

Arbeitsanleitung / Manual

IDK[®] Gallensäuren

***Photometrisches Testsystem zur in-vitro-Bestimmung
der Gallensäuren im Stuhl***

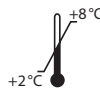
IDK[®] Bile Acids

***Photometric test system for the in vitro determination
of bile acids in stool***

Gültig ab / Valid from 2020-12-15



K 7878CV



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	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Lagerung</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	7
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	8
<i>Linearität</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Analytische Spezifität – Interferenzen</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene photometrische Test ist für die Bestimmung von Gallensäuren aus Stuhl geeignet. 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.

Von einem Gallensäuren-Malabsorptions-Syndrom spricht man, wenn die Gallensäuren im Ileum nicht mehr in ausreichendem Maße für den Körper zurückgewonnen werden können und über den Stuhl verloren gehen.

Indikationen

Verdacht auf Gallensäuren-Malabsorptions-Syndrom

- nach Resektion des terminalen Ileums
- Morbus Crohn des Dünndarms
- Strahlenschäden des Dünndarms
- Zustand nach Cholezystektomie
- trunkuläre Vagotomie
- Zöliakie
- Chronische Pankreatitis
- idiopathische Gallensäurendiarrhö (Thaysen-Pedersen-Syndrom)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7878CV	STD5	Standard 48 µmol/l, gebrauchsfertig	1 x 250 µl
K 7878CV	CTRL1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 250 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7878CV	CTRL2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 250 µl
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml
K 7878CV	RGZ1	Reagenz 1, gebrauchsfertig	1 x 20 ml
K 7878CV	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*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Einmalküvetten (wir empfehlen PS 1,5 ml halbmikro Einmal-Küvetten, 12,5 x 12,5 x 45 mm von Brand GmbH + Co KG, 97861 Wertheim, Cat. No. 7590 15)
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Küvettenphotometer (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**.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract®*** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2–8 °C** gelagerte *IDK Extract®* kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Ex-**

traktionspuffer (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) ist **4 Monate bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Der **Extraktionspuffer** wird im Test als **Leerwert** (Blank) eingesetzt.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Lagerung

Rohstuhl kann 3 Tage bei Raumtemperatur, 7 Tage bei 2–8 °C oder 2 Jahre bei -20 °C gelagert werden. Der Rohstuhl sollte maximal zwei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlextrakt (1:100) kann 3 Tage bei Raumtemperatur, 7 Tage bei 2–8 °C oder 14 Tage bei -20 °C gelagert werden. Der Extrakt sollte maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 ml Extraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.

- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) befüllen. **Wichtig:** Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. **Wichtig:** Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung **1:100**

30 µl dieser Verdünnung werden im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser photometrische Test dient zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren im Stuhl. 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 wird ein Standard mitgeführt, an dem die Gallensäuren-Konzentrationen der Proben direkt abgelesen werden.

Pipettierschema

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

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	450 µl Reagenz 1 (RGZ1) in jede Küvette pipettieren.
2.	30 µl Standard/Kontrollen/Leerwert/verdünnte Proben in die jeweilige Küvette hinzu pipettieren und gut mischen.
3.	5 min bei Raumtemperatur (15–30°C) inkubieren.
4.	150 µl Reagenz 2 (RGZ2) hinzu pipettieren und gut mischen.
5.	1 min bei Raumtemperatur (15–30°C) inkubieren.
6.	<p>Direkt nach der einminütigen Inkubationszeit zum ersten Mal messen, anschließend die Küvette zwei Minuten abgedunkelt stehen lassen und danach ein zweites Mal messen. 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:</p> $\Delta OD = (\text{End-OD} - \text{Anfangs-OD}) / \text{Zeitabstand}$

8. ERGEBNISSE

Berechnung der Probenkonzentration

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} = \frac{\Delta OD_{\text{Probe}} - \Delta OD_{\text{Leerwert}}}{\Delta OD_{\text{Standard}} - \Delta OD_{\text{Leerwert}}} \times 48 \mu\text{mol/l}$$

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 100** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Konzentration der Gallensäure größer als der Standard 48 µmol/l können mit Probenextraktionspuffer verdünnt und nochmals gemessen werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden (n = 1 199) wurden folgende Werte ermittelt (1 g Stuhl \triangleq 1 ml):

90 %-Referenzbereich	0,84–6,55 µmol/g	(\triangleq 840–6 550 µmol/l)
Median	2,83 µmol/g	(\triangleq 2 830 µmol/l)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 7

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µmol/l]	VK [%]
1	32,79	7,4
2	8,17	6,5
3	32,50	6,9

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten Gallensäurenkonzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [µmol/l]	Spike [µmol/l]	Erwartet [µmol/l]	Gemessen [µmol/l]	Wieder- findung [%]
37,81	2,29	40,10	39,23	97,84
	4,36	42,17	42,07	99,74
	6,26	44,07	43,63	99,01
52,24	2,29	54,53	57,99	106,35
	4,36	56,61	62,17	109,83
	6,26	58,50	60,08	102,70

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels serieller Verdünnung von 3 Stuhlproben nachgewiesen.

Für Gallensäuren in Stuhl wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 10,98 bis 36,83 µmol/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ± 20 %.

Probe	Verdünnung	Erwartet [µmol/l]	Gemessen [µmol/l]	Wieder- findung [%]
A	1:100	21,96	21,96	100,00
	1:125	17,57	17,50	99,64
	1:150	14,64	14,98	102,30
	1:175	12,55	11,75	93,65
	1:200	10,98	11,10	101,10
B	1:100	36,83	36,83	100,00
	1:125	29,46	28,20	95,71
	1:150	24,55	22,14	90,19
	1:175	21,05	20,03	95,19
	1:200	18,41	16,16	87,75

Probe	Verdünnung	Erwartet [μmol/l]	Gemessen [μmol/l]	Wieder- findung [%]
C	1:100	33,65	33,65	100,00
	1:125	26,92	25,14	93,37
	1:150	22,43	20,33	90,64
	1:175	19,23	17,34	90,18
	1:200	16,83	16,07	95,48

Analytische Sensitivität

Die folgende Nachweisgrenze wurde in Bezug auf die Kalibrierkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

0,186 μmol/l

Analytische Spezifität – Interferenzen

Es wurde keine Interferenz durch folgende Substanzen gefunden: Hämoglobin, Bilirubin, Triglyceride und Ascorbinsäure.

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 beigefügten 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®* und *IDK Extract®* sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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. Camilleri, M., 2014. Advances in understanding of bile acid diarrhea. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, **8**(1), pp.49–61.
2. 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.
3. Vijayvargiya, P. et al., 2013. Methods for diagnosis of bile acid malabsorption in clinical practice. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **11**(10), pp.1232–1239.
4. Müller-Lissner, S. a & Pirk, O., 2002. Irritable bowel syndrome in Germany. A cost of illness study. *European journal of gastroenterology & hepatology*, **14**(12), pp.1325–1329.

Verwendete Symbole:

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

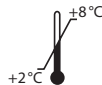
IDK[®] Bile Acids

*Photometric test system for the in vitro determination
of bile acids in stool*

Valid from 2020-12-15



K 7878CV



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	14
2. INTRODUCTION	14
3. MATERIAL SUPPLIED	14
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	15
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	16
<i>Sample storage</i>	16
<i>Extraction of the stool samples</i>	16
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	17
8. RESULTS	18
9. LIMITATIONS	18
10. QUALITY CONTROL	18
<i>Reference range</i>	19
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
<i>Accuracy – Precision</i>	19
<i>Accuracy – Trueness</i>	19
<i>Linearity</i>	20
<i>Analytical sensitivity</i>	20
<i>Analytical specificity – Interferences</i>	20
12. PRECAUTIONS	21
13. TECHNICAL HINTS	21
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21
15. REFERENCES	22

1. INTENDED USE

This photometric assay is intended for the quantitative determination of bile acids in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Bile acids are produced in the liver as end-products of cholesterol metabolism. Together with other components of the liver bile, such as cholesterol, bilirubin, phospholipids and proteins, bile acids are secreted into the duodenum.

Important functions of bile acids are the excretion of cholesterol, absorption of fatty acids and fat-soluble vitamins in the small intestine as well as stimulation of intestinal motility.

The majority of the secreted bile acids are reabsorbed in the terminal ileum and returned to the liver via the portal venous system for eventual recirculation in a process known as enterohepatic circulation; only a small proportion (3–5%) are excreted into the feces.

If the enterohepatic recycling of bile acids fails, excess amounts of bile acids enter the colon and are lost with the feces; this condition is called bile acid malabsorption.

Indications

Suspected bile acid malabsorption

- After resection of the terminal ileum
- Crohn's Disease affecting the terminal ileum
- Radiation enteritis
- Post-cholecystectomy
- Post-vagotomy
- Celiac disease
- Chronic pancreatitis
- idiopathic bile acid malabsorption

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7878CV	STD5	Standard 48 µmol/l, ready-to-use	1 x 250 µl
K 7878CV	CTRL1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 250 µl
K 7878CV	CTRL2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 250 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml
K 7878CV	RGZ1	Reagent 1, ready-to-use	1 x 20 ml
K 7878CV	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*
- Stool sample application system such as Cat. No.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Disposable cuvettes (we recommend PS 1,5 ml semi-micro disposable cuvettes, 12,5 x 12,5 x 45 mm, Brand GmbH + Co KG, D-97861 Wertheim, Germany, Cat. No. 7590 15)
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Cuvette photometer (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.**
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate *IDK Extract®*** has to be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37 °C in a water bath. The *IDK Extract®* can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 4 months**.

- **Extraction buffer** is used as **blank**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Raw stool can be stored for 3 days at room temperature, 7 days at 2–8 °C or 2 years at -20 °C. Avoid more than two freeze-thaw cycles.

Stool extracts (1:100) can be stored for 3 days at room temperature, 7 days at 2–8 °C or 14 days at -20 °C. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

Extraction of the stool samples

Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) is used as a **sample extraction buffer**. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 1.5 ml extraction buffer:

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 1.5 ml

Dilution Factor: 1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty stool sample tube** with **1.5 ml extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) before using it with the sample. **Important:** Allow the extraction buffer to reach room temperature.

- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Vortex the tube well until no stool sample remains in the notches. **Important:** Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution : **1:100**

30 µl of this dilution are used in this test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

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 (DOD) at 405 nm.

The bile acids concentration of the samples is determined directly from the accompanied standard.

Test procedure

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Pipet 450 µl reagent 1 (RGZ1) into the cuvette.
2.	Add each 30 µl standard/controls/blank/diluted samples into the respective cuvette and mix well.

3.	Incubate 5 min at room temperature (15–30 °C).
4.	Add 150 µl reagent 2 (RGZ2) and mix well.
5.	Incubate 1 min at room temperature (15–30 °C).
6.	Take the first measurement of absorption directly after the 1 minute incubation , cover the cuvette 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. $\Delta OD = (\text{final OD} - \text{start OD})/\text{time interval}$

8. RESULTS

Calculation of sample concentration

$$\text{Concentration}_{\text{sample}} = \frac{\Delta OD_{\text{sample}} - \Delta OD_{\text{blank}}}{\Delta OD_{\text{standard}} - \Delta OD_{\text{blank}}} \times 48 \mu\text{mol/l}$$

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 100** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with a concentration of bile acids higher than the standard 48 µmol/l can be further diluted with sample extraction buffer and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

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

Based on Immundiagnostik AG studies of stool samples of apparently healthy persons (n = 1 199), the following values were estimated (1 g stool \pm 1 ml):

90% reference range	0.84–6,55 $\mu\text{mol/g}$	(\pm 840–6 550 $\mu\text{mol/l}$)
Median	2.83 $\mu\text{mol/g}$	(\pm 2 830 $\mu\text{mol/l}$)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Reproducibility (Inter-Assay); n = 7

The reproducibility was assessed with 3 stool samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	32.79	7.4
2	8.17	6.5
3	32.50	6.9

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, bile acid spikes with known concentrations were added to 2 different stool samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Sample [$\mu\text{mol/l}$]	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	Expected [$\mu\text{mol/l}$]	Obtained [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
37.81	2.29	40.10	39.23	97.84
	4.36	42.17	42.07	99.74
	6.26	44.07	43.63	99.01
52.24	2.29	54.53	57.99	106.35
	4.36	56.61	62.17	109.83
	6.26	58.50	60.08	102.70

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 3 different stool samples.

For bile acids in stool, the method has been demonstrated to be linear from 10.98 to 36.83 $\mu\text{mol/l}$ based on the standard without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [$\mu\text{mol/l}$]	Obtained [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
A	1:100	21.96	21.96	100.00
	1:125	17.57	17.50	99.64
	1:150	14.64	14.98	102.30
	1:175	12.55	11.75	93.65
	1:200	10.98	11.10	101.10
B	1:100	36.83	36.83	100.00
	1:125	29.46	28.20	95.71
	1:150	24.55	22.14	90.19
	1:175	21.05	20.03	95.19
	1:200	18.41	16.16	87.75
C	1:100	33.65	33.65	100.00
	1:125	26.92	25.14	93.37
	1:150	22.43	20.33	90.64
	1:175	19.23	17.34	90.18
	1:200	16.83	16.07	95.48

Analytical sensitivity

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

Limit of blank, LoB

0.186 $\mu\text{mol/l}$

Analytical specificity – Interferences

There was no interference observed with the following substances: Hemoglobin, bilirubin, triglycerides and ascorbic acid.

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®* and *IDK Extract®* are trademarks 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. Camilleri, M., 2014. Advances in understanding of bile acid diarrhea. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, **8**(1), pp.49–61.
2. 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.
3. Vijayvargiya, P. et al., 2013. Methods for diagnosis of bile acid malabsorption in clinical practice. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **11**(10), pp.1232–1239.
4. Müller-Lissner, S. a & Pirk, O., 2002. Irritable bowel syndrome in Germany. A cost of illness study. *European journal of gastroenterology & hepatology*, **14**(12), pp.1325–1329.

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		