

Casomorphin ELISA Kit

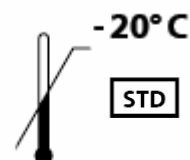
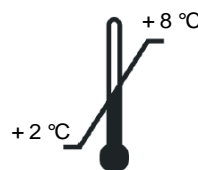
Zur Bestimmung von Casomorphin im Urin

For the determination of Casomorphin in urine

Gültig ab / Valid from 14.12.2007



K 7010



STD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 3 |
| 2. EINLEITUNG | 3 |
| 3. TESTPRINZIP | 3 |
| 4. INHALT DER TESTPACKUNG | 4 |
| 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 5 |
| 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 5 |
| 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN | 6 |
| 9. TESTDURCHFÜHRUNG | 7 |
| <i>PROBENVORBEREITUNG</i> | <i>7</i> |
| <i>PIPETTIERSHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i> | <i>7</i> |
| 10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE | 9 |
| <i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i> | <i>9</i> |
| 11. TESTCHARAKTERISTIKA | 11 |
| <i>KREUZREAKTION</i> | <i>11</i> |
| <i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i> | <i>11</i> |
| <i>SENSITIVITÄT</i> | <i>11</i> |
| <i>LINEARITÄT</i> | <i>12</i> |
| 12. EINSCHRÄNKUNGEN | 12 |
| 13. LITERATUR | 12 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 1. INTENDED USE | 16 |
| 2. INTRODUCTION | 16 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TEST | 16 |
| 4. MATERIAL SUPPLIED | 17 |
| 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 18 |
| 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS | 18 |
| 7. PRECAUTIONS | 19 |
| 8. SAMPLE AND TEST PREPARATION | 19 |
| 9. ASSAY PROCEDURE | 20 |
| <i>SAMPLE PREPARATION</i> | <i>20</i> |
| <i>TEST PROCEDURE</i> | <i>20</i> |
| 10. EVALUATION OF RESULTS | 22 |
| <i>EXPECTED VALUES</i> | <i>22</i> |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 24 |
| <i>CROSS REACTIVITY</i> | <i>24</i> |
| <i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i> | <i>24</i> |
| <i>SENSITIVITY</i> | <i>24</i> |
| <i>LINEARITY</i> | <i>25</i> |
| 12. LIMITATIONS | 25 |
| 13. REFERENCES | 25 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 26 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von Casomorphin aus Urin geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Bei Casomorphin handelt es sich um ein 7 Aminosäuren langes Peptid, einem Abbauprodukt von Casein. Das Peptid bindet an Opiatrezeptoren im Gehirn und führt somit zu Effekten vergleichbar mit Morphinen wie z.B. Heroin. Es konnte gezeigt werden, dass es in Regionen des Gehirns, die für Sprach- und Hörleistung verantwortlich sind, bindet.

Patienten mit Autismus und Schizophrenie zeigen erhöhte Spiegel von Casomorphin im Urin. Es wird vermutet, dass auch in anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem chronischen Erschöpfungszustand und Depressionen Casomorphin eine Rolle spielt. Hier wurde nach Verordnung einer milchproduktfreien Diät eine Remission der Symptome beobachtet.

Indikation

- Autismus
- Schizophrenie

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einer Verdünnungspuffer versetzt. Anschließend wird die Probe mit einem polyklonalen Casomorphin-Antiserum in einer mit Casomorphinderivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen anti-Casomorphin-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die

Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Konzentration von Casomorphin in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Die Ergebnisse der ELISA-Auswertung werden anhand der Kreatininkonzentration des Urins normiert. Es muss daher eine parallele Kreatininbestimmung durchgeführt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art. Nr. | Inhalt | Kit Komponenten | Menge |
|----------|----------|--|----------------------------|
| K7010MTP | PLATE | Mikrotiterplatte, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K7010ST | STD | Standards | 6 x 1 Fläschchen |
| K7010KO | CTRL 1+2 | Kontrollen | 2 x 1 Fläschchen |
| K7010WP | WASHBUF | BM-Waschpufferkonzentrat (10-fach) | 1 x 100 ml |
| K7010CSP | 2.ABDIL | Konjugatstabilisierungspuffer | 24 ml |
| K7010AK | AB | Casomorphin-Antikörper (lyophilisiert) | 3 x 1 Reaktionsgefäß |
| K7010K | 2.AB | POD-Antikörper (Konzentrat) | 120 µl |
| K7010DB | DIL | Verdünnungspuffer | 50 ml |
| K7010AVR | ABBUF | Antikörperverdünnungspuffer | 3 x 3,5 ml (lyophilisiert) |
| K7010TMB | SUB | TMB-Substrat | 2 x 15 ml |
| K7010AC | STOP | Stopplösung | 12 ml |

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Kühlzentrifuge, 4000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 3 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpuffer) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **2.AB** (POD-Antikörper) wird **1:200** in **2.ABDIL** (Konjugatstabilisierungspuffer) verdünnt (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). Unverdünnter 2.AB ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter 2.AB ist bedingt stabil und kann 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden.**

- Der **ABBUF** (Antikörperverdünnungspuffer) wird in **3,5 ml verdünntem BM-Waschpuffer** pro Fläschchen rekonstituiert (Gesamtvolumen: $3 \times 3,5 \text{ ml} = 10,5 \text{ ml}$).
- Der **AB** (Casomorphin-Antikörper) wird in dem **rekonstituierten Antikörperverdünnungspuffer** verdünnt. Hierzu wird der gesamte Inhalt eines AB-Gefäßes in das zuvor rekonstituierte ABBUF-Fläschchen überführt. Das leere AB-Gefäß sollte mit ca. 0,5 ml der AK-Lösung gespült werden. Der AB sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Durch die Aufteilung des AB in drei Fläschchen ist der ELISA in drei Ansätze teilbar. Wird im Testansatz mehr als 1 Fläschchen AK-Lösung benötigt, sollten die rekonstituierten Lösungen in einem separaten Gefäß zusammen geführt werden.
- Der **STD** (Standard) und die **CTRL** (Kontrollen) werden bei **-20°C** gelagert. Für den Test werden die Standards und Kontrollen aufgetaut und **1:10** in **DIL** (Verdünnungspuffer) verdünnt. Der **STD** (Standard) und die **CTRL** (Kontrollen) können bis zu 2 mal wieder eingefroren werden.
- Der Gehalt an Casomorphin ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem QC-Protokoll angegeben.
- Die Testreagenzien sind bei Raumtemperatur, das **STD** (Standardkonzentrat) und die **CTRL** (Kontrollen) bei **-20°C** bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich Urin.
- Die Probe sollte gekühlt versendet werden, ist aber bis 24 Stunden bei Raumtemperatur stabil.
- Proben sollten vor der Analyse mindestens **1:10** in **DIL** (Verdünnungspuffer) verdünnt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die Ergebnisse der ELISA-Auswertung werden anhand der Kreatininkonzentration des Urins normiert. Es muss daher eine parallele Kreatininbestimmung durchgeführt werden.

Probenvorbereitung

Proben werden im Faktor **1:10** bzw. bei Überschreitung des Messbereiches **1:100 in DIL** (Verdünnungspuffer) verdünnt.

Pipettierschema Testdurchführung

| | |
|----|---|
| 1. | Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen |
| 2. | Positionen für STD (Standard) / CTRL (Kontrolle) / SAMPLE (Probe) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren |
| 3. | Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können in der verschlossenen Originalverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 4°C gelagert werden |
| 4. | Mikrotiterplattenstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen |
| 5. | 2 x 100 µl verdünnte STD (Standard) / CTRL (Kontrolle) / SAMPLE (Probe) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenstreifen (PLATE) pipettieren |

| | |
|-----|---|
| 6. | 100 µl verdünnten AB (Casomorphin-AK) in alle Vertiefungen pipettieren |
| 7. | Streifen luftdicht abdecken und 15-20 Stunden bei 2-8°C inkubieren |
| 8. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen |
| 9. | 200 µl verdünnten 2.AB (POD-AK) in alle Vertiefungen pipettieren |
| 10. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren |
| 11. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen |
| 12. | 200 µl SUB (TMB-Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren |
| 13. | 5-15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren* |
| 14. | 100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen |
| 15. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden |

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Auswertungsfunktionen

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen Ihnen die 4-Parameter-Funktion

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, wir empfehlen 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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.

Erwartete Ergebnisse

Die Ergebnisse der ELISA-Auswertung werden anhand der Kreatininkonzentration des Urins normiert.

Auswertung

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} [\text{ng}/\mu\text{mol Kreatinin}] = \frac{\text{Casomorphin-Konzentration}_{\text{Probe}} [\text{ng/ml}]}{\text{Kreatinin-Konzentration}_{\text{Probe}} [\text{mmol/l}]}$$

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n=23) wurde ein Mittelwert von 0,94 ng/μmol Kreatinin ermittelt.

Urin (n = 23): 0,94 ng/μmol Kreatinin (Stabw: 0,50 ng/μmol Kreatinin)

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

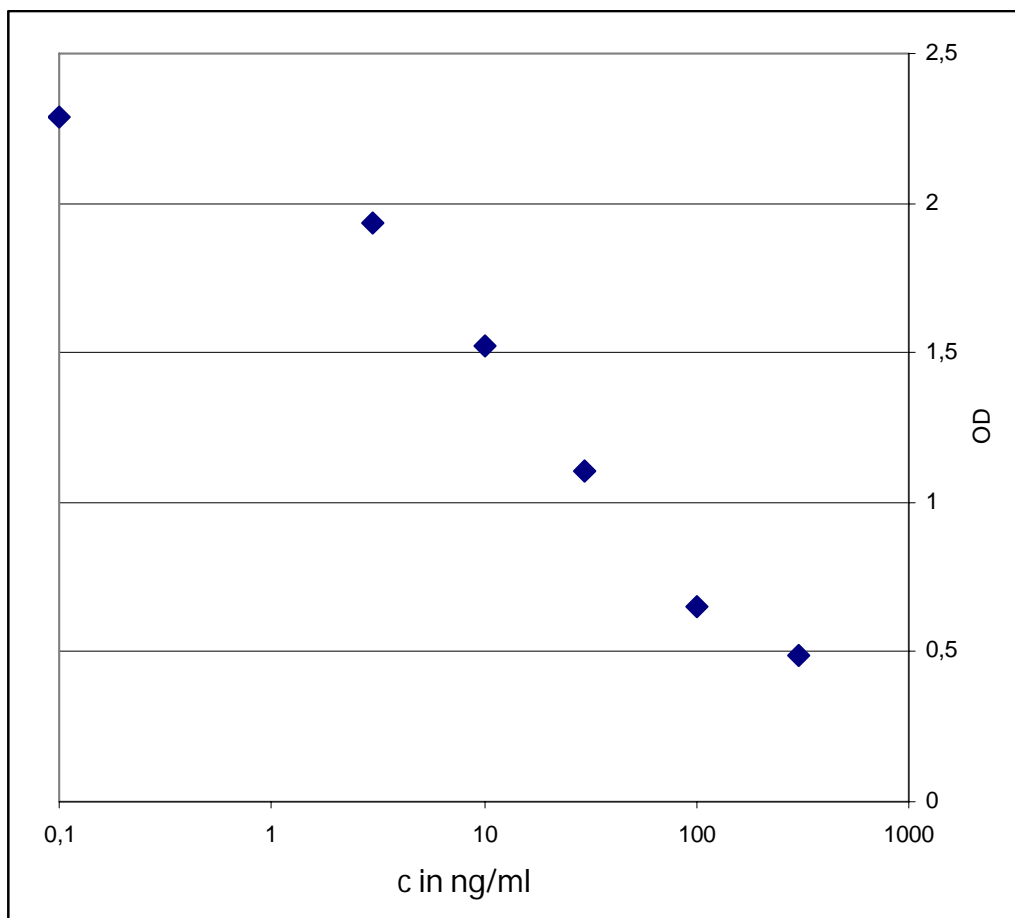
Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können bei einer Verdünnung von 1:10 direkt aus der Kalibrierkurve in nmol/l abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.

Musterkalibrierkurve



11. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktion

Gliadorphin: Keine Kreuzreaktion mit Gliadorphin bis zu einer Konzentration von 1000 ng/ml nachweisbar.

Casein: Keine Kreuzreaktion mit Casein bis zu einer Caseinkonzentration von 10 µg/ml im Urin feststellbar.

Präzision und Reproduzierbarkeit

| Intra-Assay (n=18) | | |
|--------------------|---------------------|-------------------------|
| Probe | Casomorphin [ng/ml] | Standardabweichung (SD) |
| 1 | 3,5 | 13,8% |
| 2 | 13 | 11,1% |

| Inter-Assay (n=8) | | |
|-------------------|---------------------|-------------------------|
| Probe | Casomorphin [ng/ml] | Standardabweichung (SD) |
| 1 | 3,7 | 14,4% |
| 2 | 12,5 | 10,3% |

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 1 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 12-mal der Standard Null.

| Probe | Casomorphin-Mittelwert [OD] | Standardabweichung (SD) | Nachweisgrenze [ng/ml] |
|-------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0 | 2,7 | 0,07 | 2 |

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Urinprobe $c=24$ ng/ml bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 127 %. Die Anzahl der Wiederholungen betrug 6.

| Verdünnung | Messwert [ng/ml] | Erwartet [ng/ml] | Wiederfindung % |
|------------|------------------|------------------|-----------------|
| 1:2 | 14,3 | 12 | 119 |
| 1:4 | 8,1 | 6 | 135 |

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Casomorphin kann nur aus Urin gemessen werden.

13. LITERATUR

Dohan FC. (1973) Coeliac disease and schizophrenia. *Br Med J.* Jul 7;3(5870):51-2

Haileselassie SS, Lee BH, Gibbs BF. (1999) Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J Dairy Sci.* Aug; 82(8):1612-7

Hole K, Lingjaerde O, Mørkrid L, Bøler JB, Saelid G, Diderichsen J, Ruud E, Reichelt KL. Attention deficit disorders: a study of peptide-containing urinary complexes. (1988) *J Dev Behav Pediatr.* Aug; 9(4):205-12

Jinsmaa Y, Yoshikawa M. (1999) Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides.* 20(8):957-62

Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin PM, Castanas E. (1996) Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). *Biochem J.* Nov 1;319 (Pt 3):903-8

Kaplan BJ, McNicol J, Conte RA, Moghadam HK (1989) Dietary replacement in preschool-aged hyperactive boys. *Pediatrics.* Jan; 83(1):7-17

Nygaard E, Reichelt KL, Fagan JF. (2001) The relation between the psychological functioning of children with Down syndrome and their urine peptide levels and levels of serum antibodies to food proteins. *Downs Syndr Res Pract.* Jul; 6(3):139-45

Reichelt KL, Knivsberg AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? (2003) *Nutr Neurosci*. Feb; 6(1):19-28

Sun Z, Cade R. (2003) Findings in normal rats following administration of gliadorphin-7 (GD-7). *Peptides*. Feb; 24(2):321-3

Teschemacher H, Koch G, Brantl V. (1997) Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*. 43(2):99-117

Trompette A, Claustre J, Caillon F, Jourdan G, Chayvialle JA, Plaisancié P (2003) Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *J Nutr*. Nov; 133(11):3499-503

White JF. (2003) Intestinal pathophysiology in autism. *Exp Biol Med* (Maywood). Jun; 228(6):639-49

Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J Biol Chem*. 1979 Apr 10;254(7):2446-9

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

18.12.2007

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

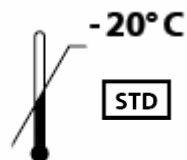
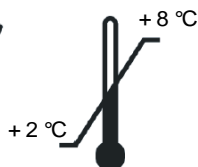
Casomorphin ELISA Kit

For the determination of Casomorphin in urine

Valid from 14.12.2007



K 7010



STD



1. INTENDED USE

This ELISA Kit is intended for the determination of Casomorphin in urine. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Casomorphin is a 7 amino acids peptide derived from the milk protein casein. Casein-derived peptides bind to opioid receptors in the brain and exhibit morphine-like effects, for example like heroin. These compounds have been shown to react with areas of the brain, which are involved in speech and auditory integration.

Urine samples from people with autism and schizophrenia contained high amounts of casomorphin. It is suspected that this peptide may also be elevated in other disorders such as chronic fatigue, fibromyalgia, and depression. Symptom remission has been observed after exclusion of dairy products from the diet.

Indication

- Autism
- Schizophrenia

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. Sample dilution buffer is used for sample preparation. Afterwards, the diluted samples and a polyclonal Casomorphin-antiserum are incubated in microtiter plate wells coated with a Casomorphin-derivative (tracer). During the incubation, the target Casomorphin in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. Casomorphin in the sample displaces the antibodies bound to the tracer. Therefore, the concentration of the tracer-bound antibodies is inverse proportional to the Casomorphin concentration in the sample. During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody, which binds to the polyclonal anti-Casomorphin antibodies, is added to each microtiter well. After washing the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine (TMB) is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the Casomorphin concentration in the sample; this

means high Casomorphin concentration in the sample reduces the concentration of the tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal.

A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. Casomorphin present in the patient samples is determined directly from this curve.

The ELISA results are normalized to the creatinine concentration of the urine sample. For this reason, a parallel determination of the creatinine concentration is required.

4. MATERIAL SUPPLIED

| Catalog No | Content | Kit Components | Quantity |
|------------|----------|--------------------------------------|-----------------------------|
| K7010MTP | PLATE | One holder with precoated strips | 12 x 8 wells |
| K7010ST | STD | Standards | 6 x 1 vial |
| K7010KO | CTRL 1+2 | Controls in dilution buffer | 2 x 1 vials |
| K7010WP | WASHBUF | BM Wash buffer concentrate (10 fold) | 1 x 100 ml |
| K7010CSP | 2.ABDIL | Conjugate stabilizing buffer | 24 ml |
| K7010AK | AB | Casomorphin antibody (lyophilized) | 3 x 1 vial |
| K7010K | 2.AB | POD antibody (concentrate) | 120 µl |
| K7010DB | DIL | Dilution buffer | 50 ml |
| K7010AVR | ABBUF | Antibody dilution buffer | 3 x 3,5 ml (lyophilized) |
| K7010TMB | SUB | TMB substrate | 2 x 15 ml |
| K7010AC | STOP | Stop solution | 12 ml |

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Cooling centrifuge capable of 4000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (BM-Wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C** for **one month**.
- The **2.AB** (POD antibody) must be diluted **1:200** in **2.ABDIL** (conjugate stabilizing buffer) (110 μ l 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). The undiluted 2.AB is stable at **2-8°C** until expiry date stated on the label. **Diluted 2.AB is not stable over a longer period and can be stored at 2-8°C for only 5 days.**
- The **ABBUF** (antibody dilution buffer) must be reconstituted in **3,5 ml** of diluted **BM wash buffer** per vial (total volume 3 x 3,5 ml = 10,5 ml).

- The **AB** (Casomorphin antibody) must be diluted in the **reconstituted antibody dilution buffer**. For this, the total content of each AB vial is transferred in the vial with reconstituted ABBUF. The empty AB vial should be rinsed with appr. 0,5 ml of AB solution. The AB solution must be prepared **directly before use**. Each AB vial can be used separately. In this way, the ELISA test can be performed up to 3 times. If more AB solution than the content of 1 vial is needed for the test, the reconstituted solutions can be pooled in a separate vial.
- **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be stored at **-20°C**. Thaw before use in the test, dilute **1:10 in DIL** (dilution buffer) and re-freeze immediately after use. **STD** (standards) and **CTRL** (controls) can be re-frozen up to 2 times.
- The Casomorphin concentration can vary slightly from charge to charge. The actual concentration is stated on the QC-protocol supplied with each kit.
- All other test reagents can be stored at room temperature. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package). The **STD** (standards) must be stored at **-20°C**.

7. PRECAUTIONS

- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SAMPLE AND TEST PREPARATION

- Urine is suited for this test system.
- Samples should be sent cooled; but they are stable for 24 h at room temperature.
- Samples must be diluted at least **1:10 in DIL** (dilution buffer) prior to analyses.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- The ELISA results are normalized to the creatinine concentration of the urine sample. For this reason, a parallel determination of the creatinine concentration is required.

Sample preparation

Samples are diluted in DIL (dilution buffer) by factor **1:10** or 1:100 if the measurement range is exceeded.

Test procedure

| | |
|----|---|
| 1. | Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C) |
| 2. | Mark the positions of STD (standards) / CTRL (controls) / SAMPLE (samples) in duplicate on a protocol sheet |
| 3. | Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips in the closed original package bag at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label |
| 4. | Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted BM Wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution |

| | |
|-----|---|
| 5. | For the analysis in duplicate, pipette 2 x 100 µl of diluted STD (standards) / CTRL (controls) / SAMPLE (samples) into respective well of the microtiter plate (PLATE) |
| 6. | Add 100 µl diluted AB (Casomorphin antibody) into each well |
| 7. | Cover plate tightly and incubate for 15-20 hours at 2-8°C |
| 8. | Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted BM Wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution |
| 9. | Add 200 µl diluted 2. AB (POD antibody) into each well |
| 10. | Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer |
| 11. | Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted BM Wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution |
| 12. | Add 200 µl of SUB (TMB substrate) into each well |
| 13. | Incubate for 5-15 min at room temperature in the dark* |
| 14. | Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly |
| 15. | Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference |

*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. EVALUATION OF RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Expected values

The ELISA results are normalized to the creatinine concentration of the urine sample.

Evaluation

$$\text{Concentration}_{\text{Sample}} [\text{ng}/\mu\text{mol Creatinine}] = \frac{\text{Casomorphin Concentration}_{\text{Sample}} [\text{ng/ml}]}{\text{Creatinine Concentration}_{\text{Sample}} [\text{mmol/l}]}$$

Based on internal studies of evidently healthy persons (n=23) a mean value of 0.94 ng/μmol creatinine was estimated.

Urine (n = 23): 0.94 ng/μmol creatinine (SD: 0.50 ng/μmol creatinine)

We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

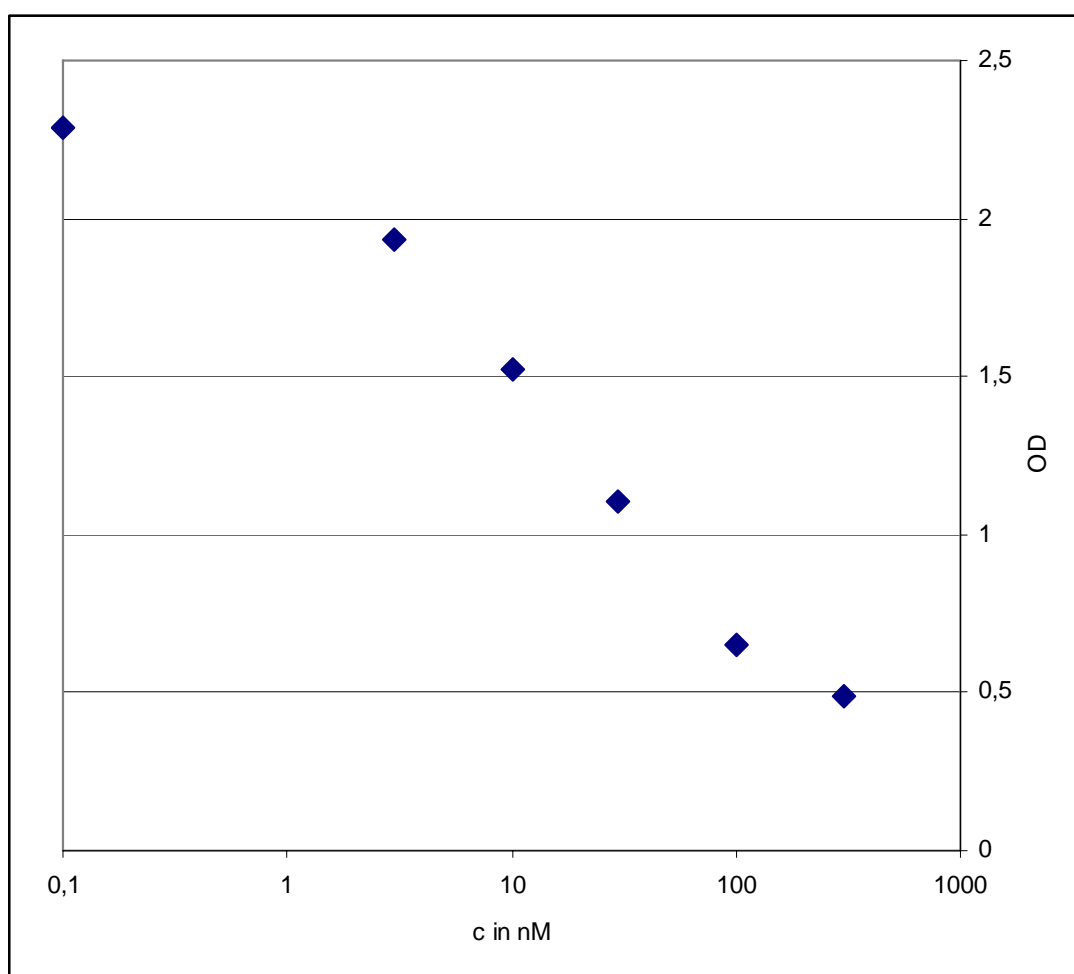
Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the 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.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from calibration curve if a dilution of 1:10 has been used.

In the following an example of a calibration curve is given.

Example of a calibration curve



11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross reactivity

Gliadorphin: No cross reactivity was observed with gliadorphin at concentration up to 1000 ng/ml in urine.

Casein: No cross reactivity was observed with casein at concentration up to 10 µg/ml in urine.

Precision and reproducibility

| Intra-Assay (n=18) | | |
|--------------------|---------------------|-------------------------|
| Sample | Casomorphin [ng/ml] | Standard Deviation (SD) |
| 1 | 3,5 | 13,8% |
| 2 | 13 | 11,1% |

| Inter-Assay (n=8) | | |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| Sample | Casomorphin [ng/ml I] | Standard deviation (SD) |
| 1 | 3,7 | 14,4% |
| 2 | 12,5 | 10,3% |

Sensitivity

The detection limit was set as $B_0 + 1SD$. The zero-standard was measured 12 times.

| Sample | Casomorphin mean value [OD] | Standard Deviation (SD) | Detection limit [ng/ml] |
|--------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 2,7 | 0,07 | 2 |

Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a urine sample spiked with 24 ng/ml casomorphin. The mean linearity was 127%. The number of the measurement was 6.

| Dilution | Measured [ng/ml] | Expected [ng/ml] | Recovery [%] |
|----------|------------------|------------------|--------------|
| 1:2 | 14,3 | 12 | 119 |
| 1:4 | 8,1 | 6 | 135 |

12. LIMITATIONS

Casomorphin can be determined only in urine samples.

13. REFERENCES

Dohan FC. (1973) Coeliac disease and schizophrenia. *Br Med J.* Jul 7;3(5870):51-2

Haileselassie SS, Lee BH, Gibbs BF. (1999) Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J Dairy Sci.* Aug; 82(8):1612-7

Hole K, Lingjaerde O, Mørkrid L, Bøler JB, Saelid G, Diderichsen J, Ruud E, Reichelt KL. Attention deficit disorders: a study of peptide-containing urinary complexes. (1988) *J Dev Behav Pediatr.* Aug; 9(4):205-12

Jinsmaa Y, Yoshikawa M. (1999) Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides.* 20(8):957-62

Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin PM, Castanas E. (1996) Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). *Biochem J.* Nov 1;319 (Pt 3):903-8

Kaplan BJ, McNicol J, Conte RA, Moghadam HK (1989) Dietary replacement in preschool-aged hyperactive boys. *Pediatrics.* Jan; 83(1):7-17

Nygaard E, Reichelt KL, Fagan JF. (2001) The relation between the psychological functioning of children with Down syndrome and their urine

peptide levels and levels of serum antibodies to food proteins. *Downs Syndr Res Pract.* Jul; 6(3):139-45

Reichelt KL, Knivsberg AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? (2003) *Nutr Neurosci.* Feb; 6(1):19-28

Sun Z, Cade R. (2003) Findings in normal rats following administration of gliadorphin-7 (GD-7). *Peptides.* Feb; 24(2):321-3

Teschemacher H, Koch G, Brantl V. (1997) Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers.* 43(2):99-117

Trompette A, Claustre J, Caillon F, Jourdan G, Chayvialle JA, Plaisancié P (2003) Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *J Nutr.* Nov; 133(11):3499-503

White JF. (2003) Intestinal pathophysiology in autism. *Exp Biol Med* (Maywood). Jun; 228(6):639-49

Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J Biol Chem.* 1979 Apr 10;254(7):2446-9

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for in-vitro-diagnostic use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can, therefore, not be held reliable for any damage resulting from this.

18.12.2007

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number