

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# Zearalenone ELISA

Enzyme Immunoassay for the rapid quantitative determination of Zearalenone in cereals and beer/gyle

**REF**

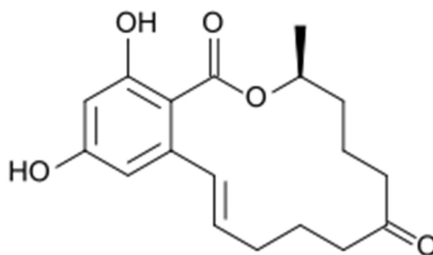
**DEZEAE03**



**96 wells**

Sensitivity	5 - 8 ppb
Recovery (spiked samples)	90 – 101 %
Incubation Time	20 min

## 1. GENERAL INFORMATION



Zearalenone in addition to fumonisin, deoxynivalenol and other trichothecenes belongs to the fusarium toxins. These toxins are already produced on the field in consequence of a contact of the cereals by fusarium species. These moulds infect grain and other types of food like peanuts and beans already during their growth. When a considerable amount of zearalenone contaminated feed is taken up by cows, it can also be detected in their milk. Even in beer it could be found. Zearalenone shows a strong estrogen-like activity. Thus zearalenone can cause an enlargement of the uterus, diminution of the ovarian glands and even infertility. Zearalenone is one of the main contaminants of farm products, which can be taken up by humans and animals.

In the European Union the limits are 20 – 400 ppb for food products. Thus a monitoring of food and feed with respect to the concentration of zearalenone is obligatory.

The **Zearalenone ELISA** represents a highly sensitive detection system and is particularly capable of the rapid quantification of zearalenone contaminations in cereals and beer.

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Zearalenone** quantitative test is based on the principle of the enzyme-linked immunosorbent assay. An antibody binding protein is coated on the surface of a microtiter plate. Zearalenone containing samples or standards, a zearalenone-peroxidase conjugate and an antibody directed against zearalenone are given into the wells of the microtiter plate. The conjugate competes with the zearalenone of samples/standards for the limited number of antibody sites. Simultaneously the anti-zearalenone antibody is bound to the antibody-binding protein coated on the microtiter plate. After 10 minutes incubation at room temperature the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A substrate solution is added and incubated for 10 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of zearalenone is indirectly proportional to the colour intensity of the test sample.

## 3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, ELISA reader etc.).

#### 4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
3. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

#### 5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-body-binding protein.
2. **CAL 1 – 6** Zearalenone Standards (0; 10; 25; 75; 200; 500 ppb): 6 vials with 1 mL each, dyed red, ready-to-use. Because of the total dilution of 1:10 of the cereal samples in the extraction step, the calibrators contain 1/10th of the stated value. Thus no further calculation after analysis is necessary.
3. **Ab** Anti-Zearalenone Antibody (rabbit): 6 mL, dyed blue, ready-to-use.
4. **ENZ CONJ** Conjugate (Zearalenone-Peroxidase): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
5. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
6. **STOP SOLN** Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL, ready-to-use.
7. **SAM DIL** Sample Diluent (PBS): 2 x 60 mL, dyed red, ready-to-use.
8. **WASH SOLN 10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
9. Instruction Manual.

#### 6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

##### Instrumentation

- 50 and 100 µL- micropipets
- ELISA reader (450 nm)
- Centrifuge
- Ultra-Turrax, mixer, vortex
- Plastic bag to store unused microtiter strips

##### Reagents

- Double distilled water
- Methanol

## 7. SAMPLE PREPARATION

### Cereals

- Grind sample to pass through a 20 mesh sieve and thoroughly mix prior to sub-sampling.
- Suspend 20 g of sample in 100 mL of 70 % methanol.
- Mix suspension for 5 minutes.
- Filter through Whatman #1 filter or alternatively centrifuge at a minimum of 3000 g for 5 minutes.
- Dilute 500 µL of filtrate/supernatant with 500 µL of sample diluent and test the sample in the ELISA.

### Beer / Gyle

- Dilute an adequate volume of sample diluent with 35 % methanol.
- Carbonized beer samples should be preliminarily degassed by moderate heating.
- Cloudy beers (such as beer brewed from wheat) / gyle should preliminarily be sterile-filtered.
- Dilute 100 µL beer / gyle with 900 µL sample diluents/methanol dilution.

In case of too high concentrated samples, an adequate volume of sample diluent is diluted with 35 % methanol. The sample extracts have to be further diluted with this dilution.

## 8. PROCEDURE

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the micro-titer plate.
3. Add 50 µL of zearalenone-peroxidase conjugate into each well.
4. Add 50 µL of the anti-zearalenone antibody into each well.
5. Incubate for 10 minutes at room temperature.
6. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
7. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
8. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 10 minutes at room temperature.
9. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (1 N acidic solution) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
10. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

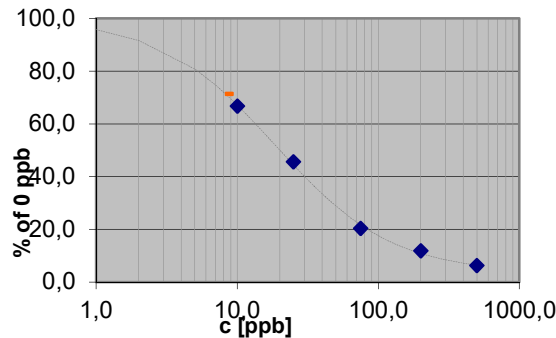
The ready-to-use standards are prepared for a direct determination of cereal sample concentrations. The dilution of samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure is already considered. Additional dilution due to high sample concentration has to be accounted for.

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ppb on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. Using the mean optical density (OD) value for each sample, determine the corresponding concentration of zearalenone in ppb from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

## 10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 0 ppb standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

Zearalenone (ppb)	% binding of 0 ppb
0	100
10	72
25	50
75	21
200	13
500	6



## 11. PERFORMANCE

### Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Zearalenone** is 5 ppb.

Validation experiments with common matrices resulted in the following LODs [ppb].

Wheat	7
Rye	8
Barley	8
Oats	8
Corn	8
Rice	7
Beer	7

The limit of quantification (LOQ) of the **Zearalenone** is 10 ppb.

Due to the variety of sample matrices and their influence on the blank, results less than the LOQ should be treated as negative.

### Recovery

Wheat flour	90 %
Oats flour	101 %
Rice flour	99 %
Corn flour	99 %
Beer	100 %

### Linearity

The serial dilution of spiked samples (wheat, oats, rice, corn and beer) resulted in a dilution linearity of 82-102 %.

**Precision**

Intra-assay Precision	4-7 %
Inter-assay Precision	5-13 %

**Cross-reactivity**

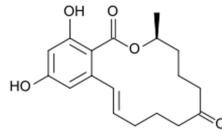
<b>Cross-reactivity</b>	<b>Relative to Zearalenone (=100 %)</b>
$\alpha$ -Zearalanol	35 %
$\beta$ -Zearalanol	17 %
$\alpha$ -Zearalenol	73 %
$\beta$ -Zearalenol	23 %

**12. REFERENCES**

1. Suzuki T, et al. (2007) – Sensitive detection of estrogenic mycotoxin zearalenone by open sandwich immunoassay. *Anal Sci*, 23(1):65-69
2. Sang-Ho C, et al. (2012) – Production of highly group-specific monoclonal antibody against zearalenone and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Sci*, 13(2):119-125
3. Wang YP, et al. (2006) – Development of ELISA-kit for quantitative analysis of zearalenone. *Wei Sheng Yan Jiu*, 35(2):221-224
4. Rashedi M, et al. (2012) – Zearalenone contamination in barley, corn, silage and wheat bran. *Toxic Ind Health*, 28(9):779-782
5. Gao Y, et al. (2012) – Preparation of highly specific anti-zearalenone antibodies by using the cationic protein conjugate and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Analyst*, 137(1):229-236
6. Burmistrova NA, et al. (2009) – Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibodies in different immunoassay formats. *Anal Bioanal Chem*, 395(5):1301-1307
7. Thongrussamee T, et al. (2008) – Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals. *Food Add Contam Part*, 25(8):997-1006
8. Bennett GA, et al. (1994) – Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat and pig feed: collaborative study. *J AOAC Int*, 77(6):1500-1509
9. Vulic A, et al. (2012) – Analysis of naturally occurring zearalenone in feeding stuffs and urine of farm animals in Croatia. *J Immunoassay Immunochem*, 33(4):369-376
10. Hervás M, et al. (2009) – Electrochemical microfluidic chips coupled to magnetic bead-based ELISA to control allowable levels of zearalenone in baby foods using simplified calibration. *Analyst*, 134(12):2405-2411

Empfindlichkeit	5 – 8 ppb
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	90 – 101 %
Inkubationszeit	20 min

## 1. ALLGEMEINES



Zearalenon gehört neben Fumonisin, Deoxynivalenol und anderen Trichothecenen zu den Fusarioxinen, die bereits auf dem Feld durch den Befall der Getreidepflanze mit Fusarien-Pilzen gebildet werden. Diese Pilze befallen Getreide und andere Nutzpflanzen wie Erdnuss oder Bohne bereits in der Wachstumsphase. Wenn eine zu hohe Menge Zearalenon durch kontaminiertes Futter aufgenommen wird, kann dieses auch in der Milch von Nutztieren nachgewiesen werden. Auch in Bier kann es noch detektiert werden. Zearalenon hat eine hohe Östrogen-analoge Aktivität. Somit kann die vermehrte Aufnahme von Zearalenon zu einer Vergrößerung des Uterus, Verkleinerung der Keimdrüsen bis hin zu Unfruchtbarkeit führen. Zearalenon ist eine der Hauptkontaminanten bei Agrarprodukten, welche durch Mensch oder Tier aufgenommen werden können. In der EU gelten Grenzwerte von 20 – 400 ppb für Nahrungsmittel. Eine Überwachung der Lebens- bzw. Futtermittel bezüglich des Zearalenon-Gehalts ist somit zwingend erforderlich.

Der **Zearalenon ELISA** stellt ein hochsensibles Nachweissystem dar und ist insbesondere zur schnellen Quantifizierung von Zearalenon in Getreide und Bier geeignet.

## 2. TESTPRINZIP

Der **Zearalenon** Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Antikörperbindendes Protein ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Zearalenon enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Zearalenon-Peroxidase-Konjugat und ein gegen Zearalenon gerichteter Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Kompetition zwischen markiertem und unmarkiertem Zearalenon um die limitierten Antikörperbindungsstellen statt. Gleichzeitig wird der anti-Zearalenon Antikörper an das Antikörperbindende Protein auf der Mikrotiterplatte gebunden. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nicht-gebundenes Material zu entfernen. Eine Substratlösung wird hinzu pipettiert und 10 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Zearalenon-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

### 3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

### 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
3. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

### 5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. **SORB** **MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Antikörper-bindendem Protein.
2. **CAL** **1** – **6** Zearalenon-Standards: 6 Fläschchen mit je 1 mL (0; 10; 25; 75; 200; 500 ppb), rot eingefärbt, gebrauchsfertig. Aufgrund der Gesamtverdünnung von 1:10 durch den Extraktionsprozess enthalten die Standards jeweils 1/10 der angegebenen Konzentration. Weitere Berechnung nach der Analyse ist somit nicht nötig.
3. **Ab** Anti-Zearalenon Antikörper (Kaninchen): 6 mL, blau eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **ENZ** **CONJ** Konjugat (Zearalenon-Peroxidase), 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. **SUB** **TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **STOP** **SOLN** Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. **SAM** **DIL** Probenverdünner (PBS), 2 x 60 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
8. **WASH** **SOLN** **10x** Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
9. Arbeitsanleitung.



## 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

### Geräte

- 50 und 100 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Ultra-Turrax, Mixer, Vortex
- Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

### Reagenzien

- Bidest. Wasser
- Methanol

## 7. PROBENVORBEREITUNG

### Getreide

- Probe zermahlen und durch 20 mesh Porenweite sieben.
- 20 g der Probe in 100 mL 70 % Methanol suspendieren.
- Suspension 5 min schütteln.
- Extrakt durch Whatman #1 Filter filtrieren oder alternativ 5 min bei min. 3000 g zentrifugieren.
- 500 µL Filtrat / überständige Lösung mit 500 µL Probenverdünner verdünnen und im ELISA einsetzen.

### Bier / Würze

- Eine adäquate Menge Probenverdünner mit 35 % Methanol versetzen.
- Kohlensäure-haltige Bierproben zuvor durch leichtes Erwärmen entgasen.
- Trübe Biere (z.B. Hefeweizen) / Würze zuvor steril filtrieren.
- 100 µL Bier / Würze mit 900 µL Probenverdünner-Methanol-Lösung verdünnen.

Im Fall einer zu hoch konzentrierten Probe, wird eine adäquate Menge Probenverdünner mit 35 % Methanol versetzt. Die zuvor hergestellten Extrakte werden mit dieser Lösung verdünnt.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. 50 µL des Zearalenon-Peroxidase Konjugats in die Vertiefungen pipettieren.
4. 50 µL des Anti-Zearalenon-Antikörpers in die Vertiefungen pipettieren.
5. Platte für 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
7. 100 µL Substratlösung zugeben.
8. Platte für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
9. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (1 N saure Lösung) beenden.
10. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

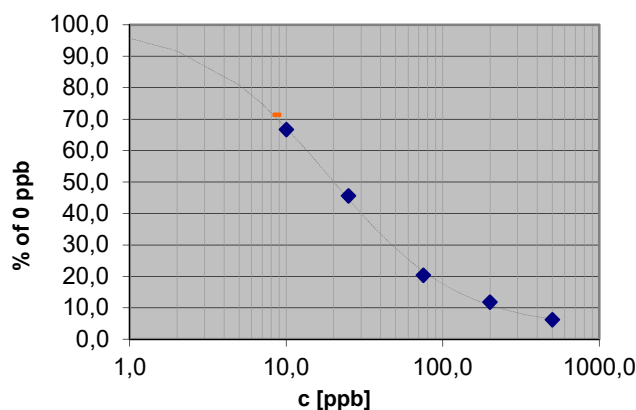
Die gebrauchsfertigen Standards sind für eine direkte Bestimmung der Getreide-Konzentration vorbereitet. Die Probenverdünnung, bedingt durch den oben beschriebenen Extraktionsprozess, ist bereits berücksichtigt. Zusätzliche Verdünnung aufgrund sehr hoher Probenkonzentration muss berücksichtigt werden.

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm (4-Parameter-Auswertung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ppm (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppb für Zearalenon abgelesen.

## 10. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 ppm-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Zearalenone (ppb)	OD-% von 0 ppb
0	100
10	72
25	50
75	21
200	13
500	6



## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Zearalenon Tests** beträgt 5 ppb. Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden unteren Nachweisgrenzen [ppb].

Weizen	7
Roggen	8
Gerste	8
Hafer	8
Mais	8
Reis	7
Bier	7

Die untere Bestimmungsgrenze des **Zearalenon Tests** beträgt 10 ppb. Proben mit Ergebnissen kleiner der Bestimmungsgrenze sollten aufgrund der Vielfalt an Matrices und deren Einfluss auf den Hintergrund als negativ bewertet werden.

**Wiederfindung**

Weizenmehl	90 %
Hafermehl	101 %
Reismehl	99 %
Maismehl	99 %
Bier	100 %

**Linearität**

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über vier Stufen (Weizenmehl, Hafermehl, Reismehl, Maismehl und Bier) ergab Verdünnungslinearitäten von 82-102 %.

**Präzision**

Intra-Assay Präzision	4-7 %
Inter-Assay Präzision	5-13 %












**Kreuzreaktionen**

Kreuzreaktionen	relativ zu Zearalenon (=100 %)
$\alpha$ -Zearalanol	35 %
$\beta$ -Zearalanol	17 %
$\alpha$ -Zearalenol	73 %
$\beta$ -Zearalenol	23 %

**12. LITERATUR**

1. Suzuki T, et al. (2007) – Sensitive detection of estrogenic mycotoxin zearalenone by open sandwich immunoassay. *Anal Sci*, 23(1):65-69
2. Sang-Ho C, et al. (2012) – Production of highly group-specific monoclonal antibody against zearalenone and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Sci*, 13(2):119-125
3. Wang YP, et al. (2006) – Development of ELISA-kit for quantitative analysis of zearalenone. *Wei Sheng Yan Jiu*, 35(2):221-224
4. Rashedi M, et al. (2012) – Zearalenone contamination in barley, corn, silage and wheat bran. *Toxic Ind Health*, 28(9):779-782
5. Gao Y, et al. (2012) – Preparation of highly specific anti-zearalenone antibodies by using the cationic protein conjugate and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Analyst*, 137(1):229-236
6. Burmistrova NA, et al. (2009) – Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats. *Anal Bioanal Chem*, 395(5):1301-1307
7. Thongrussamee T, et al. (2008) – Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals. *Food Add Contam Part*, 25(8):997-1006
8. Bennett GA, et al. (1994) – Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat and pig feed: collaborative study. *J AOAC Int*, 77(6):1500-1509
9. Vulic A, et al. (2012) – Analysis of naturally occurring zearalenone in feeding stuffs and urine of farm animals in Croatia. *J Immunoassay Immunochem*, 33(4):369-376
10. Hervás M, et al. (2009) – Electrochemical microfluidic chips coupled to magnetic bead-based ELISA to control allowable levels of zearalenone in baby foods using simplified calibration. *Analyst*, 134(12):2405-2411

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore