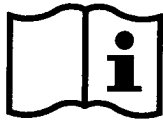


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Zearalenone ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Zearalenone in food



DEZEAE01



96

Sensitivity	0.25 ng/mL
Recovery (spiked samples)	85-95 %
Incubation Time	200 min

1. GENERAL INFORMATION

Zearalenone belongs to the group of mycotoxins. Similar to other mycotoxins, zearalenone is a degradation product of the secondary metabolism. It is produced by different moulds of the *Fusarium* genus. 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 order to protect humans of illnesses caused by zearalenone, a qualitative and quantitative control of threatened food is essential, together with appropriate hygienic measures, which help to prevent the development of zearalenone.

The **Zearalenone ELISA** is a quick, economical and sensitive method to detect zearalenone in food. After an appropriate sample preparation, 40 samples can be tested in duplicate within 200 minutes.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Zearalenone** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. A zearalenone conjugate is bound on the surface of a microtiter plate. Zearalenone containing samples or standards and an antibody directed against zearalenone are given into the wells of the microtiter plate. Immobilized and free zearalenone compete for the antibody binding sites. After two hours incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugate directed against the zearalenone antibody is given into the wells and after another hour incubation, the plate is washed again. Then a substrate solution is added and incubated for 20 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. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. 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.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).
5. Zearalenone is a very toxic substance. It can cause cancer or irreversible damages of the genetic substance. Zearalenone is toxic after inhalation, swallowing or dermal contact. Appropriate protective clothing must be worn.

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. Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with zearalenone conjugate.
2. Zearalenone Standards (0; 0.5; 2; 20; 200 ng/mL): 5 vials with 1.0 mL each, ready-to-use.
3. Anti-Zearalenone Antibody (rabbit): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
4. Conjugate (anti-rabbit-IgG-HRP): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
5. Substrate Solution (TMB): 15 mL; ready-to-use.
6. Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL; ready-to-use.
7. Sample Diluent (PBS): 60 mL, ready-to-use.
8. Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate, dyed blue. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.
9. Two plastic foils to cover the strips during the incubation.
10. Plastic bag to store unused microtiter strips.
11. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 50, 100 and 1000 µL-micropipets
- Microtiter plate shaker
- ELISA reader (450 nm)
- Mixer
- Centrifuge
- Horizontal shaker or magnetic stirrer

Reagents

- Methanol
- Distilled water
- PBS (Phosphate buffered saline: 0.70 g/L NaH₂PO₄·2H₂O, 2.90 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 8.77 g/L NaCl, pH 7.2-7.4)

7. SAMPLE PREPARATION

- An appropriate amount of grain or nuts is crushed in a mixer for 3 minutes to produce a fine to medium-fine powder. If flour is used, the first step can be omitted.
- 2 g of this powder are extracted with 10 mL methanol/PBS (60/40 v/v). This mixture is agitated for 30 minutes on a horizontal shaker (min. 120/minute). Alternatively also a magnetic stirrer can be used.
- The total supernatant is centrifuged afterwards for 5 minutes at 3000 g.
- The aqueous phase is diluted 1:10 in sample diluent, before being assayed in the **Zearalenone ELISA**.

Alternatively also immunoaffinity columns (Cat.-No.: DEZEAA01) can be employed for the extraction. When using such columns care must be taken, that the eluate which is given into the **Zearalenone ELISA** does not contain more than 5% organic solvent (methanol, acetone). In that case, the eluate must be further diluted with sample diluent.

8. PROCEDURE

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL ready-to use standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate. Immediately add 50 µL zearalenone antibody into each well.
3. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 120 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 180 minutes without shaker).
4. 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.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-rabbit-IgG-HRP) into each well.
6. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 60 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 90 minutes without shaker).
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. 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.
11. 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

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 ng/mL on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of zearalenone in ng/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. The diluted samples must be further converted by the appropriate dilution factor (50 for the above described extraction). The factor is dependent on the sample preparation procedure 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 ng/mL standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in every new test.

Zearalenone (ng/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
0.5	90
2	81
20	42
200	15

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The sensitivity of the **Zearalenone ELISA** is 0.25 ng/mL (based on the standard curve).

Recovery

The recovery of spiked grain samples was determined to 85-95%.

Intra-assay Precision

The intra-assay variation of the zearalenone test was determined to 3%.

12. REFERENCES

1. Teuscher, E. und Lindequist, U. (eds): Biogene Gifte - Biologie, Chemie, Pharmakologie. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag (1994).
2. Ueno, I. (ed): Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier Science, ISBN 0-444-99661-3 (1983).
3. Scott, Peter, M. Mycotoxins. JAOAC, Vol. 70, No. 2, 276 - 281 (1987).

Empfindlichkeit	0,25 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	85-95 %
Inkubationszeit	200 min

1. ALLGEMEINES

Zearalenon gehört zu der Gruppe der Mykotoxine. Wie auch andere Mykotoxine ist Zearalenon ein Stoffwechselprodukt des Sekundärmetabolismus. Es wird von verschiedenen Pilzarten der Gattung *Fusarium* produziert. Diese Pilze befallen Getreide und andere Nahrungsmittel wie Gerste, Mais, Weizen, Erdnüsse, Bohnen u.a. bereits während des Wachstums. Bei Aufnahme großer Mengen an zearalenonkontaminierten Futtermitteln ist dieses auch in der Kuhmilch wiederzufinden. Auch in Bier ist es nachgewiesen worden. Zearalenon weist starke östrogene Aktivität auf. So kann Zearalenon eine Vergrößerung des Uterus, Verkleinerung der Ovarien bis hin zur Infertilität verursachen. Es zählt zu den Hauptkontaminanten von landwirtschaftlichen Produkten, die durch Mensch und Tier aufgenommen werden.

Um den Menschen vor Zearalenon bedingten Krankheiten zu schützen, bedarf es neben entsprechenden Hygienemaßnahmen, welche die Bildung von Zearalenon vermeiden helfen, einer quantitativen und qualitativen Kontrolle gefährdeter Lebensmittel.

Der **Zearalenon ELISA** ist eine schnelle, preisgünstige und empfindliche Methode, um Zearalenon in Lebensmitteln nachzuweisen. Es können 40 vorbereitete Proben in 200 Minuten im Doppelsatz bestimmt werden.

2. TESTPRINZIP

Der **Zearalenon Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Zearalenon-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Zearalenon enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Zearalenon-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen festphasengebundenem Zearalenon und Zearalenon der Probe um die freien Bindungsstellen des Antikörpers statt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein gegen den Zearalenon-Antikörper gerichtetes Konjugat wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 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 °C-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. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. 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.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.
5. Zearalenon ist eine sehr giftige Substanz. Sie ist toxisch beim Einatmen, Verschlucken oder bei Hautkontakt und kann Krebs oder irreversible Schäden in der genetischen Substanz hervorrufen. Geeignete Sicherheitskleidung tragen!

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. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Zearalenon-Konjugat.
2. Zearalenon Standards: 5 Fläschchen mit je 1,0 mL (0; 0,5; 2; 20; 200 ng/mL), gebrauchsfertig.
3. Anti-Zearalenon Antikörper (Kaninchen): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Konjugat (anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. Probenverdünner (PBS), 60 mL, gebrauchsfertig.
8. Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat, blau eingefärbt. 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. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
10. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
11. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 50, 100 und 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mixer
- Zentrifuge
- Horizontalschüttler oder Magnetrührer

Reagenzien

- Methanol
- Dest. Wasser
- PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung: 0,70 g/L NaH₂PO₄·2H₂O, 2,90 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 8,77 g/L NaCl, pH 7,2-7,4)

7. PROBENVORBEREITUNG

- Eine adäquate Menge Getreide wird in einem Mixer 3 Minuten zu einem fein- bis mittelkörnigen Pulver zerkleinert. Werden Mehle verwendet, entfällt dieser erste Schritt.
- 2 g von diesem Pulver werden in 10 mL Methanol/PBS (60/40 v/v) aufgenommen. Dieses Gemisch wird 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler (mind. 120/min) geschüttelt. Alternativ kann auch ein Magnetrührer verwendet werden.
- Der gesamte Überstand wird anschließend 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert.
- Die wässrige Phase wird 1:10 in Probenverdünner verdünnt, bevor sie im **Zearalenon ELISA** eingesetzt wird.

Alternativ können für die Aufreinigung Immunaффinitätssäulen verwendet werden (Best.-Nr.: DEZE-AA01). Werden solche Säulen eingesetzt, muss darauf geachtet werden, dass die im **Zearalenon ELISA** pipettierte Lösung nicht mehr als 5% organisches Lösungsmittel (Methanol, Aceton) enthält. Das Eluat muss entsprechend in Probenverdünner verdünnt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des Zearalenon-Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 120 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 180 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
4. 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 geringeren Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (1 N saure Lösung) beenden.
11. 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

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 eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ng/mL für Zearalenon abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift beträgt der Faktor 50.

10. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 ng/mL-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.

Zearalenon (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
0,5	90
2	81
20	42
200	15

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Zearalenon Tests** beträgt 0,25 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

Wiederfindung

Die Wiederfindung aufgestockter Getreideproben wurde mit 85-95% bestimmt.

Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Zearalenon-Tests wurde mit 3% bestimmt.

12. LITERATUR

1. Teuscher, E. und Lindequist, U. (eds): Biogene Gifte - Biologie, Chemie, Pharmakologie. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag (1994).
2. Ueno, I. (ed): Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier Science, ISBN 0-444-99661-3 (1983).
3. Scott, Peter, M. Mycotoxins. JAOAC, Vol. 70, No. 2, 276 - 281 (1987).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità