

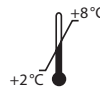
IDK[®] Casomorphin/Gliadorphin- Peptide LC-MS/MS

*Zur Bestimmung in stabilisiertem Urin
For the determination in stabilised urine*

Gültig ab / Valid from 2016-12-01



KM8000



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Vorbereitung der Kartuschen</i>	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
8. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN: UPLC-METHODE	6
9. MS/MS-METHODE	6
<i>MRM-Übergänge (m/z)</i>	7
<i>Auswertung</i>	8
10. MUSTERCHROMATOGRAMME	9
11. QUALITÄTSKONTROLLE	12
<i>Referenzbereiche</i>	12
12. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	12
<i>Sensitivität</i>	14
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
14. TECHNISCHE MERKMALE	14
15. ENTSORGUNG	15
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene ImmuTube® LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von Casomorphin/Gliadorphin-Peptiden in stabilisiertem Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Exorphine sind bioaktive Peptide, die mit Opiatrezeptoren im Gehirn interagieren. Sie entstehen z. B. durch unvollständige Hydrolyse des Milchproteins Casein und des Weizenproteins Gluten bzw. Gliadin. Die Exorphine β -Casomorphin-7 (aus Casein) und Gliadorphin-7 (aus Gluten) wurden ausgiebig in klinischen Studien untersucht. Sie werden seitdem mit Magen-Darm- bzw. neurologischen Krankheiten sowie neurologisch bedingten Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht.

Diese kurzkettigen Peptide werden für gewöhnlich durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase IV (DPPIV) abgebaut. Oft besitzen Patienten mit Schizophrenie, Autismus oder anderen neurologischen Krankheiten, wie z. B. ADHS, nicht voll funktionsfähige DPPIV. Dies kann durch einen genetischen Defekt oder durch eine Inhibition, beispielsweise durch Quecksilber, Hefepilze oder Diabetes-Typ-2-Medikation, verursacht werden.

Wenn DPPIV nicht die vollständige Funktionalität besitzt, bleiben nach der unvollständigen Katalyse Peptide zurück, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, nachdem sie vom Darm in den Blutkreislauf aufgenommen wurden. Im Gehirn selbst sind sie fähig, an Opiatrezeptoren zu binden, und vermitteln dadurch eine opiatähnliche Wirkung wie Heroin oder Morphin. Dies kann bei betroffenen Personen zu Verhaltensänderungen, Konzentrationsschwierigkeiten, Schlaflosigkeit und sogar Aggressionen bzw. Selbstverletzungen führen.

Weizen- und Milchallergien sind mit Casomorphin/Gliadorphin-Problematiken assoziiert. Aber auch, wenn keine derartigen Allergien vorliegen, reagieren manche Personen negativ auf die Anwesenheit dieser Peptide. Aus diesem Grund wird den Betroffenen empfohlen, sich glutenfrei bzw. caseinfrei zu ernähren. Es wurde in vielen Fällen, vor allem bei Kindern mit Autismus und ADHS, beobachtet, dass sich die Symptome verbessern.

Das vorliegende Testverfahren zum Nachweis von Casomorphin/Gliadorphin-Peptiden ist anderen Methoden vorzuziehen, da keine Nahrungsabstinenz z. B. von sojahlaltigen Lebensmitteln vor der Probennahme eingehalten werden muss.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM8000LMA KM8000LMB	MOPHA A MOPHA B	Laufmittel	1000 ml 1000 ml
KM8000KA	CAL 1 CAL 2	Kalibratoren 1 und 2 (2,2 ml lyophilisiert, Konzentration siehe Produktspezifikation)	je 5 Fläschchen
KM8000KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen 1 und 2, (2,2 ml lyophilisiert, Konzentration siehe Produktspezifikation)	je 5 Fläschchen
KM8000IS	INT STD	Interner Standard	1,5 ml
KM8000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM8000WL	WASHSOL	Waschlösung	450 ml
KM8000SO	SOL A	Lösung A	22 ml
KM8000EL	ELUSOL	Elutionslösung	55 ml
KM8000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	4 x 15 ml

Zur Vorbereitung der *IDK*® Casomorphin/Gliadorphin-Peptide LC-MS/MS-Applikation ist das Tuning notwendig. Die Tuninglösung (KM8000TU [5 ml], KM8000TS [2 ml]), die UPLC Trennsäule (KM8000RP), die SPE-Kartuschen (KM8000CK) sowie alle anderen Einzelkomponenten können separat bei der Firma Immundiagnostik AG bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- SPE-Kartuschen 30 mg/1ml (Strata-X 33u von Phenomenex; KM8000CK)
- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Absaugeinheit für Festphasenkartuschen
- Vorrichtung zum Abdampfen der Probe (z. B. Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler)
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C18-Säule, z. B. Aeris PEPTIDE 3,6u XB (15,0 × 2,1 mm) von Phenomenex (KM8000RP)
- Methanol p. a.
- Reinstwasser*

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die Kalibratoren (**CAL 1** und **CAL 2**) und die Kontrollen (**CTRL 1** und **CTRL 2**) werden bis zum Gebrauch bei **-20 °C** gelagert. Vor Gebrauch werden die benötigten lyophilisierten Kalibratoren und Kontrollen in je 2,2 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) resuspendiert. Der Gehalt an den Casomorphin/Gliadorphin-Peptiden ändert sich geringfügig von Charge zu Charge. Der genaue Gehalt ist der Produktspezifikation zu entnehmen. **Rekonstituierte Kalibratoren und Kontrollen sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Die Laufmittel (**MOPHA A** und **MOPHA B**) und Lösung A (**SOL A**) müssen vor Gebrauch mit **0,1 %** Aktivierungsreagenz (**ACTSOL**) versetzt werden, z. B.

500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

11 ml SOL A + 11 µl ACTSOL

Die hergestellten Lösungen sind dann noch **4 Wochen** verwendbar, es wird daher empfohlen, nur so viel anzusetzen wie für den Testansatz benötigt wird.

Achtung: Das **Aktivierungsreagenz** muss unter dem **Abzug** zugesetzt werden. Alle zu verwendeten Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas sein.

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

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Da die Casomorphin/Gliadorphin-Peptide einen schnellen Konzentrationsabfall in unstabilisiertem Urin zeigen, eignet sich nur **stabilisierter Urin** als Probenmaterial. Hierfür bietet Immundiagnostik AG spezielle Urinstabilisierungsröhrchen (Bestellnummer DZ9030UT) an. Derartig stabilisierte Proben sind für 48 h bei Raumtemperatur stabil. Für längere Lagerung muss die Probe bei unter -17°C eingefroren werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur ($18\text{--}24^{\circ}\text{C}$) aufweisen.

Reagenzien und Proben vor Gebrauch gut mischen.

Vorbereitung der Kartuschen

Konditionieren der Kartuschen mit 1 ml Methanol und anschließendes Äquilibrieren mit 1 ml Reinstwasser.

Arbeitsschema

1.	Zu je 1 ml SAMPLE, CAL 1, CAL 2, CTRL 1, CTRL 2 (stabilisierte Urinprobe, Kalibratoren und Kontrollen) je 10 μl INT STD (internen Standard) geben, mischen, auf die Kartuschen geben und absaugen.
2.	4 x 1 ml Waschlösung (WASHSOL) durchsaugen
3.	Mit 500 μl Elutionslösung (ELUSOL) in Borosilikatröhrchen eluieren.
4.	Das Eluat in z.B. einer Vakuumzentrifuge abdampfen .
5.	Die eingedampfte Probe mit 200 μl aktivierter SOL A rekonstituieren.
6.	15 μl werden in das LC-MS/MS System injiziert

8. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN: UPLC-METHODE

Säulenmaterial: z. B. Aeris PEPTIDE 3,6 u XB von Phenomenex

Säulendimension: 2,1 × 150 mm

Fluss: 0,2 ml/min

Säulentemperatur: 30 °C

Auftragsvolumen: 15 µl

Laufzeit: 15 min

Gradient:

Zeit (min)	% A	% B
0	95	5
2	95	5
10	50	50
10,1	5	95
12	5	95
12,1	95	5
15	95	5

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule/Vorfilter um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern. Die Vorsäulenkartusche (KM8000VS) und Vorsäulenhalter (KM8000VH) können separat bei Immundiagnostik bestellt werden.

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 20 ml 50% Methanol gespült werden. Die Säule kann in 50% Methanol gelagert werden.

9. MS/MS-METHODE

(Beispielhaft aufgeführt für ein Waters TQ MS Tandem-Massenspektrometer)

Modus:	MRM
Polarität:	ESI ⁺
Kapillarspannung (kV):	3
Konusspannung (V):	var.
Quellentemperatur (°C):	150
Desolvation Temperatur (°C):	600
Gasfluss am Konus (l/h):	100
Desolvation Gas Fluss (l/h):	800
Kollision Gas Fluss (ml/min):	0,15

Wir empfehlen, die Einstellungen der scantime so zu wählen, dass sie 8–15 Datenpunkte pro Peak erhalten.

MRM-Übergänge (m/z)

β-Casomorphin 7 (Molekulargewicht: 789.95 g/mol)

790.43 > 70.05	Konusspannung: 52	Kollisionsenergie: 70
790.43 > 136.1	Konusspannung: 52	Kollisionsenergie: 70

INT STD (β-Casomorphin 7 heavy labelled, Molekulargewicht: 795.95 g/mol)

796.63 > 70.36	Konusspannung: 45	Kollisionsenergie: 60
796.63 > 74.95	Konusspannung: 45	Kollisionsenergie: 60

Casomorphin 1–3 (Molekulargewicht: 425.50 g/mol)

426.27 > 70.09	Konusspannung: 29	Kollisionsenergie: 29
426.27 > 136.14	Konusspannung: 29	Kollisionsenergie: 31
426.27 > 263.22	Konusspannung: 29	Kollisionsenergie: 19

Casomorphin 1–4 (Molekulargewicht: 522.62 g/mol)

523.13 > 70.08	Konusspannung: 35	Kollisionsenergie: 40
523.13 > 116.07	Konusspannung: 35	Kollisionsenergie: 40
523.13 > 136.10	Konusspannung: 35	Kollisionsenergie: 40

Casomorphin 1–4amid (Molekulargewicht: 521.63 g/mol)

522.27 > 70.05	Konusspannung: 32	Kollisionsenergie: 39
522.27 > 136.06	Konusspannung: 32	Kollisionsenergie: 39

Exorphin A5 (Molekulargewicht: 599.65 g/mol)

600.41 > 70.09	Konusspannung: 23	Kollisionsenergie: 43
600.41 > 136.13	Konusspannung: 23	Kollisionsenergie: 29
600.41 > 217.17	Konusspannung: 23	Kollisionsenergie: 17

Exorphin B5 (Molekulargewicht: 594.67 g/mol)

595.35 > 132.04	Konusspannung: 31	Kollisionsenergie: 55
595.35 > 136.14	Konusspannung: 31	Kollisionsenergie: 50

Exorphin C (Molekulargewicht: 591.72 g/mol)

592.32 > 70.05	Konusspannung: 40	Kollisionsenergie: 45
592.32 > 261.12	Konusspannung: 40	Kollisionsenergie: 40

Gliadorphin (Molekulargewicht: 876.00 g/mol)

876.52 > 70.05	Konusspannung: 55	Kollisionsenergie: 61
876.52 > 115.17	Konusspannung: 55	Kollisionsenergie: 65
876.52 > 136.10	Konusspannung: 55	Kollisionsenergie: 60

Auswertung

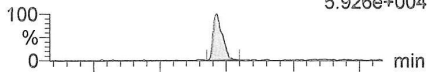
Als Modell zur Auswertung kann die lineare Regression verwendet werden (unter Berücksichtigung des internen Standards). Zwischen den beiden Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

10. MUSTERCHROMATOGRAMME

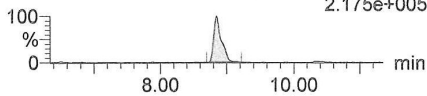
β -Casomorphin 7 (Molekulargewicht: 789.95 g/mol)

Sample Name: **Casoglia150616_001**

F7:MRM of 2 channels,ES+
790.43 > 136.1
5.926e+004



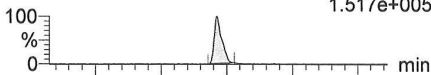
F7:MRM of 2 channels,ES+
790.43 > 70.05
2.175e+005



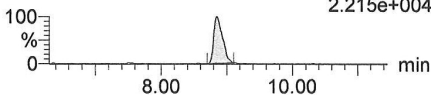
INT STD (β -Casomorphin 7 heavy labelled, Molekulargewicht: 795.95 g/mol)

Sample Name: **Casoglia150616_001**

F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 74.95
1.517e+005



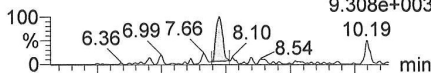
F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 70.36
2.215e+004



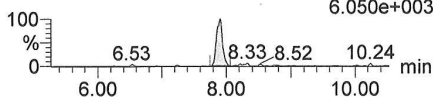
Casomorphin 1-3 (Molekulargewicht: 425.50 g/mol)

Sample Name: **Casoglia150616_001**

F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 136.1
9.308e+003

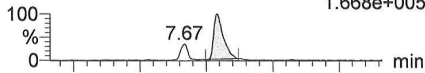


F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 70.32
6.050e+003

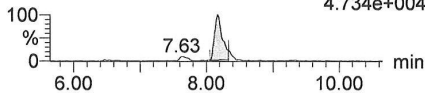


Casomorphin 1-4 (Molekulargewicht: 522.62 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

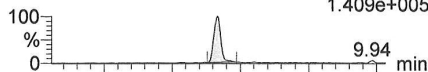
F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 70.08
1.668e+005



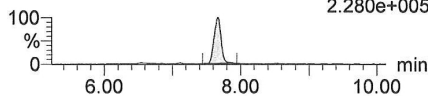
F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 116.07
4.734e+004

**Casomorphin 1-4amid** (Molekulargewicht: 521.63 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

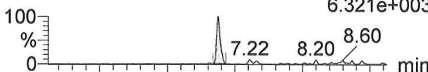
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 136.07
1.409e+005



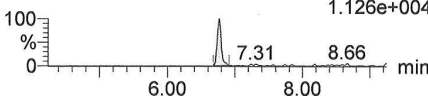
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 70.05
2.280e+005

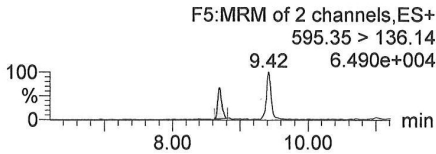
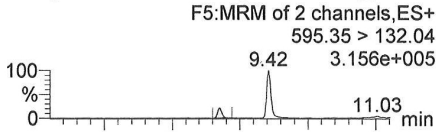
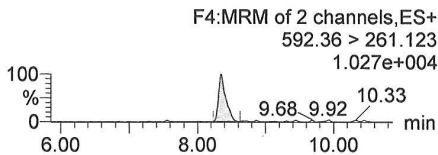
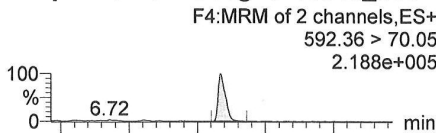
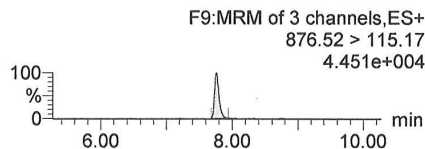
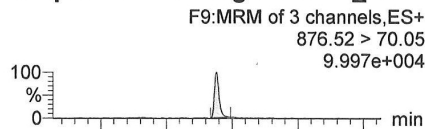
**Exorphin A5** (Molekulargewicht: 599.65 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

F6:MRM of 2 channels,ES+
600.06 > 70.05
6.321e+003



F6:MRM of 2 channels,ES+
600.06 > 136.07
1.126e+004



Exorphin B5 (Molekulargewicht: 594.67 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001****Exorphin C** (Molekulargewicht: 591.72 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001****Gliadorphin** (Molekulargewicht: 876.00 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereiche

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 18) wurden folgende Werte ermittelt:

Analyt	ng/ μ mol Kreatinin
Casomorphin 1–3	< 2,344
Exorphin A5	< 3,516
β -Casomorphin 7	< 0,252
Gliadorphin	< 0,312
Casomorphin 1–4	< 0,313
Casomorphin 1–4amid	< 0,309
Exorphin C	< 0,127
Exorphin B5	< 1,019

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Inter-Assay (n = 10)

Analyt	Probe	ng/ml	VK [%]
Casomorphin 1-3	1	1,05	10,79
	2	4,55	2,41
Exorphin A5	1	3,75	24,35
	2	11,37	9,27
β -Casomorphin 7	1	1,56	12,32
	2	6,93	4,66

Analyt	Probe	ng/ml	VK [%]
Gliadorphin	1	1,96	7,38
	2	7,80	7,14
Casomorphin 1-4 amid	1	1,44	11,40
	2	5,57	6,07
Casomorphin 1-4	1	2,09	5,13
	2	8,71	5,54
Exorphin C	1	2,84	5,16
	2	11,76	8,53
Exorphin B5	1	2,88	5,37
	2	10,91	4,31

Intra-Assay (n = 4)

Analyt	Probe	ng/ml	VK [%]
Casomorphin 1-3	1	3,44	12,92
	2	1,14	3,63
Exorphin A5	1	6,29	26,98
	2	3,05	39,92
β -Casomorphin 7	1	3,19	8,42
	2	1,52	11,88
Gliadorphin	1	3,17	8,03
	2	2,14	7,59
Casomorphin 1-4 amid	1	2,33	17,08
	2	1,34	15,58
Casomorphin 1-4	1	2,83	7,79
	2	2,06	7,77
Exorphin C	1	3,91	4,11
	2	3,05	4,69
Exorphin B5	1	5,24	13,38
	2	2,72	8,84

Sensitivität

Nachweisgrenze

Analyt	pg/ml Urin
Casomorphin 1-3	1132
Exorphin A5	1872
β -Casomorphin 7	420
Gliadorphin	520
Casomorphin 1-4 amid	624
Casomorphin 1-4	307
Exorphin C	473
Exorphin B5	976

Es muss beachtet werden, dass die Bestimmung der Nachweisgrenze nicht ausschließlich applikations-, sondern auch geräteabhängig ist.

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.










15. ENTSORGUNG

Laufmittel B, Elutionslösung, Lösung A und Aktivierungsreagenz müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrollen sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*[®] ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:

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

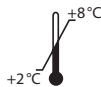
IDK[®] Casomorphin/Gliadorphin peptides LC-MS/MS

For the determination in stabilised urine

Valid from 2016-12-01



KM8000



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	21
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Preparation of the cartridges</i>	22
<i>Test procedure</i>	22
8. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS: UPLC METHOD	22
9. MS/MS METHOD	23
<i>MRM transitions (m/z)</i>	23
<i>Calculation</i>	24
10. CHROMATOGRAM EXAMPLES	25
11. QUALITY CONTROL	28
<i>Reference range</i>	28
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>Precision and reproducibility</i>	28
<i>Sensitivity</i>	30
13. PRECAUTIONS	30
14. TECHNICAL HINTS	30
15. DISPOSAL	30
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31

1. INTENDED USE

The described ImmuTube® LC-MS/MS application is intended for the quantitative determination of casomorphin/gliadorphin peptides in stabilised urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Exorphins are bioactive peptides which can react with opiate receptors. These peptides are derived from e.g. the incomplete hydrolysis of the milk protein casein and the wheat protein gluten and gliadin. Casomorphin (BCM7 from casein) and gliadorphin-7 (from gluten) have been widely studied and are linked to gastrointestinal, neurological, and neuro-developmental disorders.

These short peptides are usually broken down by the enzyme dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV). In people with autism, schizophrenia and other neurological disorders, either a genetic deficiency or inhibition of this enzyme, e.g. by drugs treating diabetes type 2, mercury or yeast, can occur.

Both ways, this proteolytic enzyme can't act properly and leaves incompletely digested peptides behind which are able to pass the blood-brain barrier after the uptake from the intestinal lining into the bloodstream. In the brain, these bioactive peptides can bind to opiate receptors and mimic the effects of opiate drugs like heroine and morphine. This can result in change of behavior, lack of focus and attention, sleepiness and even aggression and self-abuse.

Wheat and milk allergies are associated casomorphin/gliadorphin problems. Even if no milk or wheat allergies occur some people can still react negatively to these peptides.

Children with autism and ADHS can benefit from an elimination diet – gluten-free, casein-free (GfCf) diet. Physical and mental health can be improved.

This test for casomorphin/gliadorphin peptides is superior to any other tests because no nutritional regimen, e.g. abandonment of soy products, prior to sample collection is required.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM8000LMA KM8000LMB	MOPHA A MOPHA B	Mobile Phase	1000 ml 1000 ml
KM8000KA	CAL 1 CAL 2	Calibrator 1 and 2, (2.2 ml lyophilised, for concentration see product specification)	5 vials each
KM8000KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (2.2 ml lyophilised, for concentration see product specification)	5 vials each
KM8000IS	INT STD	Internal Standard	1.5 ml
KM8000AC	ACTSOL	Activation reagent	2.5 ml
KM8000WL	WASHSOL	Wash solution	450 ml
KM8000SO	SOL A	Solution A	22 ml
KM8000EL	ELUSOL	Elution solution	55 ml
KM8000RE	RECSOL	Reconstitution solution	4 x 15 ml

For the preparation of the casomorphin/gliadorphin peptides LC-MS/MS application, tuning is necessary to find the ideal LC-MS/MS settings. The tuning solution (KM8000TU [5 ml], KM8000TS [2 ml]), the UPLC column (KM8000RP), the SPE cartridges (KM8000CK) and all other individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- SPE cartridges 30 mg/1ml (Strata-X 33u from Phenomenex; KM8000CK)
- Standard laboratory glass vials, suitable for LC-MS/MS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Solid phase extraction unit
- Evaporation unit (e.g. vacuum centrifuge or nitrogen distributor)
- Vortex
- LC-MS/MS equipment
- RP-C18 column, e.g. Aeris PEPTIDE 3,6u XB (15,0 × 2,1 mm) from Phenomenex (KM8000RP)
- Methanol p.a.
- Ultra pure water*

* 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 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Lyophilised calibrators (**CAL 1** and **CAL 2**) and lyophilised controls (**CTRL 1** and **CTRL 2**) are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the lyophilised calibrators and controls needed have to be reconstituted with 2.2 ml reconstitution solution (RECSOL). The concentration of casomorphin/gliadorphin-peptides slightly changes from lot to lot. The exact concentration is stated on the specification data sheet. **Reconstituted calibrators and controls are not stable and cannot be stored.**
- The **mobile phases** (MOPHA A, MOPHA B) and **solution A (SOL A)** have to be spiked with **0.1 % activation reagent (ACTSOL)** before use, e. g.

500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

11 ml SOL A + 11 µl ACTSOL

Mobile phases and solution A spiked with activation reagent can be used for **4 weeks**. Prepare only the appropriate amount necessary for each run.

Attention: The **activation reagent** must be added under the **fume hood**. All vials to be used must be absolutely clean, detergent-free and preferably made of glass suitable for LC-MS/MS.

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

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

In unstabilised urine, the concentration of casomorphin/gliadorphin peptides declines quickly, therefore only **stabilised urine** is suited as sample. Immundiagnostik offers urine sample stabilising tubes (order no DZ9030UT) specifically designed for this purpose. Samples stabilised using those tubes are stable for 48 h at room temperature. For longer storage, the sample must be frozen at < -17 °C.

7. ASSAY PROCEDURE

Control samples should be analysed with each run.

Bring all reagents and samples to room temperature (18–24 °C) and mix well.

Preparation of the cartridges

Conditioning of the cartridges with 1 ml methanol, followed by equilibration with 1 ml ultra pure water.

Test procedure

1.	Add to 1 ml SAMPLE, CAL 1, CAL 2, CTRL 1, CTRL 2 (stabilised urine sample, calibrators and controls) each 10 µl INT STD (internal standard), mix, pipette onto the cartridges and evacuate.
2.	Suck 4 x 1 ml wash solution (WASHSOL) through the column.
3.	Eluate with 500 µl elution solution (ELUSOL) into glass tubes.
4.	Dry the eluate , e. g. in a vacuum centrifuge.
5.	Reconstitute the dried sample with 200 µl activated SOL A .
6.	Inject 15 µl into the LC-MS/MS system.

8. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS: UPLC METHOD

Column material: e. g. Aeris PEPTIDE 3,6 u XB from Phenomenex

Column dimension: 2.1 × 150 mm

Flow rate: 0.2 ml/min

Column temperature: 30°C

Injection volume: 15 µl

Running time: 15 min

Gradient:

Time (min)	% A	% B
0	95	5
2	95	5
10	50	50
10,1	5	95
12	5	95
12,1	95	5
15	95	5

It is recommended to use a guard column/filter to extend the column's life. The guard column cartridge (KM8000VS) and guard column holder (KM8000VH) can be ordered separately from Immundiagnostik.

After the analysis, the separation column should be washed with ~ 20 ml 50% methanol. The column can be stored in 50% methanol.

9. MS/MS METHOD

(Exemplified for a Waters TQ MS tandem mass spectrometer)

Mode:	MRM
Polarity:	ESI ⁺
Capillary voltage (kV):	3
Cone voltage (V):	var.
Source temperature (°C):	150
Desolvation temperature (°C):	600
Gas flow at cone (l/h):	100
Desolvation gas flow (l/h):	800
Collision gas flow (ml/min):	0.15

We recommend to set the preferences for the scantime to result in 8–15 data points per peak.

MRM transitions (m/z)

β-Casomorphin 7 (molecular weight: 789.95 g/mol)

790.43 > 70.05	cone voltage: 52	collision energy: 70
790.43 > 136.1	cone voltage: 52	collision energy: 70

INT STD (β-Casomorphin 7 heavy labelled, molecular weight: 795.95 g/mol)

796.63 > 70.36	cone voltage: 45	collision energy: 60
796.63 > 74.95	cone voltage: 45	collision energy: 60

Casomorphin 1–3 (molecular weight: 425.50 g/mol)

426.27 > 70.09	cone voltage: 29	collision energy: 29
426.27 > 136.14	cone voltage: 29	collision energy: 31
426.27 > 263.22	cone voltage: 29	collision energy: 19

Casomorphin 1–4 (molecular weight: 522.62 g/mol)

523.13 > 70.08	cone voltage: 35	collision energy: 40
523.13 > 116.07	cone voltage: 35	collision energy: 40
523.13 > 136.10	cone voltage: 35	collision energy: 40

Casomorphin 1–4amid (molecular weight: 521.63 g/mol)

522.27 > 70.05	cone voltage: 32	collision energy: 39
522.27 > 136.06	cone voltage: 32	collision energy: 39

Exorphin A5 (molecular weight: 599.65 g/mol)

600.41 > 70.09	cone voltage: 23	collision energy: 43
600.41 > 136.13	cone voltage: 23	collision energy: 29
600.41 > 217.17	cone voltage: 23	collision energy: 17

Exorphin B5 (molecular weight: 594.67 g/mol)

595.35 > 132.04	cone voltage: 31	collision energy: 55
595.35 > 136.14	cone voltage: 31	collision energy: 50

Exorphin C (molecular weight: 591.72 g/mol)

592.32 > 70.05	cone voltage: 40	collision energy: 45
592.32 > 261.12	cone voltage: 40	collision energy: 40

Gliadorphin (molecular weight: 876.00 g/mol)

876.52 > 70.05	cone voltage: 55	collision energy: 61
876.52 > 115.17	cone voltage: 55	collision energy: 65
876.52 > 136.10	cone voltage: 55	collision energy: 60

Calculation

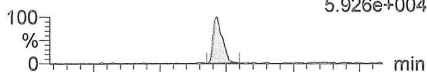
Linear regression can be used as model for evaluation of the results (in consideration of the internal standard). The two calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using this obtained line.

10. CHROMATOGRAM EXAMPLES

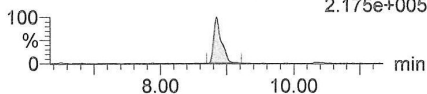
β -Casomorphin 7 (molecular weight: 789.95 g/mol)

Sample Name: Casoglia150616_001

F7:MRM of 2 channels,ES+
790.43 > 136.1
5.926e+004



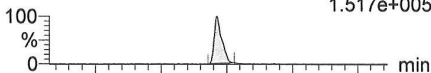
F7:MRM of 2 channels,ES+
790.43 > 70.05
2.175e+005



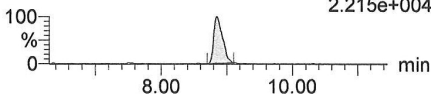
INT STD (β -Casomorphin 7 heavy labelled, molecular weight: 795.95 g/mol)

Sample Name: Casoglia150616_001

F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 74.95
1.517e+005



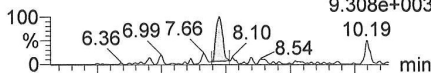
F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 70.36
2.215e+004



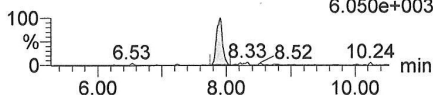
Casomorphin 1-3 (molecular weight: 425.50 g/mol)

Sample Name: Casoglia150616_001

F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 136.1
9.308e+003

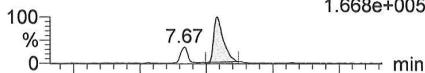


F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 70.32
6.050e+003

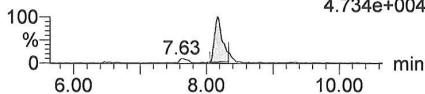


Casomorphin 1-4 (molecular weight: 522.62 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

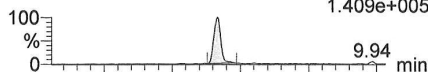
F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 70.08
1.668e+005



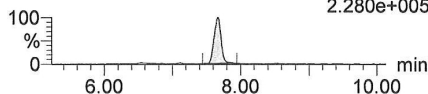
F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 116.07
4.734e+004

**Casomorphin 1-4amid** (molecular weight: 521.63 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

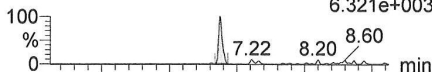
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 136.07
1.409e+005



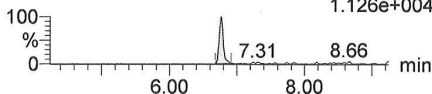
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 70.05
2.280e+005

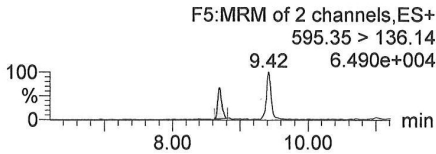
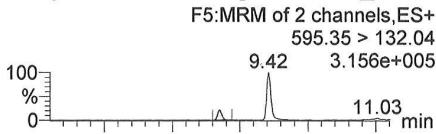
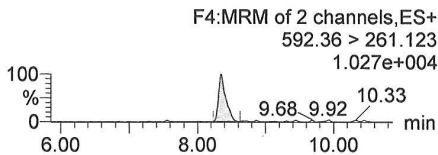
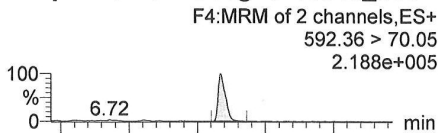
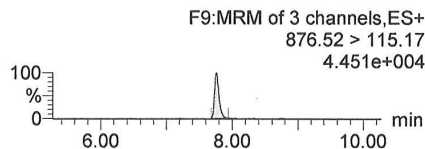
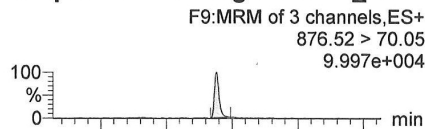
**Exorphin A5** (molecular weight: 599.65 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

F6:MRM of 2 channels,ES+
600.06 > 70.05
6.321e+003



F6:MRM of 2 channels,ES+
600.06 > 136.07
1.126e+004



Exorphin B5 (molecular weight: 594.67 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001****Exorphin C** (molecular weight: 591.72 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001****Gliadorphin** (molecular weight: 876.00 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

11. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

Based on Immundiagnostik studies of samples of apparently healthy persons (n = 18), the following mean values were estimated

Analyte	ng/ μ mol Creatinine
Casomorphin 1-3	1.406
Exorphin A5	2.033
β -Casomorphin 7	0.138
Gliadorphin	0.187
Casomorphin 1-4 amid	0.234
Casomorphin 1-4	0.188
Exorphin C	0.076
Exorphin B5	0.611

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Inter-Assay (n = 10)

Analyte	Sample	ng/ml	CV [%]
Casomorphin 1-3	1	1.05	10.79
	2	4.55	2.41
Exorphin A	1	3.75	24.35
	2	11.37	9.27

Analyte	Sample	ng/ml	CV [%]
β-Casomorphin 7	1	1.56	12.32
	2	6.93	4.66
Gliadorphin	1	1.96	7.38
	2	7.80	7.14
Casomorphin 1-4 amid	1	1.44	11.40
	2	5.57	6.07
Casomorphin 1-4	1	2.09	5.13
	2	8.71	5.54
Exorphin C	1	2.84	5.16
	2	11.76	8.53
Exorphin B	1	2.88	5.37
	2	10.91	4.31

Intra-Assay (n = 4)

Analyte	Sample	ng/ml	CV [%]
Casomorphin 1-3	1	3.44	12.92
	2	1.14	3.63
Exorphin A	1	6.29	26.98
	2	3.05	39.92
β-Casomorphin 7	1	3.19	8.42
	2	1.52	11.88
Gliadorphin	1	3.17	8.03
	2	2.14	7.59
Casomorphin 1-4 amid	1	2.33	17.08
	2	1.34	15.58
Casomorphin 1-4	1	2.83	7.79
	2	2.06	7.77
Exorphin C	1	3.91	4.11
	2	3.05	4.69
Exorphin B	1	5.24	13.38
	2	2.72	8.84

Sensitivity

Detection limit

Analyte	pg/ml Urine
Casomorphin 1-3	1132
Exorphin A	1872
β -Casomorphin 7	420
Gliadorphin	520
Casomorphin 1-4 amid	624
Casomorphin 1-4	307
Exorphin C	473
Exorphin B	976

It should be noted that the determination of the detection limit depends not only on the application method but also on the instrument.

13. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analysed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.










15. DISPOSAL

Mobile phase B, elution solution, solution A and activation reagent have to be disposed as non-halogenated solvents.

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*[®] is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		