

Gliadorphin (Gliadomorphin) ELISA Kit

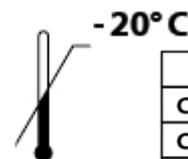
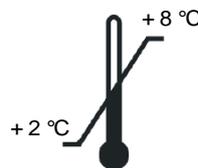
Zur Bestimmung von Gliadorphin im Urin

For the determination of Gliadorphin in urine

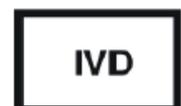
Gültig ab / Valid from 23.03.2011



K 7011



STD
CTRL 1
CTRL 2
ASYREAG
2. AB



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	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>PROBENVORBEREITUNG</i>	<i>7</i>
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>7</i>
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	<i>9</i>
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>KREUZREAKTION</i>	<i>10</i>
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>11</i>
<i>SENSITIVITÄT</i>	<i>11</i>
<i>LINEARITÄT</i>	<i>11</i>
12. EINSCHRÄNKUNGEN	12
13. LITERATUR	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	18
8. SAMPLE AND TEST PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
<i>SAMPLE PREPARATION</i>	<i>19</i>
<i>TEST PROCEDURE</i>	<i>19</i>
10. EVALUATION OF RESULTS	20
<i>EXPECTED VALUES</i>	<i>21</i>
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>CROSS REACTIVITY</i>	<i>22</i>
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	<i>23</i>
<i>SENSITIVITY</i>	<i>23</i>
<i>LINEARITY</i>	<i>23</i>
12. LIMITATIONS	24
13. REFERENCES	24
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Bei Gliadorphin handelt es sich um ein 7 Aminosäuren langes Peptid, einem Abbauprodukt von Gliadin. 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 oder Schizophrenie zeigen erhöhte Spiegel von Gliadorphin im Urin. Es wird weiter vermutet, dass Gliadorphin auch bei ADHS oder Lernstörungen eine Rolle spielt. Hier wurde nach Verordnung einer gluten-/ kaseinfreien Diät eine Remission der Symptome beobachtet.

Indikation

- Autismus
- Schizophrenie
- Zöliakie

3. TESTPRINZIP

Der Nachweis basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Verdünnungspuffer versetzt. Anschließend wird die Probe mit einem Gliadorphinderivat (Tracer) in einer, mit einem polyklonalen Gliadorphin-Antikörper beschichteten, ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Tracer aus der Bindung an den Antikörper. Daher ist die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Tracer 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 Gliadorphin in

der Probe reduziert sich die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers 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

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7011MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7011ST	STD	Standards (lyophilisiert)	6 x 1 Fläschchen
K7011KO	CTRL 1+2	Kontrollen (lyophilisiert)	2 x 1 Fläschchen
K7011WP	WASHBUF	BM-Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K7011CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer	12 ml
K7011AR	ASYREAG	Gliadorphinderivat (Assayreagenz)	3 x 1 Fläschchen
K7011K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat)	60 µl
K7011RP	DERBUF	Reaktionspuffer	30 ml
K7011TMB	SUB	TMB-Substrat	25 ml
K7011AC	STOP	Stopplösung	15 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
- Horizontalschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- 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 (55 µl 2.AB + 11 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.**
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL)** werden gebrauchsfertig geliefert und sind bereits in Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt. Sie werden bei -20°C gelagert und können bis zu 2 mal wieder aufgetaut werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach der Entnahme erfolgen.
- Das **ASYREAG** (Gliadorphinderivat) wird lyophilisiert geliefert und muss für den Test rekonstituiert werden. Dafür wird der Inhalt jedes Fläschchens in **2,25 ml verdünntem BM-Waschpuffer** gelöst und für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Durch die Aufteilung des **ASYREAG** in 3 Gefäße ist der ELISA in drei Ansätze teilbar. Das rekonstituierte Gliadorphinderivat wird bei -20°C gelagert und kann bis zu 2 mal wieder aufgetaut werden. Wird im Testansatz mehr als 1 Fläschchen ASYREAG benötigt, sollten die rekonstituierten Lösungen in einem separaten Gefäß zusammengeführt werden.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2–8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H₂SO₄. H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünntem Zustand mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ 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 Haltbarkeit der Probe beträgt zwei Tage bei 2–8°C. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Proben müssen vor der Analyse **1:20** in **DERBUF** (Reaktionspuffer) 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 AG 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 **1:20 in DERBUF** (Reaktionspuffer) verdünnt. Dafür werden zum Beispiel **25 µl** Probe mit **475 µl** DERBUF verdünnt.

Pipettierschema Testdurchführung

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2. Positionen für STD (Standards) / CTRL (Kontrollen) / SAMPLE (Proben) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
3. Die benötigten Streifen der PLATE (Mikrotiterplatte) 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 50 µl rekonstituierten STD (Standard) / CTRL (Kontrolle) / verdünnte SAMPLE (Probe) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenstreifen pipettieren
6. 50 µl rekonstituiertes ASYREAG (Gliadorphinderivat) in die Vertiefungen pipettieren
7. Streifen luftdicht abdecken und über Nacht (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 WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
9. 100 µl verdünnten 2. AB (POD-AK) in alle Vertiefungen pipettieren
10. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren

11. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
12. 100 µl SUB (TMB-Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
13. 12-25 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
14. 50 µl STOP (Stopplösung) 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.**

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 Kreatinin-konzentration des Urins normiert.

Auswertung

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n=167) wurde ein Normalbereich von

0 - 0,9 ng/μmol 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.

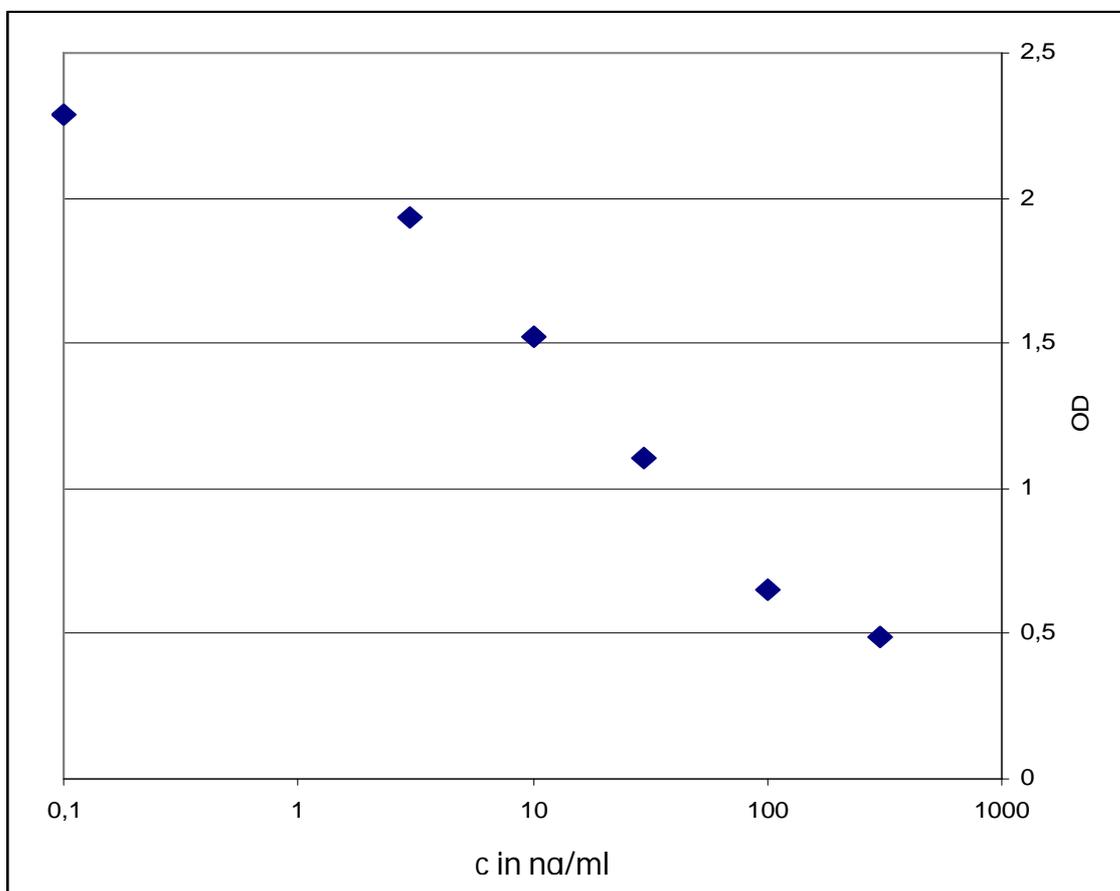
Kontrollen

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 1:20 direkt aus der Kalibrierkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.

Musterkalibrierkurve



11. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktion

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

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

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=6)		
Probe	Gliadorphin [ng/ml]	Standardabweichung (SD) [%]
1	6,45	12,8
2	22,6	7,8

Inter-Assay (n=4)		
Probe	Gliadorphin [ng/ml]	Standardabweichung (SD) [%]
1	6,3	12,7
2	21,8	9,3

Sensitivität

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

Probe	Gliadorphin-Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD) [%]	Nachweisgrenze [ng/ml]
0	3	0,12	2

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Urinprobe $c=32 \text{ ng/ml}$ bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 132 %. Die Anzahl der Wiederholungen betrug 6.

Verdünnung	Messwert [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1:2	24	16	150
1:4	9,1	8	114

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Gliadorphin kann nur in Urin gemessen werden.

13. LITERATUR

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

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

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

Vojdani A, O'Bryan T, Green JA, Mccandless J, Woeller KN, Vojdani E, Nourian AA, Cooper EL. (2004) Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutr Neurosci.* Jun; 7(3):151-61

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 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

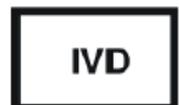
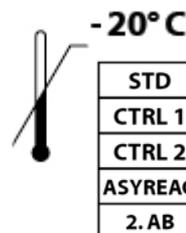
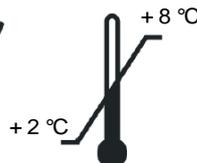
Gliadorphin (Gliadomorphin) ELISA Kit

For the determination of Gliadorphin in urine

Valid from 23.03.2011



K 7011



1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Gliadorphin is a 7 amino acids peptide which is formed during digestion of the gliadin component of the gluten protein. Gluten-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, schizophrenia, and celiac disease contain high amounts of gliadorphin. 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 wheat and dairy products from the diet.

Indication

- Autism
- Schizophrenia
- Celiac disease

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. Reaction buffer is used for sample preparation. Afterwards, the diluted samples and a Gliadorphin-derivative (tracer) are incubated in the microtiter plate wells coated with a Gliadorphin-antiserum. During the incubation, the target Gliadorphin in the sample competes with the tracer for the binding on the polyclonal antibodies immobilized on the wall of the microtiter wells. Gliadorphin in the sample displaces the tracer bound to the antibodies. Therefore, the concentration of the antibody-bound tracer is inverse proportional to the Gliadorphin concentration in the sample. During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody, which binds to the tracer, 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 Gliadorphin concentration in the sample; this means high Gliadorphin concentration in the sample reduces the concentration of the antibody-bound tracer 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. Gliadorphin 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

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K7011MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K7011ST	STD	Standards	6 x 1 vial
K7011KO	CTRL 1+2	Controls	2 x 1 vial
K7011WP	WASHBUF	BM Wash buffer concentrate (10 fold)	2 x 100 ml
K7011CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer	12 ml
K7011AR	ASYREAG	Gliadorphin-derivative (Assay reagent)	3 x 1 vial
K7011K	2.AB	POD antibody (concentrate)	60 µl
K7011RP	DERBUF	Reaction buffer	30 ml
K7011TMB	SUB	TMB substrate	25 ml
K7011AC	STOP	Stop solution	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker

- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- 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 µl** 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) (55 µl 2.AB + 11 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.**
- **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are ready-to-use and already diluted in reaction buffer (DERBUF). Store Standards and Controls frozen at -20°C, thaw before use in the test, and re-freeze immediately after use. Standards and Controls can be re-frozen up to 3 times.
- The **ASYREAG** (Gliadorphin-derivative) is lyophilized and has to be reconstituted in **2,25 ml** of **diluted BM wash buffer** per vial (total volume 3 x 2,25 ml = 6,75 ml). Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. Store ASYREAG frozen at -20°C. The reconstituted Gliadorphin-derivative can be re-frozen up to two times. If more ASYREAG than the content of 1 vial is needed for the test, the reconstituted solutions can be pooled in a separate vial.

- All other test reagents can be stored at 2 –8°C. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package).

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Stop solutions 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; they are stable for 24 h at room temperature.
- Samples are stable for two days at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C.
- Samples must be diluted 1:20 in **DERBUF** (reaction 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 AG 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 have to be diluted in **DERBUF** (reaction buffer) by factor 1:20, i.e. 25 μ l sample and 475 μ l DERBUF.

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 covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4. 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
5. For the analysis in duplicate, pipette 2 x 50 μl of reconstituted STD (standards) / CTRL (controls) / diluted SAMPLE (samples) into respective well of the microtiter plate
6. Add 50 μl reconstituted ASYREAG (Gliadorphin-derivative) into each well
7. Cover plate tightly and incubate overnight (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 should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
9. Add 100 μl of diluted 2. AB (POD antibody) into each well
10. Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer (180-240 rpm)

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 100 µl of SUB (TMB substrate) into each well
13. Incubate for 12-25 min at room temperature (18-26°C) in the dark*
14. Add 50 µl of STOP (stop solution) 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, e.g. with the exact volumes for standards, controls and samples/sample treatment, standards, controls and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for calculation of the 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

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

Based on internal studies of evidently healthy persons (n=167) a normal range of

0 - 0,9 ng/μmol Kreatinin

was estimated.

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

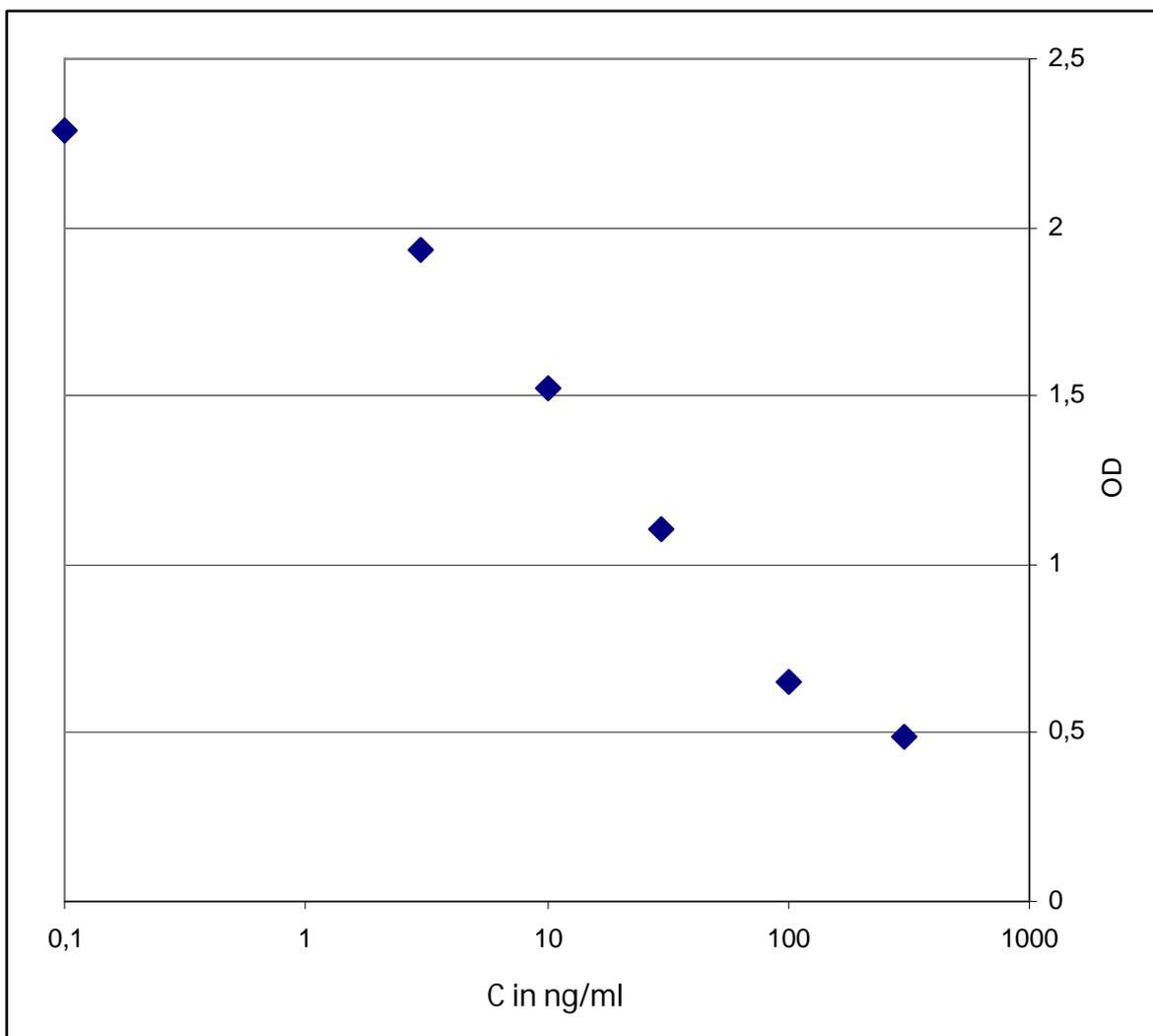
Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient

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 in ng/ml 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

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

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

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=6)		
Sample	Gliadorphin [ng/ml]	Standard Deviation (SD) [%]
1	6,45	12,8
2	22,6	7,8

Inter-Assay (n=4)		
Sample	Gliadorphin [ng/ml]	Standard deviation (SD) [%]
1	6,3	12,7
2	21,8	9,3

Sensitivity

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

Sample	Gliadorphin mean value [OD]	Standard Deviation (SD) [%]	Detection limit [ng/ml]
0	3	0,12	2

Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a urine sample spiked with 32 ng/ml Gliadorphin. The mean linearity was 132%. The number of the measurement was 6.

Dilution	Measured [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Recovery [%]
1:2	24	16	150
1:4	9,1	8	114

12. LIMITATIONS

Gliadorphin 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

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

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

Vojdani A, O'Bryan T, Green JA, Mccandless J, Woeller KN, Vojdani E, Nourian AA, Cooper EL. (2004) Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutr Neurosci.* Jun; 7(3):151-61

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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number