

IDK[®] Gallensäuren

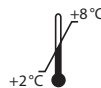
Zur in-vitro-Bestimmung der Gallensäuren in Serum

IDK[®] Bile Acids

For the in vitro determination of bile acids in serum

Gültig ab / Valid from 2021-03-18

REF K 7877W



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Lagerung</i>	4
<i>Probenvorbereitung</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	6
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	7
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Gallensäuren aus Serum. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Gallensäuren sind Endprodukte des Cholesterinstoffwechsels der Leber und werden zusammen mit den weiteren Bestandteilen der Galle, wie z. B. Cholesterin, Bilirubin, Phospholipiden und Proteinen, in das Duodenum abgegeben.

Wichtige Funktionen der Gallensäuren sind die Ausscheidung von Cholesterin über den Darm, Aufnahme von Fetten und fettlöslichen Vitaminen im Dünndarm sowie Anregung der Darmmotilität.

Der größte Teil der täglich sezernierten Gallensäuren wird im terminalen Ileum wieder resorbiert, über die Pfortader der Leber zugeführt und erneut mit der Galle ausgeschieden. Dieser Prozess, der auch enterohepatischer Kreislauf genannt wird, führt dazu, dass jeden Tag nur 3–5 % der Gallensäuren mit dem Stuhl ausgeschieden werden.

Störungen im Gallensäure-Metabolismus können an verschiedenen Stellen des enterohepatischen Kreislaufs auftreten:

- Gestörte Gallensäure-Synthese in den Leberzellen
- Intrahepatische Gallestau, z.B. durch gestörten Galletransport
- Extrahepatischer Verschluss der Gallengänge
- Gestörte Gallensäure-Absorption im Darm
- Gestörte Gallensäure-Wiederaufnahme in die Leber
- Gestörter intrazellulärer Metabolismus (Recycling) in der Leberzelle

Auch angeborene (metabolische Erkrankungen u.a.) oder erworbene (Arzneimittel, Toxine, Infektionen u.a.) Lebererkrankungen können ebenfalls zu Störungen im Gallensäuren-Metabolismus führen und messbare Veränderungen der Konzentration von Gallensäuren im Blut hervorrufen. Somit sind Gallensäuren im Blut ein sensibler Marker für Lebererkrankungen (1; 2; 3) und eignen sich als früher Indikator z.B. für toxische Einflüsse auf die Leber (Arzneimittel, Alkohol, Lösungsmittelexposition etc.).

Das relativ unspezifische Symptom Pruritus zusammen mit dem spezifischen Laborergebnis der erhöhten Gallensäuren im Blut definiert das Krankheitsbild der intrahepatischen Cholestase in der Schwangerschaft (ICS, oder englisch ICP).

Gallensäuren im Blut sind der sensitivste Laborparameter für die Diagnostik der ICP ref. Eine ICP tritt in Europa in ca. 0,2 % aller Schwangerschaften (höchste Prävalenz in Schweden: 1–1,5 %) (4) auf und kann auf einer genetischen Prädisposition der Schwangeren beruhen. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft wird die ICP

durch die dann auftretenden hohen Hormonspiegel ausgelöst. Klinisch fassbar ist Juckreiz, der in den Handflächen und Fußsohlen beginnt.

Bei einer unbehandelten ICP besteht ein Risiko für Frühgeburten (19–60%) und Komplikationen beim -Neugeborenen (intrapartale Notfallsituation: 22–41%) sowie für intrauterinen Tod (0,75–1,6%) (4). Nach einer aufgetretenen ICP ist eine Cholestase auch unter oraler Kontrazeption möglich, da die ICP durch Hormonspiegel ausgelöst wird. Auch bei weiteren Schwangerschaften besteht ein erhöhtes Risiko für das erneute Auftreten einer ICP (45–70%) (5).

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7877W	PLATE	Mikrotitermodul	12 x 8 Vertiefungen
K 7877W	STD	Standards, gebrauchsfertig (96; 48; 24; 12; 6; 0 µmol/l)	6 x 500 µl
K 7877W	CTRL1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 7877W	CTRL2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 7877W	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
K 7877W	RGZ1	Reagenz 1, gebrauchsfertig	1 x 20 ml
K 7877W	RGZ2	Reagenz 2, gebrauchsfertig	1 x 6 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)

- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)
 - * Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Alle Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Lagerung

Frisch abgenommenes Serum ist eine Woche bei 2–8 °C oder 3 Monate bei -20 °C stabil.

Probenvorbereitung

Die Serumproben werden **1:2 mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt. Zum Beispiel:

- **50 µl** Probe + **50 µl SAMPLEBUF**, mischen =
Dies entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:2**.

40 µl dieser Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser photometrische Test dient zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren in Serum. Hierbei werden Gallensäuren in Gegenwart eines Überschusses von Thio-NAD mittels des Enzyms 3- α -Hydrosteroid-Dehydrogenase unter Bildung von Thio-NADH zu 3-Keto-Steroiden oxidiert. Die Bildungsrate von Thio-NADH kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt werden.

Es werden Standards mitgeführt mittels derer eine Kalibrierkurve erstellt wird. Daran können die Gallensäuren-Konzentrationen der Proben direkt abgelesen werden.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	10 μl Standard, Kontrolle (STD/CTRL) bzw. 40 μl 1:2 verdünnte Probe in jede Vertiefung pipettieren.
2.	150 μl Reagenz1 (RGZ1) mit einem Mehrfachdispenser in jede Vertiefung hinzufügen, dabei die Dispenser-Spitze nicht mit Standard/Kontrolle/Probe verunreinigen.
3.	5 min unter Schütteln* bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
4.	50 μl Reagenz 2 (RGZ2) mit einem Mehrfachdispenser in jede Vertiefung hinzufügen, dabei die Dispenser-Spitze nicht mit bereits vorliegendem Well-Inhalt verunreinigen.
5.	1 min unter Schütteln* bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.

6.	<p>Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 405 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist das Photometer in der Lage Kinetik-Messungen durchzuführen, so empfiehlt es sich, 10 Messpunkte im Abstand von jeweils 15 sec aufzunehmen und durch lineare Regression die Steigung (ΔOD) über den gesamten Messzeitraum zwischen 15 und 150 sec zu ermitteln.</p> <p>Erlaubt das Photometer nur Einzelmessungen, so wird direkt nach der einminütigen Inkubationszeit zum ersten Mal gemessen, anschließend die Platte zwei Minuten abgedunkelt stehen gelassen und danach ein zweites Mal gemessen. Der genaue Zeitabstand zwischen beiden Messungen wird notiert. Die Steigung (ΔOD) ergibt sich aus der Differenz von End-OD und Anfangs-OD geteilt durch den zeitlichen Abstand beider Messungen bzw. folgendermaßen:</p> $\Delta OD = (\text{End-OD} - \text{Anfangs-OD}) / \text{Zeitabstand}$
----	---

* Wir empfehlen, die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

8. ERGEBNISSE

Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die Änderung der optische Dichte (ΔOD) und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serumproben

Der ermittelte Wert der Proben wird durch **2** dividiert, um den Gallensäuren-Gehalt zu erhalten.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können höher verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese geänderte Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Kalibrierkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 30)

Probe	Gallensäuren [µmol/l]	VK [%]
1	8,7	9,4
2	25,5	7,2

Inter-Assay (n = 10)

Probe	Gallensäuren [µmol/l]	VK [%]
1	8,5	10,4
2	24,6	10,8

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2).

Probe	Verdünnung	Gallensäuren erwartet [µmol/l]	Gallensäuren gemessen [µmol/l]
A	1:2	20,76	22,95
	1:4	10,38	9,09
	1:8	5,19	6,55
	1:16	2,6	3,45
	1:32	1,3	1,7
	1:64	0,65	0,84
	1:128	0,32	0,41
B	1:2	16,23	17,03
	1:4	8,11	9,4
	1:8	4,06	4,56
	1:16	2,03	2,27
	1:32	1,01	1,06
	1:64	0,51	0,59
	1:128	0,25	0,27

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,195 µmol/l

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,514 µmol/l

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,889 µmol/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

Spike-Wiederfindung

Drei Proben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Cholsäure versetzt und gemessen (n = 3).

Probe	Ungespikete Probe [µmol/l]	Spike [µmol/l]	Gallensäuren erwartet [µmol/l]	Gallensäuren gemessen [µmol/l]
A	3,12	8,53	11,66	13,34
	3,12	6,37	9,5	8,75
	3,12	3,54	6,67	8,2
	3,12	2,13	5,26	5,21
B	2,85	10,92	13,76	17,33
	2,85	8,53	11,37	13,46
	2,85	6,36	9,2	10,67
	2,85	3,54	6,39	6,61
	2,85	2,13	4,98	5,57
C	3,25	8,53	11,78	14,81
	3,25	6,36	9,61	11,14
	3,25	3,54	6,79	8,7
	3,25	2,13	5,38	5,73

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Janel, J. et al., 2015. Serum Bile Acid Levels in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **61**(1), pp.85–90.
2. Ohtani, N., Yoshimoto, S. & Hara, E., 2014. Obesity and cancer: A gut microbial connection. *Cancer Research*, **74**(7), pp.1885–1889.
3. Setchell, K.D. & Matsui, A., 1983. Serum bile acid analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **127**(1), pp.1–17.
4. Glantz, A., Marschall, H.-U. & Mattsson, L.-A., 2004. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **40**(2), pp.467–474.

5. Paus, T. et al., 2002. Diagnostik und Therapie der Schwangerschaftscholestase. *Frauenarzt*, **43**(8), pp.907–911.
6. Halilbasic, E., Claudel, T. & Trauner, M., 2013. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *Journal of Hepatology*, **58**(1), pp.155–168.
7. Vincent, R.P. et al., 2013. Higher circulating bile acid concentrations in obese patients with type 2 diabetes. *Annals of clinical biochemistry*, **50**(Pt 4), pp.360–4.
8. Wertheim, B.C. et al., 2009. Physical activity as a determinant of fecal bile acid levels. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **18**(5), pp.1591–1598.
9. Wong, B.S. et al., 2012. Increased Bile Acid Biosynthesis Is Associated With Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **10**(9).
10. Hofman AF (1999) Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci.* **14**: 24-29.

Verwendete Symbole:

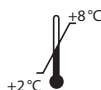
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

IDK[®] Bile Acids

For the in vitro determination of bile acids in serum

Valid from 2021-03-18

REF K 7877W



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
<i>Sample storage</i>	17
<i>Sample preparation</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	19
10. QUALITY CONTROL	19
<i>Reference range</i>	19
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Precision and reproducibility</i>	20
<i>Spiking Recovery</i>	20
<i>Dilution recovery</i>	21
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

This colourimetric assay is intended for the quantitative determination of bile acids in serum. For *in vitro* diagnostic.

2. INTRODUCTION

Bile acids are end products of the hepatic cholesterol metabolism and are secreted into the duodenum together with other bile components like cholesterol, bilirubin, phospholipids and proteins.

Bile acids perform important tasks like excretion of cholesterol via the intestine, absorption of fats and liposoluble vitamins in the small intestine and stimulation of intestinal motility.

Most of the daily secreted bile acids are reabsorbed in the terminal ileum, enter the liver via the portal vein and are again excreted as part of bile. The result of this enterohepatic circulation is a fecal excretion of only 3–5 % of bile acids per day.

Disturbances in the bile acid metabolism can occur at different points of the enterohepatic circulation:

- impaired bile synthesis in liver cells
- intrahepatic cholestase
- extrahepatic closure of the bile duct
- bile acid malabsorption in the intestine
- impaired bile acid reabsorption in the liver
- impaired intracellular metabolism (recycling) in liver cells

An hereditary or acquired dysfunction of the liver, e.g. caused by infections, metabolic diseases, drugs or toxins, causes detectable changes of bile acid concentrations in blood.

Bile acids in blood are a sensitive marker for liver diseases^{1,2,3} and are suited for early indicator for e.g. toxic effects on the liver (drugs, alcohol, solvent exposure etc.).

Together with the rather unspecific symptom pruritus, elevated bile acid levels in blood define the clinical picture of intrahepatic cholestase during pregnancy (ICP).

Bile acids in blood are the most sensitive laboratory parameter for the diagnostics of ICP. In Europe, ICP occurs during 0,2 % of all pregnancies (highest prevalence in Sweden: 1–1,5 %)⁴ and is mostly due to a genetic predisposition of the mother. In the second half of pregnancy, ICP is triggered by high hormone levels. The visible clinical symptom is pruritus, starting at palms and sole of the feet.

Untreated ICP bears the risk of premature birth (19–60%), complications for the newborn (intrapartal emergency situation: 22–41 %) and intrauterine death (7.5–1.6 %)⁴. After an ICP occurred, a cholestase is also possible on oral contraceptive, as the ICP is

caused by increased hormone levels. There is also a risk for recurrence of ICP during further pregnancies (45–70%)⁵.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7877W	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
K 7877W	STD	Standards, ready-to-use (96; 48; 24; 12; 6; 0 µmol/l)	6 x 250 µl
K 7877W	CTRL1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 250 µl
K 7877W	CTRL2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 250 µl
K 7877W	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 10 ml
K 7877W	RGZ1	Reagent 1, ready-to-use	1 x 20 ml
K 7877W	RGZ2	Reagent 2, ready-to-use	1 x 6 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- All test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Freshly collected serum can be stored at 2–8 °C for one week or for 3 months at -20 °C.

Sample preparation

Serum must be diluted **1:2 in sample dilution buffer (SAMPLEBUF)** before performing the assay. For example:

- **50 µl** sample + **50 µl** sample dilution buffer, mix well
This results in a final dilution of 1:2.

For analysis, pipet **40 µl** of this **dilution** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is designed for the quantitative determination of bile acids in serum.

In the presence of excess thio-NAD, bile acids are converted to 3-keto steroids by the enzyme 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase while thio-NADH is formed.

The rate of formation of thio-NADH can be determined by the change of absorbance (ΔOD) at 405 nm. A dose response curve ΔOD vs. concentration is generated, using the values obtained from measured standards. The bile acids concentration of the samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Pipet 10 µl standard, control (STD/CTRL) or 40 µl 1:2 diluted sample , respectively, in each well.
2.	Add 150 µl reagent 1 (RGZ1) with a repeater pipet into each well. Take care not to contaminate the dispenser tip with standard/control/sample.
3.	Incubate 5 min at room temperature (15–30 °C) on a horizontal plate shaker*.
4.	Add 50 µl reagent 2 (RGZ2) with a repeater pipet into each well. Take care not to contaminate the dispenser tip with the content of the well.
5.	Incubate 1 min at room temperature (15–30 °C) on a horizontal plate shaker*.
6.	<p>Determine absorption immediately with an ELISA reader at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference.</p> <p>If the photometer allows the measurement of reaction kinetics, record 10 measuring points in a time interval of 15 sec and determine the slope (ΔOD) by linear regression over all data points between 15 and 150 sec..</p> <p>If only single measurement is possible, then determine absorption directly after the 1-minute-incubation, cover the plate for 2 min (please note the exact time interval) and then take a second measurement. The slope (ΔOD) corresponds to the difference of final OD and start OD divided by the time interval between the two measurements.</p> $\Delta OD = (\text{final OD} - \text{start OD}) / \text{time interval}$

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

8. RESULTS

Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the change in optical density (ΔOD) and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum samples

The test results have to be divided by **2** to obtain the bile acids levels of the samples.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 30)

Sample	Bile acids [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	8.7	9.4
2	25.5	7.2

Inter-Assay (n = 10)

Sample	Bile acids [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	8.5	10.4
2	24.6	10.8

Spiking Recovery

Three samples were spiked with different concentrations of cholic acid and measured using this assay (n = 3).

Sample	Unspiked Sample [$\mu\text{mol/l}$]	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	Bile acids expected [$\mu\text{mol/l}$]	Bile acids measured [$\mu\text{mol/l}$]
A	3.12	8.53	11.66	13.34
	3.12	6.37	9.5	8.75
	3.12	3.54	6.67	8.2
	3.12	2.13	5.26	5.21
B	2.85	10.92	13.76	17.33
	2.85	8.53	11.37	13.46
	2.85	6.36	9.2	10.67
	2.85	3.54	6.39	6.61
	2.85	2.13	4.98	5.57

Sample	Unspiked Sample [μmol/l]	Spike [μmol/l]	Bile acids expected [μmol/l]	Bile acids measured [μmol/l]
C	3.25	8.53	11.78	14.81
	3.25	6.36	9.61	11.14
	3.25	3.54	6.79	8.7
	3.25	2.13	5.38	5.73

Dilution recovery

Two samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2).

Sample	Dilution	Bile acids expected [μmol/l]	Bile acids measured [μmol/l]
A	1:2	20.76	22.95
	1:4	10.38	9.09
	1:8	5.19	6.55
	1:16	2.6	3.45
	1:32	1.3	1.7
	1:64	0.65	0.84
	1:128	0.32	0.41
B	1:2	16.23	17.03
	1:4	8.11	9.4
	1:8	4.06	4.56
	1:16	2.03	2.27
	1:32	1.01	1.06
	1:64	0.51	0.59
	1:128	0.25	0.27

Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	0.195 µmol/l
Limit of detection, LoD	0.514 µmol/l
Limit of quantitation, LoQ	0.889 µmol/l

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure,












which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Jahnel, J. et al., 2015. Serum Bile Acid Levels in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **61**(1), pp.85–90.
2. Ohtani, N., Yoshimoto, S. & Hara, E., 2014. Obesity and cancer: A gut microbial connection. *Cancer Research*, **74**(7), pp.1885–1889.
3. Setchell, K.D. & Matsui, A., 1983. Serum bile acid analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **127**(1), pp.1–17.
4. Glantz, A., Marschall, H.-U. & Mattsson, L.-A., 2004. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **40**(2), pp.467–474.
5. Paus, T. et al., 2002. Diagnostik und Therapie der Schwangerschaftscholestase. *Frauenarzt*, **43**(8), pp.907–911.
6. Halilbasic, E., Claudel, T. & Trauner, M., 2013. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *Journal of Hepatology*, **58**(1), pp.155–168.
7. Vincent, R.P. et al., 2013. Higher circulating bile acid concentrations in obese patients with type 2 diabetes. *Annals of clinical biochemistry*, **50**(Pt 4), pp.360–4.
8. Wertheim, B.C. et al., 2009. Physical activity as a determinant of fecal bile acid levels. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **18**(5), pp.1591–1598.
9. Wong, B.S. et al., 2012. Increased Bile Acid Biosynthesis Is Associated With Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **10**(9).
10. Hofman AF (1999) Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci.* **14**: 24-29.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		