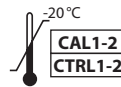
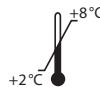


IDK[®] Casomorphin/Gliadorphin- Peptide LC-MS/MS

Zur Bestimmung in stabilisiertem Urin
For the determination in stabilised urine

Gültig ab / Valid from 2021-10-04

REF **KM8000**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
<i>Lagerung</i>	4
<i>Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien</i>	4
<i>Vorbereitung der Kalibratoren, Kontrollen und des internen Standards</i>	5
6. LAGERUNG DER PROBEN	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Vorbereitung der Kartuschen</i>	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
8. LC-MS/MS-METHODE	6
9. AUSWERTUNG	6
10. MUSTERCHROMATOGRAMME	6
11. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzbereiche</i>	10
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision - Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit</i>	10
<i>Sensitivität</i>	12
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
14. ENTSORGUNG	12
15. TECHNISCHE MERKMALE	13
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der *IDK*[®] Casomorphin/Gliadorphin-Peptide LC-MS/MS Kit ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von Casomorphin- und Gliadorphin-Peptiden in stabilisiertem Urin mittels LC-MS/MS nach vorheriger Festphasenextraktion. Der Kit ist für den manuellen Gebrauch durch professionelles Laborpersonal bestimmt.

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 opiat-ähnliche 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 sojehaltigen Lebensmitteln vor der Probennahme eingehalten werden muss.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
2xKM0001	2xACTSOL	2x Aktivierungslösung	2 x 1,5 ml
4xKM0002	4xRECSOL	4x Rekonstitutionslösung	4 x 15 ml
6xKM0003	6xWASHSOL	6x Waschlösung	6 x 80 ml
KM8000	CAL1–2	Kalibratoren 1 und 2, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	je 5 Fläschchen (á 2,2 ml) pro Level
	CTRL1–2	Kontrollen 1 und 2, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	je 5 Fläschchen (á 2,2 ml) pro Level
	ELUSOL	Elutionslösung	2x27 ml
	INTSTD	Interner Standard	1,5 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	1 000 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 000 ml
	SOLA	Lösung A	22 ml

Bitte verwenden Sie für Nachbestellungen von Einzelkomponenten als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung ohne Leerzeichen.

Folgendes Zubehör kann für die *IDK*[®] Casomorphin/Gliadorphin-Peptide-LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für die Analyten (KM800TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM8000TS)
- UPLC-Säule (KM8000SP)
- Vorfilter (KM8000IF)
- Vorfilter-Halter (KM8000IH)
- SPE-Kartuschen (KM8000CK)

Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Absaugeinheit für Festphasenkartuschen
- Vorrichtung zum Abdampfen der Probe (z.B. Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler)
- Vortex-Mixer

- LC-MS/MS-Anlage
- Borosilikatröhrchen
- 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 > 0,2µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055µS/cm bei 25°C (≥ 18,2MΩcm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Lagerung

Die Testreagenzien sollten lichtgeschützt, trocken und bei ihrer angegebenen Lager-temperatur (CAL1–2, CTRL1–2: -20°C; alle anderen Komponenten: 2–8°C) gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Hinweis: Nach Vorbereitung der Reagenzien für die Testdurchführung können andere Stabilitäten gelten (siehe jeweiliger Vorbereitungsschritt).

Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien

Die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) und Lösung A (SOLA) müssen vor Gebrauch mit Aktivierungslösung (ACTSOL) aktiviert werden, siehe folgende Tabelle:

Komponente			ACTSOL [µl]
Bezeichnung	[ml]		
Laufmittel A (MOPHAA)	500	+	500
Laufmittel B (MOPHAB)	500		500
Lösung A (SOLA)	11		11

Die Laufmittel sollten vor Verwendung entgast werden.

Hinweis: Nach Aktivierung mit der Aktivierungslösung (ACTSOL) sind die Komponenten Laufmittel A (MOPHAA), Laufmittel B (MOPHAB) und Lösung A (SOLA) für bis zu 4 Wochen haltbar. Es wird daher empfohlen, nur soviel herzustellen wie für den Testansatz benötigt wird.

Achtung: Die Aktivierungslösung (ACTSOL) muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber, detergenzienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas sein.

Vorbereitung der Kalibratoren, Kontrollen und des internen Standards

Die Kalibratoren (CAL1–2) und die Kontrollen (CTRL1–2) werden in je 2,2 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst.

Hinweis: Nach Rekonstitution mit der Rekonstitutionslösung (RECSOL) sind die Kalibratoren (CAL1–2) und die Kontrollen (CTRL1–2) nicht stabil und können nicht gelagert werden.

6. LAGERUNG DER PROBEN

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.	1 ml rekonstituierter Kalibrator (CAL)/rekonstituierte Kontrolle (CTRL)/ Probe und $10\ \mu\text{l}$ interner Standard (INTSTD) in einem Reagenzgefäß geben und mischen.
2.	Lösung auf die SPE-Kartuschen geben und absaugen.
3.	Waschschritt mit 1 ml Waschlösung (WASHSOL), durchsaugen. Diesen Waschschritt insgesamt viermal durchführen.
4.	Elution mit $500\ \mu\text{l}$ Elutionslösung (ELUSOL) in Borosilikatröhrchen.
5.	Das Eluat in z. B. einer Vakuumzentrifuge abdampfen.

6.	Rekonstitution der eingedampften Probe mit 200 µl aktivierter Lösung A (SOLA).
7.	Injektion in das LC-MS/MS System (siehe <i>Application Note</i>).

8. LC-MS/MS-METHODE

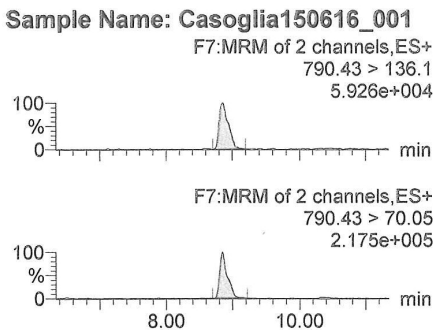
Bitte entnehmen Sie die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode dem *Application Note* oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

9. AUSWERTUNG

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

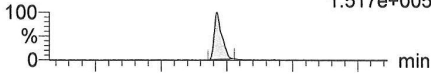
10. MUSTERCHROMATOGRAMME

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

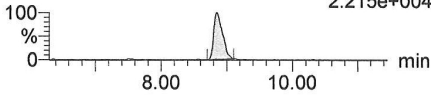


INTSTD (β -Casomorphin 7 heavy labelled, Molekulargewicht: 795.95 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

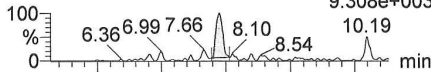
F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 74.95
1.517e+005



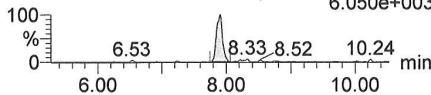
F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 70.36
2.215e+004

**Casomorphin 1-3 (Molekulargewicht: 425.50 g/mol)****Sample Name: Casoglia150616_001**

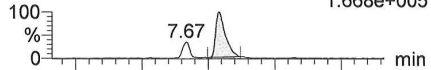
F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 136.1
9.308e+003



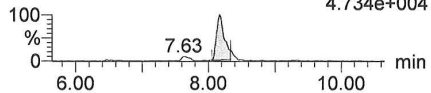
F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 70.32
6.050e+003

**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

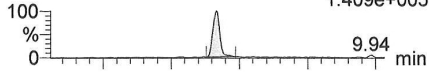


F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 116.07
4.734e+004

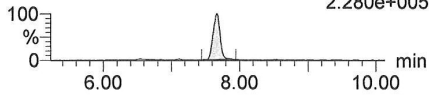


Casomorphin 1–4amid (Molekulargewicht: 521.63 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

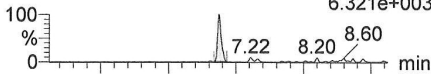
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 136.07
1.409e+005



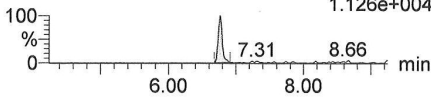
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 70.05
2.280e+005

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

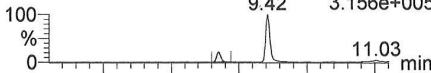
F6:MRM of 2 channels,ES+
600.06 > 70.05
6.321e+003



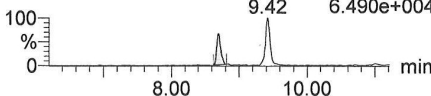
F6:MRM of 2 channels,ES+
600.06 > 136.07
1.126e+004

**Exorphin B5** (Molekulargewicht: 594.67 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

F5:MRM of 2 channels,ES+
595.35 > 132.04
3.156e+005

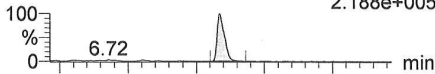


F5:MRM of 2 channels,ES+
595.35 > 136.14
6.490e+004

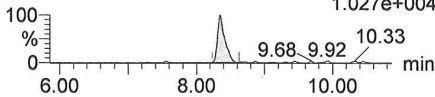


Exorphin C (Molekulargewicht: 591.72 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

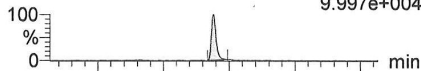
F4:MRM of 2 channels,ES+
592.36 > 70.05
2.188e+005



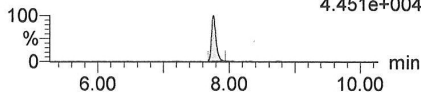
F4:MRM of 2 channels,ES+
592.36 > 261.123
1.027e+004

**Gliadorphin** (Molekulargewicht: 876.00 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

F9:MRM of 3 channels,ES+
876.52 > 70.05
9.997e+004



F9:MRM of 3 channels,ES+
876.52 > 115.17
4.451e+004

**11. QUALITÄTSKONTROLLE**

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision - Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit

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
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

Analyt	Probe	ng/ml	VK [%]
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

Die Nachweisgrenze (LLOD) bezeichnet die niedrigste Konzentration des Analyten, die sich noch nachweisen lässt.

Analyt	Urin [pg/ml]
Casomorphin 1–3	1 132
Exorphin A5	1 872
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 Nachweisgrenze nicht ausschließlich applikations-, sondern auch geräteabhängig ist.

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immun diagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.

14. ENTSORGUNG

Laufmittel B (MOPHAB), Elutionslösung (ELUSOL), Lösung A (SOLA) und Aktivierungslösung (ACTSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Kalibratoren (CAL1–2) und Kontrollen (CTRL1–2) sollten aufgrund ihrer Behandlung als potentiell infektiöses Material gemäß der örtlichen Vorschriften entsorgt werden.











15. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- *IDK*[®] ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:

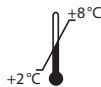
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

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

For the determination in stabilised urine

Valid from 2021-10-04

REF **KM8000**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
<i>Storage</i>	19
<i>Preparation of mobile phases and test reagents</i>	19
<i>Preparation of the calibrators and controls</i>	19
6. STORAGE OF SAMPLES	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Preparation of the cartridges</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. LC-MS/MS METHOD	21
9. CALCULATION	21
10. CHROMATOGRAM EXAMPLES	21
11. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Precision - reproducibility and repeatability</i>	25
<i>Sensitivity</i>	26
13. PRECAUTIONS	27
14. DISPOSAL	27
15. TECHNICAL HINTS	27
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. INTENDED USE

The *IDK*[®] Casomorphin/Gliadorphin peptides LC-MS/MS kit is an *in vitro* diagnostic tool for the quantitative determination of casomorphin/gliadorphin peptides in stabilised urine by LC-MS/MS after solid phase extraction. The kit is intended for manual use by professional laboratory staff.

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

Art. no.	Label	Kit components	Amount
2 x KM0001	2 x ACTSOL	2 x Activation solution	2 x 1.5 ml
4 x KM0002	4 x RECSOL	4 x Reconstitution solution	4 x 15 ml
6 x KM0003	6 x WASHSOL	6 x Wash solution	6 x 80 ml
KM8000	CAL1–2	Calibrators 1 und 2, lyophilised (for concentration see product specification)	5 vials (á 2.2 ml) per level each
	CTRL1–2	Controls 1 und 2, lyophilised (for concentration see product specification)	5 vials (á 2.2 ml) per level each
	ELUSOL	Elution solution	2 x 27 ml
	INTSTD	Internal standard	1.5 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	1 000 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 000 ml
	SOLA	Solution A	22 ml

For reorders of single components, please use the catalogue number followed by the label without space as product number.

The following accessories for the *IDK*[®] Casomorphin/Gliadorphin peptides LC-MS/MS kit can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for the analytes (KM8000TU)
- tuning solution for the internal standard (KM8000TS)
- UPLC column (KM8000SP)
- in-line filter (KM8000IF)
- in-line filter holder (KM8000IH)
- SPE cartridge (KM8000CK)

Please ask for our single component price list.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Standard laboratory glass vials, suitable for LC-MS/MS
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl tips
- Solid phase extraction unit
- Evaporation unit (e.g. vacuum centrifuge or nitrogen distributor)
- Vortex
- LC-MS/MS equipment
- Borosilicate tubes

- 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 MΩcm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

Storage

The test reagents should be stored protected from light, dry and their specified storage temperature (CAL1–2, CTRL1–2: -20 °C; all others 2–8 °C). The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date.

Note: After preparation of the test reagents for the test procedure other stabilities might apply (see respective preparation step).

Preparation of mobile phases and test reagents

Before use, the mobile phases (MOPHAA and MOPHAB) and solution A (SOLA) must be activated by adding activation solution (ACTSOL) according to the following chart:

Component			ACTSOL [µl]
Name	[ml]		
Mobile phase A (MOPHAA)	500	+	500
Mobile phase B (MOPHAB)	500		500
Solution A (SOLA)	25		25

Prior use mobile phases should be degassed.

Note: After activation with activation solution (ACTSOL), the components mobile phase A (MOPHAA), mobile phase B (MOPHAB), sample buffer (SAMPLEBUF), wash solution 2 (WASHSOL2), dilution solution (DILSOL) and elution solution (ELUSOL) can be stored at 2–8 °C up to 2 weeks. It is therefore recommended to prepare only as much as is needed for the test approach.

Attention: The activation solution (ACTSOL) must be added under the fume cupboard. All vessels to be used must be absolutely clean, free of detergents and preferably made of LC-MS/MS suitable glass.

Preparation of the calibrators and controls

The calibrators (CAL1–2) and the controls (CTRL1–2) are dissolved in 2.2 ml reconstitution solution (RECSOL) each while 30 s vortexing.

Note: After reconstitution with the reconstitution solution (RECSOL), the calibrators (CAL1–2) and the controls (CTRL1–2) are not stable and can not be stored.

6. STORAGE 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 48h at room temperature. For longer storage, the sample must be frozen at $< -17^{\circ}\text{C}$.

7. ASSAY PROCEDURE

Control samples should be analysed with each run.

Prior to use in the assay, allow all samples and reagents to come to room temperature ($18\text{--}26^{\circ}\text{C}$).

Mix samples and reagents well before use.

Preparation of the cartridges

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

Test procedure

1.	Mix 1 ml reconstituted CAL/reconstituted CTRL/sample and 10 μl INTSTD in a reaction tube.
2.	Add solution onto the SPE cartridges and aspirate.
3.	Wash with 1 ml wash solution (WASHSOL), aspirate. Carry out this wash step four times in total.
4.	Eluate with 500 μl elution solution (ELUSOL) into borosilicate tubes.
5.	Dry the eluate, e.g. in a vacuum centrifuge.
6.	Reconstitute the dried sample with 200 μl activated solution A (SOLA).
7.	Injection into the LC-MS/MS system (see applicatio note).

8. LC-MS/MS METHOD

Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the parameters for setting the LC-MS/MS method.

9. CALCULATION

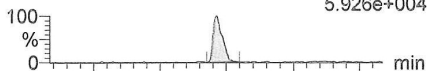
The linear regression is used as model for evaluation of the results. The two calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

10. CHROMATOGRAM EXAMPLES

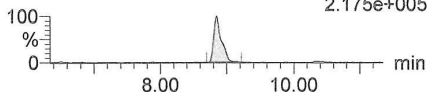
β -Casomorphin 7 (molecular weight: 789.95 g/mol)

Sample Name: Casoglia150616_001

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



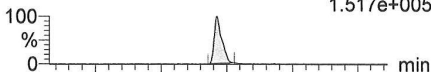
F7:MRM of 2 channels,ES+
790.43 > 70.05
2.175e+005



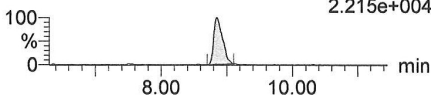
INTSTD (β -Casomorphin 7 heavy labelled, molecular weight: 795.95 g/mol)

Sample Name: Casoglia150616_001

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

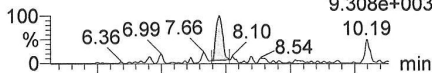


F8:MRM of 2 channels,ES+
796.63 > 70.36
2.215e+004

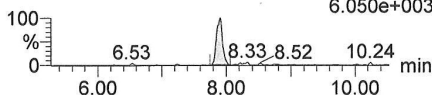


Casomorphin 1-3 (molecular weight: 425.50 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

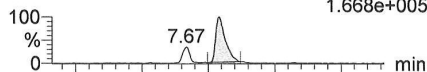
F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 136.1
9.308e+003



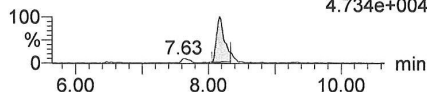
F1:MRM of 2 channels,ES+
426.82 > 70.32
6.050e+003

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

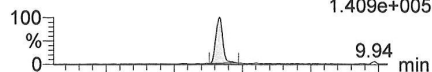
F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 70.08
1.668e+005



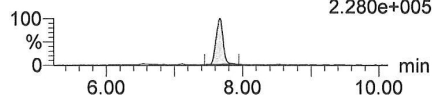
F3:MRM of 3 channels,ES+
523.13 > 116.07
4.734e+004

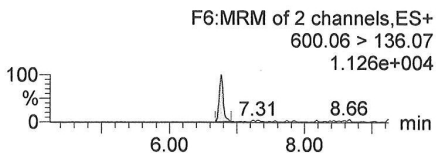
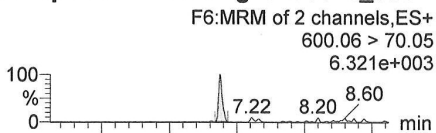
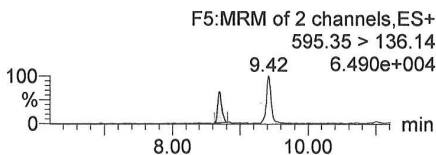
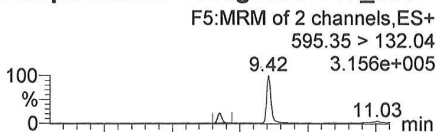
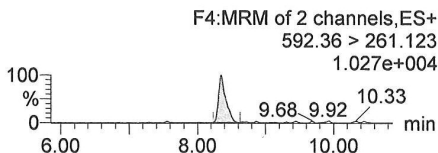
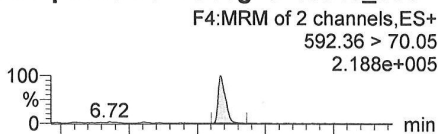
**Casomorphin 1-4 amide** (molecular weight: 521.63 g/mol)**Sample Name: Casoglia150616_001**

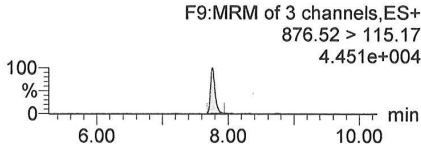
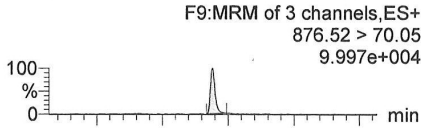
F2:MRM of 2 channels,ES+
522.27 > 136.07
1.409e+005



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****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**

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 amide	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 - reproducibility and repeatability

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
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 amide	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

Analyte	Sample	ng/ml	CV [%]
Gliadorphin	1	3.17	8.03
	2	2.14	7.59
Casomorphin 1-4 amide	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

The detection limit (LLOD) designates the lowest concentration of the analyte that can still be detected.

Analyte	pg/ml Urine
Casomorphin 1-3	1 132
Exorphin A	1 872
β -Casomorphin 7	420
Gliadorphin	520
Casomorphin 1-4 amide	624
Casomorphin 1-4	307
Exorphin C	473
Exorphin B	976

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

13. PRECAUTIONS

- 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.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immunodiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.

14. DISPOSAL

Mobile phase B (MOPHAB), elution solution (ELUSOL), solution A (SOLA) and activation solution (ACTSOL) must be disposed as non-halogenated solvents. The calibrators (CAL1–2) and controls (CTRL1–2) should be disposed due to their treatment as potentially infectious material in accordance with local regulations.

15. TECHNICAL HINTS












- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*® is a trademark of Immunodiagnostik 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.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send 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		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

