.66	5.11	8.33	11.05	15.8
Muestra f	167.38	6.13	4.91	9.01	10.81	16.12

#### 5. Interferencia

Interferencia Potencial	La concentración más alta de no interferencia (mg/L)
Acetaminofén	600
Ácido Ascórbico	90
Albúmina	1500
Bilirrubina Directa	1800
Creatinina	3750
Enalapril	187.5
Glucosa	60000
Glibenclamida	6
Hemoglobina	375
Ibuprofeno	750
Losartán	300
Metformina HCL	20000
Metronidazol	120
Ácido Salicílico	37.5
Simvastatina	45
Citrato de Sodio	150
Oxalato de Sodio	750
Triclorometiazida	75
Urea	6250
Ácido Úrico	375
Urobilinógeno	37.5

## 6. Trazabilidad Metrológica

El valor estándar E103 se asigna para que sea trazable a materiales de referencia definidos arbitrariamente (ARM) de acuerdo con la norma internacional ISO17511. El ARM es un analito fabricado por BPM. El sesgo relativo de todos los lotes estándar E103 es inferior al 15 %. Los valores de control H y control L de E103 se asignan para que sean trazables al estándar E103.

## DESEMPEÑO CLÍNICO Y APLICACIÓN

Estos estudios de desempeño clínico evaluaron el uso de E103/UCr (ng/mg) como un marcador para (1) progresión de enfermedad renal en pacientes con diabetes tipo 2 y (2) fallo del injerto en receptores de trasplante renal (KTRs).

Para (1), el corte clínico de E103/UCr se determinó en una cohorte primaria de 294 pacientes taiwaneses (edad media 61, 55% hombres) como 7.53 ng/mg. Los resultados mostraron que los pacientes con E103/UCr por encima de 7.53 ng/mg tenían un mayor riesgo de descenso de función renal comparado con aquellos con valores bajos (relación de riesgo de 8.94, valor-p>0.001). Los resultados fueron validados en una cohorte separada de 376 pacientes de los Países Bajos (edad media de 64, 66% hombres) en donde se observaron resultados similares. Los pacientes de alto riesgo tuvieron un riesgo significativamente más alto de empeoramiento de la función renal (relación de riesgo de 1.87, valor-p<0.001).

Para (2), se determinó el punto de corte clínico E103/UCr 29.11 ng/mg en un grupo primario de 267 KTRs (edad media 53.9, 57% hombres). Los resultados mostraron que los KTRs con E103 por encima de 29.11 ng/mg tuvieron un mayor riesgo de fallo de injerto renal que aquellos con valores bajos (relación de riesgo de 4.98, valor-p<0.001). En grupo de validación de 267 KTRs (edad media 52.35, 58% hombres), los KTRs con E103/UCr por sobre 29.11 ng/mg tuvieron un riesgo significativamente más alto de fallo del injerto renal que aquellos con valores E103/UCr bajos (relación de riesgo 4.51, valor-p<0.001).

## REFERENCIAS

1. Chuang, GT et al. (2023) Los Fragmentos de Fetuina-A Urinaria Predicen Descenso Progresivo de la eGFR en Dos Cohortes Independientes de Diabetes Tipo 2 de Diferentes Etnicidades. Am J Nephrol, DOI: 10.1159/000534514
2. Alkaff, FF et al. (2023) La Proteína Fetuina-A Modificada Postraduccionalmente en Orina se Asocia con un Mayor Riesgo de Fallo del Injerto en Receptores de Trasplante Renal. Am J Nephrol, DOI: 10.1159/000534829



**Bio Preventive Medicine Corp.**  
6F-1, 6F-2, 6F-3, 6F-5, 6F-6,  
No.18 Taiyuan St., Zhubei City,  
Hsinchu County, 30265 Taiwan  
Teléfono: +886 3 56 01816



**EMERGO EUROPE**  
Westervoortsedijk 60,  
6827 AT Arnhem  
The Netherlands  
Países Bajos

**AUSTRALIAN SPONSOR:**  
**Emergo Australia**  
Level 20 Tower II, Darling Park  
201 Sussex Street  
Sydney, NSW 2000, Australia