

Casomorphin ELISA Kit

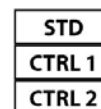
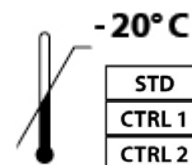
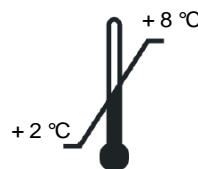
Zur Bestimmung von Casomorphin im Urin

For the determination of Casomorphin in urine

Gültig ab / Valid from 11.07.2013



K 7010



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 / table of contents	Seite / page
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
8. PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
<i>PIPETTIERSHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>7</i>
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	<i>11</i>
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>KREUZREAKTION</i>	<i>11</i>
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>12</i>
<i>SENSITIVITÄT</i>	<i>12</i>
<i>LINEARITÄT</i>	<i>12</i>
12. EINSCHRÄNKUNGEN	13
13. LITERATUR	13
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14

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>TEST PROCEDURE</i>	20
10. EVALUATION OF RESULTS	22
<i>EXPECTED VALUES</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>CROSS REACTIVITY</i>	24
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	24
<i>SENSITIVITY</i>	24
<i>LINEARITY</i>	25
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 einem 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 Sekundäntikörper 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, lyophilisiert	6 x 1 Fläschchen
K7010KO1 K7010KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K7010WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K7010CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	24 ml
K7010AK	AB	Casomorphin-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K7010K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat 200x)	120 µl
K7010DB	DIL	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	50 ml
K7010VR	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K7010TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	25 ml
K7010AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405nm

* 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 < 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

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 2x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), 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.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL)** werden lyophilisiert geliefert und müssen für den Test rekonstituiert werden. Dafür wird der Inhalt jedes Fläschchens in **1 ml Verdünnungspuffer (DIL)** gelöst und für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Die rekonstituierten Standards und Kontrollen werden bei **-20°C** gelagert und können bis zu 2x wieder

eingefroren werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach der Entnahme erfolgen.

- Der **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** wird in **5,6 ml verdünntem Waschpuffer** pro Fläschchen rekonstituiert (Gesamtvolumen: $2 \times 5,6 \text{ ml} = 11,2 \text{ ml}$).
- Der **Casomorphin-Antikörper (AB)** wird lyophilisiert geliefert und muss für den Test rekonstituiert werden. Hierzu wird der Inhalt jedes Fläschchens in **5,5 ml Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** gelöst und für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Durch die Aufteilung des AB in zwei Fläschchen ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Wird im Testansatz mehr als 1 Fläschchen Antikörper-Lösung benötigt, sollten die rekonstituierten Lösungen in einem separaten Gefäß zusammengeführt werden. Verdünnter Casomorphin-Antikörper kann **1 Monat** bei **-20°C** aufbewahrt werden.
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:200** in Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL) verdünnt (z.B. **110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL**, nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünnter POD-Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünnter POD-Antikörper kann **1 Woche** bei **2-8°C** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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 (Empfehlung: Morgenurin).
- Die Probe sollte gekühlt versendet werden, ist aber bis 24 Stunden bei Raumtemperatur stabil.
- Die Proben werden vor dem Einsatz im Test mindestens **1:10** in **Verdünnungspuffer (DIL) verdünnt** (siehe Pipettierschema Testdurchführung).
- Die Haltbarkeit der Proben beträgt zwei Tage bei 2-8°C. Zur längeren Lagerung sollten die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

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

Pipettierschema Testdurchführung

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:10** in **Verdünnungspuffer (DIL)** verdünnt werden. Dafür werden z.B. **50 µl Probe** mit **450 µl DIL** verdünnt.

Bei Überschreitung des Messbereiches werden die Proben **1:100 verdünnt**, z.B. **10 µl Probe + 990 µl DIL**.

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (15-30°C) aufweisen.
2. Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren.
3. Benötigte Mikrotiterplattenstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
4. Mikrotiterplattenstreifen 5 x 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 rekonstituierten Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ verdünnte Probe (SAMPLE) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettieren.
6. 100 µl verdünnten Casomorphin-Antikörper (AB) in alle Vertiefungen pipettieren. Platte luftdicht abdecken.
7. Über Nacht (15-20 Stunden) bei 2-8°C inkubieren.
8. Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9. 200 µl verdünnten POD-Antikörper (2.AB) in alle Vertiefungen pipettieren.
10. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
11. Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12. 200 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
13. 5-15 min bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren*.

14. **100 µl Stopplösung (STOP)** in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen.
15. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

* 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

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung, sind Standards, Kontrollen und Proben gleich verdünnt, deshalb wird **bei der Auswertung der Ergebnisse kein Verdünnungsfaktor eingerechnet**.

Bei einer 1:100 Verdünnung der Proben muss das Ergebnis mit 10 multipliziert werden.

Auswertungsfunktionen

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen 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 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

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

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

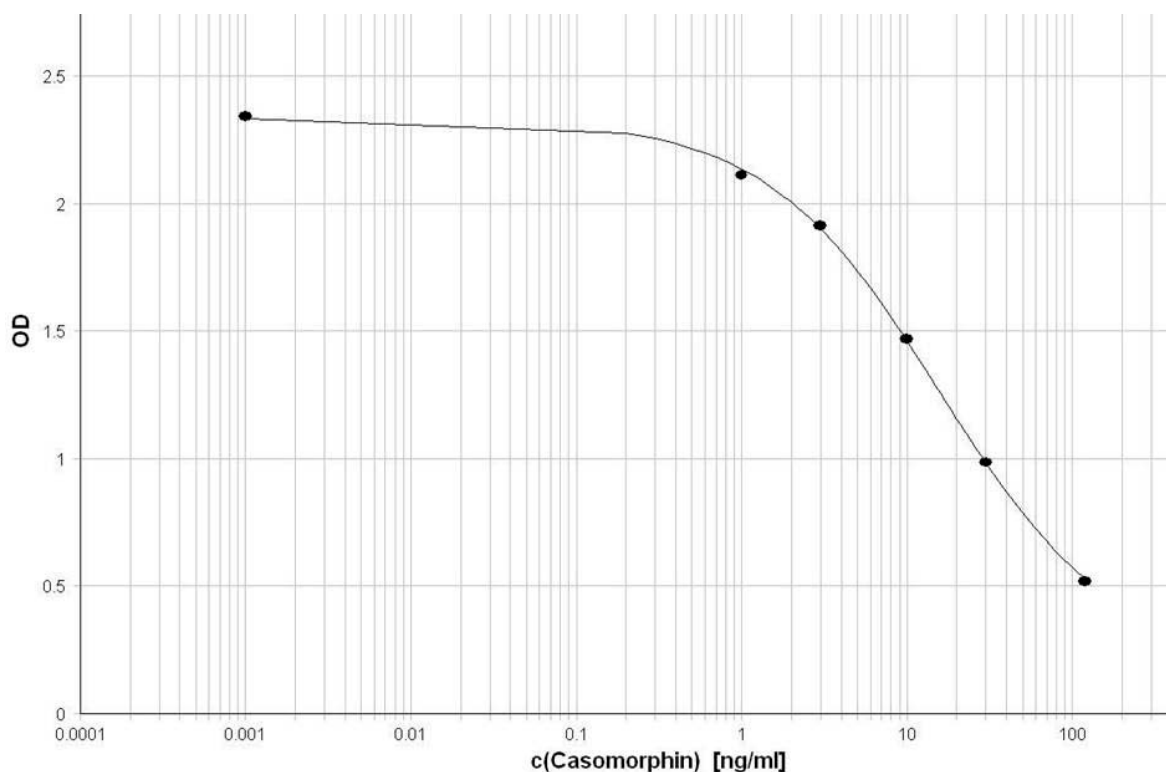
Kontrollen

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 ng/ml abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n=223) wurde ein Normalbereich von

0 - 0,8 ng Casomorphin / μ mol Kreatinin

ermittelt.

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.

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 μ g/ml im Urin feststellbar.

Präzision und Reproduzierbarkeit

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

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

Sensitivität

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

Probe	Casomorphin Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [ng/ml]
Standard Null	2,7	0,07	0,5

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer gespikten Urinprobe ($c = 24 \text{ ng/ml}$) bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 127 % ($n=6$).

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 in 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.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt 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 Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		

Manual

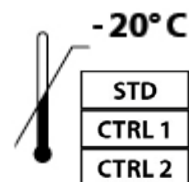
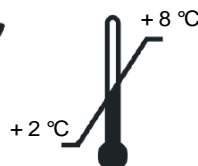
Casomorphin ELISA Kit

For the determination of Casomorphin in urine

Valid from 11.07.2013



K 7010



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, lyophilized	6 x 1 vial
K7010KO1 K7010KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls, lyophilized	2 x 1 vial
K7010WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K7010CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	24 ml
K7010AK	AB	Casomorphin antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K7010K	2.AB	POD antibody (concentrate 200x)	120 µl
K7010DB	DIL	Dilution buffer, ready to use	50 ml
K7010VR	ABBUF	Antibody dilution buffer (lyophilized)	2 x 1 vial
K7010TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	25 ml
K7010AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm or 405nm

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 μ m) with an electrical conductivity of < 0.055 μ S/cm at 25°C (\geq 18.2 M Ω cm).

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 2 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.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The WASHBUF 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.**
- **Standards (STD)** and **controls (CTRL)** are lyophilized and must be reconstituted in **1 ml of dilution buffer (DIL)** per vial. Put the vials on a horizontal shaker for 5 min. Store the reconstituted STD and CTRL frozen at **-20°C**, re-freeze immediately after use. They can be re-frozen up to 2 times.
- The **antibody dilution buffer (ABBUF)** must be reconstituted in **5.6 ml of diluted wash buffer** per vial (total volume 2 x 5.6 ml = 11.2 ml).

- The **Casomorphin antibody (AB)** is lyophilized and must be reconstituted in **5.5 ml of antibody dilution buffer (ABBUF)** per vial. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two AB vials. When more than one vial is to be used, combine the reconstituted solutions in a separate vial and mix prior to use. Diluted casomorphin antibody can be stored at **-20°C for one month**.
- Dilute the **POD antibody (2.AB) 1:200** with conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL) (e.g. **110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL**, prepare only the required amount). Undiluted POD antibody is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD antibody can be stored at **2-8°C for 1 week**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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 (recommendation: early morning urine).
- 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 (see test procedure).
- Samples are stable for two days at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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 AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- 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.

Test procedure

Dilute samples with **dilution buffer (DIL)** by **factor 1:10**, e.g. **50 µl sample + 450 µl DIL** (dilution buffer).

If the measurement range is exceeded, dilute samples **1:100**, e.g. **10µl sample + 990 µl DIL**.

1. Bring all reagents and samples to room temperature (15-30°C)
2. Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet.
3. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
4. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5. For the analysis in duplicate, pipette 2 x 100 µl of reconstituted standards (STD)/ controls (CTRL)/ diluted samples (SAMPLE) into the respective wells of the microtiter plate (PLATE).

6.	Add 100 µl reconstituted casomorphin antibody (AB) into each well, cover the plate tightly.
7.	Incubate overnight (15-20 hours) at 2-8°C
8.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
9.	Add 200 µl of diluted POD antibody (2.AB) into each well.
10.	Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm)
11.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12.	Add 200 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
13.	Incubate for 5-15 min at room temperature (15-30°C) in the dark*.
14.	Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.
15.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

* 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

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions (i.e. with the exact volumes for standards, controls and samples and with correct sample treatment) standards, controls and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for the calculation of results.**

For samples with 1:100 dilution, the results have to be multiplied by 10.

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using 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. 0.001).

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 linear abscissa for concentration.

Plausibility of the measured pairs of values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the pairs of values should be controlled manually.

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

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

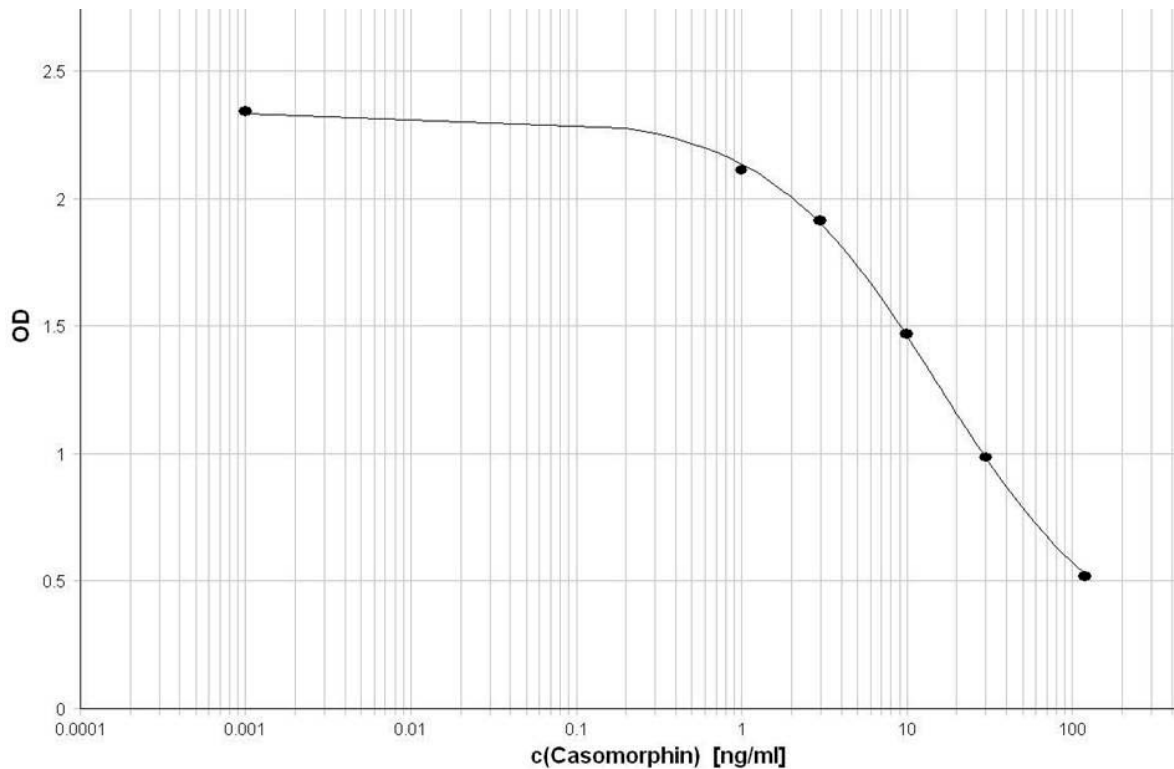
Controls

Control samples 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 the calibration curve in ng/ml if a dilution of 1:10 has been used.

In the following an example of a calibration curve is given. Do not use it for the calculation of your results

Example of calibration curve



Expected values

Based on internal studies of apparently healthy persons (n=223) a normal range of

0 - 0.8 ng casomorphin / μ mol creatinine

was estimated.

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross reactivity

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

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

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=18)		
Sample	Casomorphin [ng/ml]	Coefficient of variation (CV) [%]
1	3.5	13.8
2	13	11.1

Inter-Assay (n=8)		
Sample	Casomorphin [ng/ml I]	Coefficient of variation (CV) [%]
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]
Zero standard	2.7	0.07	0.5

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% (n=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 only be determined 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.
- All reagents in the test package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number