

IDK[®] Gallensäuren

Zur in-vitro-Bestimmung der Gallensäuren im Stuhl

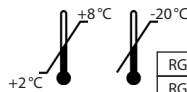
IDK[®] Bile Acids

For the in vitro determination of bile acids in stool

Gültig ab / Valid from 2022-06-22

REF **K 7878DX**

Σ 96



RGZ1
RGZ2

IVD



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>Stuhlprobenextraktion</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Analytische Spezifität – Interferenzen</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Gallensäuren aus Stuhl unter Verwendung eines Laborautomaten der Firma Dynex (DSX, DS2) 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 7878DX	PLATE	Mikrotitermodul	2 x 12 x 8 Vertiefungen
K 7878DX	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 6; 12; 24; 48; 96 µmol/l)	1 x 6 vials
K 7878DX	CTRL1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 7878DX	CTRL2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml
K 7878DX	RGZ1	Reagenz 1, gebrauchsfertig	1 x 20 ml
K 7878DX	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
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Automatengängige Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Laborautomat der Firma Dynex (DSX, DS2) mit Inkubator und Photometer (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

- **Vorbereitung der Mischung RGZ1/RGZ2:** Zur Herstellung der Mischung RGZ1/RGZ2 werden unmittelbar vor Gebrauch je nach Anforderung 2 Volumenteile Reagenz 1 (RGZ1) und 1 Volumenteil Reagenz 2 (RGZ2) gemischt (z. B. 2 ml RGZ1 + 1 ml RGZ2 = 3 ml Mischung). Die **Mischung RGZ1/RGZ2** ist für **5 Stunden** stabil.
- **Achtung: RGZ1/RGZ2** sind, bei **-20°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.
- 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 zentrifugiert 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 **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist **4 Monate bei 2-8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- 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:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (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:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- 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!
- 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.
- Das Röhrchen solange 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.
- 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**

10 µl dieser Verdünnung werden pro Vertiefung 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 durch die Änderung der Absorption (ΔOD) bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt werden.

Anhand einer mitgeführten Standardkurve – ΔOD versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

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

Zur automatisierten Abarbeitung wird ein entsprechendes Automatenprotokoll benötigt. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

1.	Je 10 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	25 µl Reagenz 1 (RGZ1) in jede Vertiefung, in der später die Enzymreaktion stattfindet, hinzufügen. 75 µl Reagenz 1 (RGZ1) in jede Vertiefung, die zur Ermittlung des jeweiligen Leerwertes dient, hinzufügen.

3.	Streifen 5 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
4.	75 µl Mischung RGZ1/RGZ2 in jede Vertiefung, in der die Enzymreaktion stattfindet, hinzufügen.
5.	Streifen 22 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
6.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 405 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen.

8. ERGEBNISSE

Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Zur Auswertung werden die OD-Werte der gemessenen Proben bzw. Kontrollen und der Kalibratoren aus der Messung ohne Enzym von den OD-Werten der Messung mit Enzym subtrahiert, wobei die Änderung der optischen Dichte (ΔOD) erhalten wird.

Für ΔOD und 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.

Stuhlproben

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 Konzentrationen der Gallensäure größer als der höchste Standard können mit Probenextraktionspuffer 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:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

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

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 $\mu\text{mol/g}$	(\triangleq 840–6 550 $\mu\text{mol/l}$)
Median	2,83 $\mu\text{mol/g}$	(\triangleq 2 830 $\mu\text{mol/l}$)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	0,344 $\mu\text{mol/l}$
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	1,894 $\mu\text{mol/l}$
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	1,894 $\mu\text{mol/l}$

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	8,13	3,4
2	25,86	5,2

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 22

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

Probe	Mittelwert [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	8,46	5,4
2	27,04	5,9

Analytische Spezifität – Interferenzen

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

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 [$\mu\text{mol/l}$]	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	Erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
8,26	4,57	12,44	13,20	106,17
	8,73	16,24	15,19	93,53
	12,52	19,70	18,13	92,01
25,01	4,57	28,39	29,60	104,27
	8,73	31,46	32,76	104,12
	12,52	34,27	36,38	106,16

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 zweier serieller Verdünnungen von 2 Stuhlproben nachgewiesen.

Für Gallensäuren in Stuhl wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 1,89 bis 54,83 $\mu\text{mol/l}$ nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wieder- findung [%]
A-1	1:100	52,10	52,10	100,00
	1:200	26,05	22,28	85,51
	1:400	13,03	10,29	78,98
	1:800	6,51	4,86	74,63
	1:1600	3,26	2,56	78,50
A-2	1:100	54,82	54,82	100,00
	1:200	27,41	26,65	97,21
	1:400	13,71	12,74	92,96
	1:800	6,85	6,54	95,44
	1:1600	3,43	3,00	87,49
	1:3200	1,71	1,98	115,41
B-1	1:200	39,05	39,05	100,00
	1:400	19,53	20,79	106,48
	1:800	9,76	10,36	106,13
	1:1600	4,88	4,84	99,07
	1:3200	2,44	2,82	115,43
B-2	1:200	42,44	42,44	100,00
	1:400	21,22	21,11	99,49
	1:800	10,61	10,72	101,07
	1:1600	5,31	5,39	101,56
	1:3200	2,65	3,44	129,85

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®* und *IDK Extract®* sind Marken 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. 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
	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 stool

Valid from 2022-06-22

REF **K 7878DX**

Σ 96

+2°C ±8°C -20°C
RGZ1
RGZ2

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	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	16
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
<i>Sample storage</i>	17
<i>Extraction of the stool samples</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Accuracy – Precision</i>	20
<i>Analytical sensitivity</i>	21
<i>Accuracy – Trueness</i>	21
<i>Linearity</i>	22
<i>Analytical specificity – Interferences</i>	23
12. PRECAUTIONS	23
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

This photometric assay is intended for the quantitative determination of bile acids in stool using an automated ELISA system manufactured by Dynex (DSX, DS2). 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 7878DX	PLATE	Microtiter plate	2 x 12 x 8 wells
K 7878DX	STD	Standards, ready-to-use (0; 6; 12; 24; 48; 96 µmol/l)	1 x 6 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7878DX	CTRL1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 7878DX	CTRL2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract® 2.5x</i>	1 x 100 ml
K 7878DX	RGZ1	Reagent 1, ready-to-use	1 x 20 ml
K 7878DX	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
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Single-use laboratory plastic vials suitable for automated ELISA systems
- Automated ELISA system manufactured by Dynex (DSX, DS2) including incubator and 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

- **Preparation of the mixture RGZ1/RGZ2:** Directly before use, mix 2 parts reagent 1 (RGZ1) and 1 part reagent 2 (RGZ2) (e.g. 2 ml RGZ1 + 1 ml RGZ2 = 3 ml mixture). The **mixture RGZ1/RGZ2** is stable for **5 hours**.
- **Attention: RGZ1 and RGZ2** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **–20 °C**.
- 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 ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultrapure 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**.
- 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 used 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**

For analysis, pipet **10 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 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 (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.

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, an appropriate test procedure is needed. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

1.	Add each 10 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
2.	Add 25 µl reagent 1 (RGZ1) into each well used for enzyme reaction . Add 75 µl reagent 1 (RGZ1) into each well used as blank .
3.	Incubate the strips for 5 min at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker .
4.	Add 75 µl mixture of RGZ1/RGZ2 into each well used for enzyme reaction .
5.	Incubate the strips for 22 min at room temperature (15–30 °C).
6.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference.

8. RESULTS

Point-to-point calculation

For analysis, the OD values of the samples/controls/calibrators measured in the reaction without enzyme are subtracted from the OD values measured with enzyme, resulting in the change in optical density (ΔOD).

We recommend a linear ordinate for 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.

Stool

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 concentrations of bile acids above the highest standard can be further diluted with sample extraction buffer 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

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

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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 40

The repeatability was assessed with 2 stool samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	8.13	3.4
2	25.86	5.2

Reproducibility (Inter-Assay); n = 22

The reproducibility was assessed with 2 stool-samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	8.46	5.4
2	27.04	5.9

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	0.344 $\mu\text{mol/l}$
Limit of detection, LoD	1.894 $\mu\text{mol/l}$
Limit of quantitation, LoQ	1.894 $\mu\text{mol/l}$

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

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 acids 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 [%]
8.26	4.57	12.44	13.20	106.17
	8.73	16.24	15.19	93.53
	12.52	19.70	18.13	92.01
25.01	4.57	28.39	29.60	104.27
	8.73	31.46	32.76	104.12
	12.52	34.27	36.38	106.16

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 2 different stool samples.

For bile acids in stool in stool, the method has been demonstrated to be linear from 1.89 to 54.83 $\mu\text{mol/l}$ based on the standard curve 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	1:100	52.10	52.10	100.00
	1:200	26.05	22.28	85.51
	1:400	13.03	10.29	78.98
	1:800	6.51	4.86	74.63
	1:1600	3.26	2.56	78.50
A-2	1:100	54.82	54.82	100.00
	1:200	27.41	26.65	97.21
	1:400	13.71	12.74	92.96
	1:800	6.85	6.54	95.44
	1:1600	3.43	3.00	87.49
	1:3200	1.71	1.98	115.41
B-1	1:200	39.05	39.05	100.00
	1:400	19.53	20.79	106.48
	1:800	9.76	10.36	106.13
	1:1600	4.88	4.84	99.07
	1:3200	2.44	2.82	115.43
B-2	1:200	42.44	42.44	100.00
	1:400	21.22	21.11	99.49
	1:800	10.61	10.72	101.07
	1:1600	5.31	5.39	101.56
	1:3200	2.65	3.44	129.85

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