

# Gliadorphin (Gliadomorphin) ELISA Kit

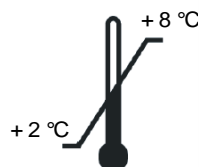
*Zur Bestimmung von Gliadorphin im Urin*

*For the determination of Gliadorphin in urine*

Gültig ab / Valid from 16.04.2009



K 7011



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

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>5</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
<i>PROBENVORBEREITUNG</i>	<i>7</i>
<i>VORBEREITUNG DER KARTUSCHEN</i>	<i>7</i>
<i>PIPETTIERSHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>7</i>
<b>10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>10</b>
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	<i>10</i>
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>12</b>
<i>KREUZREAKTION</i>	<i>12</i>
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>12</i>
<i>SENSITIVITÄT</i>	<i>12</i>
<i>LINEARITÄT</i>	<i>13</i>
<b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>13</b>
<b>13. LITERATUR</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>16</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>16</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>19</b>
<b>8. SAMPLE AND TEST PREPARATION</b>	<b>20</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
<i>SAMPLE PREPARATION</i>	<i>20</i>
<i>PREPARATION OF THE CARTRIDGES</i>	<i>20</i>
<i>TEST PROCEDURE</i>	<i>20</i>
<b>10. EVALUATION OF RESULTS</b>	<b>23</b>
<i>EXPECTED VALUES</i>	<i>23</i>
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
<i>CROSS REACTIVITY</i>	<i>25</i>
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	<i>25</i>
<i>SENSITIVITY</i>	<i>25</i>
<i>LINEARITY</i>	<i>26</i>
<b>12. LIMITATIONS</b>	<b>26</b>
<b>13. REFERENCES</b>	<b>26</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>27</b>

## 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

Zur Bestimmung des Gliadorphins wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung durchgeführt. Zur Anreicherung und Abtrennung störender Substanzen erfolgt eine Festphasenextraktion auf C<sub>18</sub>-Kartuschen. Das Eluat wird eingedampft, in Verdünnungspuffer rekonstituiert und im ELISA eingesetzt.

Der Nachweis basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Nach der Rekonstitution wird die Probe mit einem polyklonalen Gliadorphin-Antiserum in einer mit Gliadorphinderivat (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-Gliadorphin-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 Gliadorphin 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

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7011MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7011ST	STD	Standards	6 x 1 Fläschchen
K7011KO	CTRL 1+2	Kontrollen	2 x 1 Fläschchen
K7011WP	WASHBUF	BM-Waschpufferkonzentrat (10-fach)	1 x 100 ml
K7011CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer	24 ml
K7011AK	AB	Gliadorphin-Antikörper	3 x 1 Reaktionsgefäß
K7011K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat)	120 µl
K7011DR	DER	Derivatisierungsreagenz	3 x 20 mg
K7011LM	DMSO	Dimethylsulfoxid	1,1 ml
K7011WL	WASHSOL	20% TFA	50 ml
K7011EL	ELUSOL	Acetonitril	125 ml
K7011RP	DERBUF	Reaktionspuffer	15 ml
K7011BU	ASYBUF	Verdünnungspuffer für Kopplung	2,2 ml
K7011TMB	SUB	TMB-Substrat	25 ml
K7011AC	STOP	Stopplösung	15 ml
K7011AVR	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer	3 x 3,5 ml (lyophilisiert)

## 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)
- SPE-Kartuschen, C18
- Absaugeinheit für Festphasenextraktionskartuschen
- Vorrichtung zum Einengen der Probe (z.B. Vakuumzentrifuge)

## 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 x 3,5 ml = 10,5 ml).
- Der **gesamte Inhalt des AB (Gliadorphin-Antikörper)-Fläschchens** wird in ein geeignetes Gefäß (> 2,5 ml) überführt. Dazu werden 2,1 ml des zuvor **rekonstituierten Antikörperverdünnungspuffers** pipettiert. 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 Inhalt eines Fläschchens **DER (Derivatisierungsreagenz) (20 mg)** wird in **300 µl DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Durch die Aufteilung des DER in 3 Gefäße ist der ELISA in drei Ansätze teilbar. Bitte beachten: **DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.**
- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO im Wasserbad bei 20-25°C erwärmen.
- Herstellung der **Waschlösung**, 1% TFA:  
50 ml **WASHSOL** (20% Trifluoressigsäure) + 950 ml ddH<sub>2</sub>O
- Herstellung der **Elutionslösung**, 60% Acetonitril:  
125 ml **ELUSOL** (Acetonitril) + 85 ml ddH<sub>2</sub>O
- Der **STD** (Standard) und die **CTRL** (Kontrollen) werden gebrauchsfertig bei **-20°C** gelagert. Für den Test werden die Standards und Kontrollen aufgetaut und können bis zu 2 mal wieder eingefroren werden.
- Der Gehalt an Gliadorphin 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 Stopp- und Waschlösung stellen verdünnte Säuren dar, die auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden müssen. Die Lösungen verursachen 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.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt zwei Tage bei 2-8°C. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Die Proben werden vor der Analyse mit einer Festphasenextraktion aufgereinigt.

## 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*

#### Vorbereitung der Kartuschen

Kartuschen 1 x mit 1 ml **Elutionslösung** und anschließend 3 x mit 3 ml **Waschlösung** äquilibrieren.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

#### Extraktion

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2. Positionen für <b>STD</b> (Standards) / <b>CTRL</b> (Kontrollen) / <b>SAMPLE</b> (Proben) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
3. Benötigte Festphasenkartuschen aus der Packung entnehmen und konditionieren (s. Punkt 9, Vorbereitung der Kartuschen) <b>Vorsicht – mit Acetonitril nur unter einem Abzug arbeiten!</b>

4. Zu <b>1,5 ml Urin, CTRL</b> (Kontrollen) und <b>STD</b> (Standards) werden <b>1,5 ml Waschlösung</b> gegeben und gemischt
5. <b>Verdünnte Proben</b> 20 min. bei 4°C und 4000 x g zentrifugieren
6. <b>Überstand</b> auf die vorbereiteten Kartuschen geben und einziehen lassen
7. <b>2 x mit 3 ml Waschlösung</b> spülen
8. <b>1 x mit 3 ml Elutionslösung</b> eluieren Der Elutionsvorgang muss sich <b>mindestens über 60 Sekunden</b> erstrecken, da sonst <b>keine optimale Wiederfindung</b> garantiert werden kann.
9. <b>Eluat</b> unter Stickstoff oder mit einer Vakuumzentrifuge eindampfen

### Derivatisierung

1. Eingedampfte Probe in <b>250 µl DERBUF</b> (Reaktionspuffer) aufnehmen. Für die Derivatisierung werden <b>1 x 200 µl</b> eingesetzt
2. <b>200 µl der rekonstituierten Probe mit 10 µl DER</b> (Derivatisierungsreagenz) in Reaktionsgefäß (1,5 ml) pipettieren, mischen und sofort auf einen Horizontalschüttler <b>30 min</b> bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
3. Anschließend in alle Reaktionsgefäße <b>40 µl ASYBUF</b> (Verdünnungspuffer) zugeben; <b>30 min</b> auf Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubieren

### ELISA

1. Die benötigten Streifen der PLATE (Mikrotiterplatte) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können in der verschlossenen Originalverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden
2. Mikrotiterplattenstreifen <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen

3. <b>2 x 50 µl STD</b> (Standard) / <b>CTRL</b> (Kontrolle) / <b>SAMPLE</b> (Probe) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenstreifen pipettieren
4. <b>50 µl</b> verdünnten <b>AB</b> (Gliadorphin-AK) in die Vertiefungen pipettieren
5. Streifen luftdicht abdecken und <b>15-20 Stunden bei 2-8°C</b> inkubieren
6. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
7. <b>100 µl</b> verdünnten <b>2. AB</b> (POD-AK) in alle Vertiefungen pipettieren
8. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> unter Schütteln inkubieren
9. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
10. <b>100 µl SUB</b> (TMB-Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
11. <b>12-25 min bei Raumtemperatur</b> im Dunkeln inkubieren*
12. <b>50 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
13. Extinktion <b>sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n=23) wurde ein Mittelwert von 0,84 ng/μmol Kreatinin ermittelt.

Urin (n = 23): 0,84 ng/μmol Kreatinin (Stabw: 0,52 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.

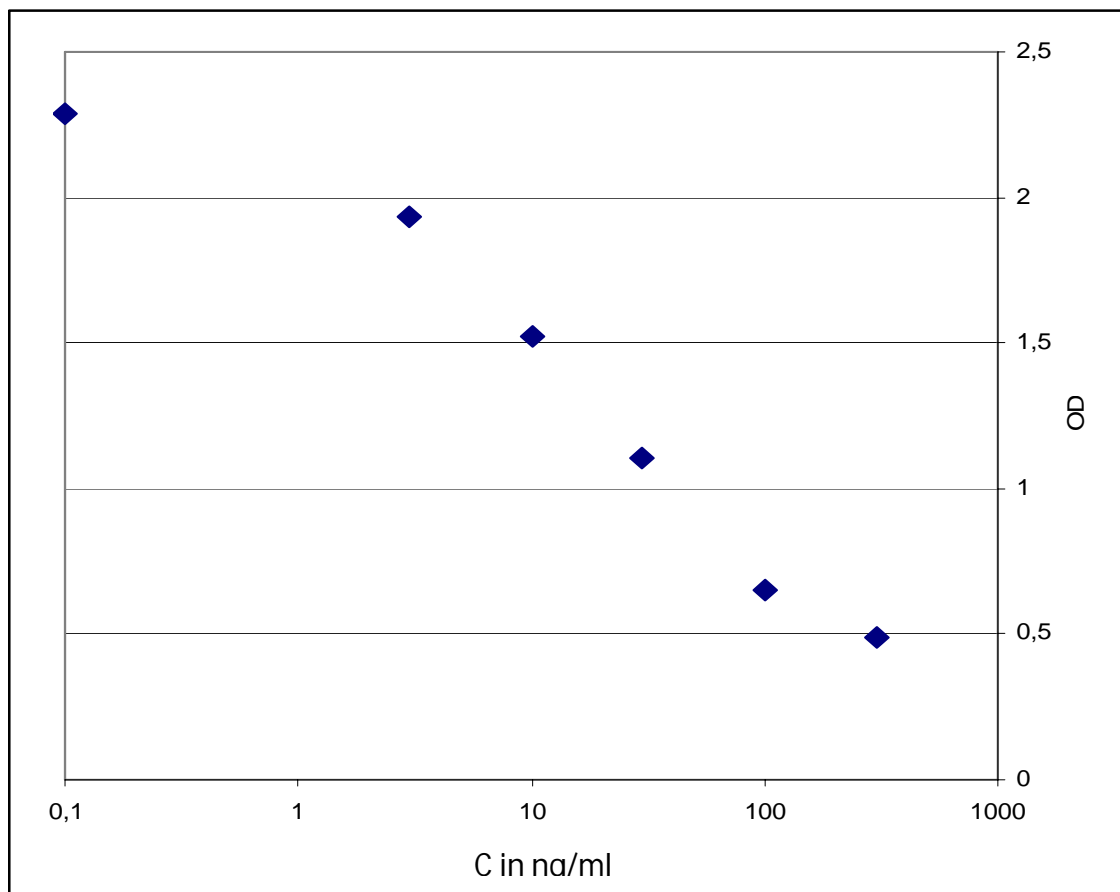
### Kontrollen

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 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  $c=32$  ng/ml bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 123 %. Die Anzahl der Wiederholungen betrug 6.

Verdünnung	Messwert [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Wiederfindung %
1:2	24	16	133
1:5	9,1	8	114

## 12. EINSCHRÄNKUNGEN

Gliadorphin kann nur aus 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 abgestimmte Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

16.04.2009

### Verwendete Symbole:

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

Manual

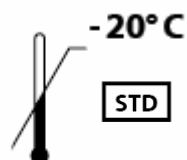
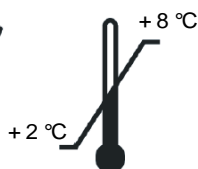
# Gliadorphin (Gliadomorphin) ELISA Kit

*For the determination of Gliadorphin in urine*

Valid from 16.04.2009



K 7011



STD



## 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

## 4. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step of the test involves a sample preparation procedure using solid phase extraction on C18-cartridges to remove interferences by the sample matrix and to concentrate the compounds of interest. The eluate is evaporated, reconstituted in dilution buffer and analyzed according to the ELISA procedure.

The used method is a competitive enzyme linked immunoassay. The reconstituted sample is incubated with a polyclonal Gliadorphin-antiserum in the microtiter plate wells coated with a Gliadorphin-derivative (tracer). During the incubation, the target Gliadorphin in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. Gliadorphin in the sample displaces the antibodies bound to the tracer. Therefore, the concentration of the tracer-bound antibodies is inverse proportional to the Gliadorphin concentration in the sample. During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody, which binds to the polyclonal anti-Gliadorphin 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 Gliadorphin concentration in the sample; this means

high Gliadorphin 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. 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)	1 x 100 ml
K7011CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer	24 ml
K7011AK	AB	Gliadorphin antibody	3 x 1 vial
K7011K	2.AB	POD antibody (concentrate)	120 µl
K7011DR	DER	Derivatization reagent	3 x 20 mg
K7011LM	DMSO	Dimethylsulfoxide	1,1 ml
K7011WL	WASHSOL	20% TFA	50 ml
K7011EL	ELUSOL	Acetonitrile	125 ml
K7011RP	DERBUF	Reaction buffer	15 ml
K7011BU	ASYBUF	Dilution buffer for coupling	2,2 ml
K7011TMB	SUB	TMB substrate	25 ml
K7011AC	STOP	Stop solution	15 ml
K7011AVR	ABBUF	Antibody dilution buffer	3 x 3,5 ml (lyophilized)

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Cold 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)
- SPE-cartridges, C18
- Solid phase extraction unit
- Sample evaporation unit (e.g. vacuum centrifuge)

## 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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).
- Transfer the **total content of the AB (Gliadorphin antibody) vial** in an appropriate vessel (> 2.5 ml). Pipette 2.1 ml of the **reconstituted antibody dilution buffer** into the same vessel and rinse the empty AB vial with app. **0.5 ml of the 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.
- The content of one vial of **DER** (Derivatization reagent) (**20 mg**) must be dissolved in **300 µl DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. After use, the rest of the reagent should be discarded. DER must be **prepared immediately before use**. The ELISA kit can be separated into three performances by the three DER vials. Please note: **DMSO attacks all plastics but not dispenser tips and laboratory glass**.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at 20-25°C in a water bath.
- Preparation of the **wash solution**, 1% TFA:  
50 ml **WASHSOL** (20% Trifluoroacetic acid) + 950 ml ddH<sub>2</sub>O
- Preparation of the **elution solution**, 60% Acetonitrile:  
125 ml **ELUSOL** (Acetonitrile) + 85 ml ddH<sub>2</sub>O
- **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are ready to use and must be stored 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 Gliadorphin 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) and **CTRL** (controls) must be stored at **-20°C**.

## 7. PRECAUTIONS

- Stop and wash solutions are composed of strong acids. Even diluted, they still must be handled with care. They 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; 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 are purified by solid phase extraction 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*

#### Preparation of the cartridges

Equilibrate cartridges 1 x with 1 ml **elution solution**, then 3 x with 3 ml **wash solution**.

### *Test procedure*

#### Extraction

- |    |  |
|----|--|
| 1. | Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C)   |
| 2. | Mark the positions of <b>STD</b> (standards) / <b>CTRL</b> (controls) / <b>SAMPLE</b> (samples) in duplicate on a protocol sheet |

3.	Take as many solid phase cartridges as needed from kit and equilibrate. (see P. 9., Preparation of the cartridges). <b>Note: Use acetonitrile only in a chemical fume hood!</b>
4.	Add <b>1,5 ml</b> of <b>urine</b> (Sample), <b>CTRL</b> (controls) and <b>STD</b> (Standards) to <b>1,5 ml wash solution</b> and mix
5.	Centrifuge <b>diluted samples</b> at 4°C and 4000 x g for 20 min
6.	Load the <b>supernatant</b> onto the equilibrated cartridges and allow to soak
7.	Wash <b>2 x with 3 ml wash solution</b>
8.	Elute <b>1 x with 3 ml elution solution</b> <b>Elution should be performed for at least 60 seconds to ensure optimal sample recovery.</b>
9.	Dry <b>eluate</b> under nitrogen or in a vacuum centrifuge

### Derivatization

1.	Reconstitute the dried samples in <b>250 µl DERBUF</b> (reaction buffer). <b>1 x 100 µl</b> per sample are used for the test
2.	Pipette 200 µl of the reconstituted sample together with 10 µl DER (Derivatization reagent) into a reaction vessel (1,5 ml), mix and incubate <b>immediately for 30 min on a horizontal mixer at room temperature (18-26°C)</b>
3.	Add <b>40 µl ASYBUF</b> (dilution buffer) to each well; incubate for <b>30 min at room temperature (18-26°C)</b> on a horizontal mixer

### ELISA

1.	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
----	---

2.	Wash <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl</b> of diluted <b>BM Wash buffer</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
3.	For the analysis in duplicate, pipette <b>2 x 50 µl</b> of <b>STD</b> (standards) / <b>CTRL</b> (controls) / <b>SAMPLE</b> (samples) into respective well of the microtiter plate
4.	Add <b>50 µl</b> diluted <b>AB</b> (Gliadorphin antibody) into each well
5.	Cover plate tightly and incubate for <b>15-20 hours at 2-8°C</b>
6.	Aspirate the contents of each well. Wash <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl</b> of diluted <b>BM Wash buffer</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
7.	Add <b>100 µl</b> of diluted <b>2. AB</b> (POD antibody) into each well
8.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (18-26°C) on a horizontal mixer
9.	Aspirate the contents of each well. Wash <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl</b> of diluted <b>BM Wash buffer</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
10.	Add <b>100 µl</b> of <b>SUB</b> (TMB substrate) into each well
11.	Incubate for <b>12-25 min at room temperature</b> in the dark*
12.	Add <b>50 µl</b> of <b>STOP</b> (stop solution) into each well, mix thoroughly
13.	Determine absorption <b>immediately</b> with an ELISA reader <b>at 450 nm</b> 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

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

Based on internal studies of evidently healthy persons (n=23) a mean value of 0.84 ng/ $\mu$ mol creatinine was estimated.

Urine (n = 23): 0.84 ng/ $\mu$ mol creatinine (SD: 0.52 ng/ $\mu$ mol 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.

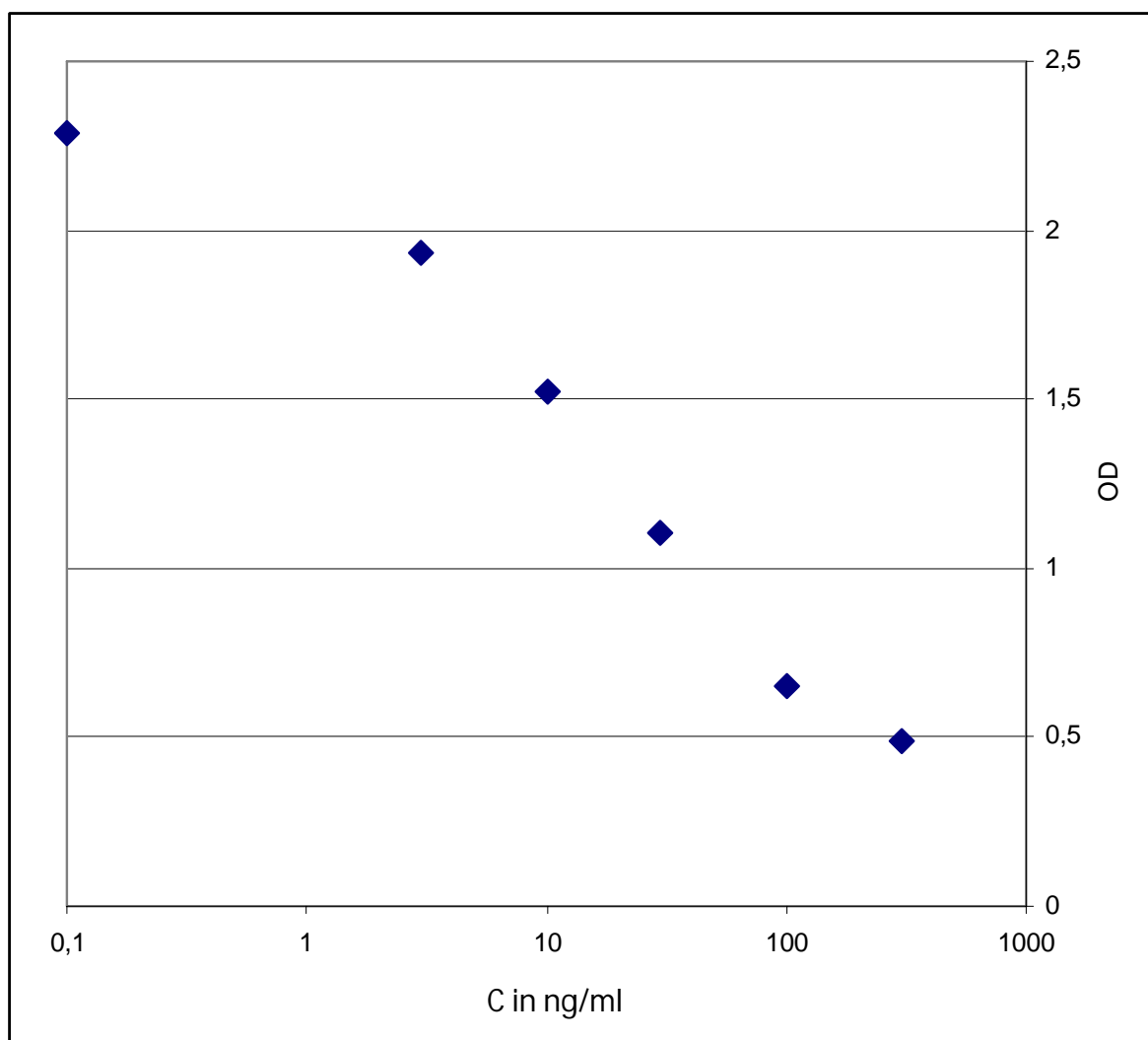
### Controls

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*

**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 123%. The number of the measurement was 6.

Dilution	Measured [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Recovery [%]
1:2	24	16	133
1:5	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.

16.04.2009

### Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number