

HybriDetect 2T

Universal lateral flow dipstick for simultaneous detection of two different analytes (proteins, genomic amplicates) labelled with FITC, biotin and digoxigenine; development platform
English: 1-8

Universeller Lateralfuss-Dipstick zum gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate) markiert mit FITC, Biotin und Digoxigenin; Entwicklungsplattform
Deutsch: 9-16

- For research only -

REF:

MGHD2 1



Milena Biotec GmbH

Versailler Straße 1

D-35394 Gießen, Germany








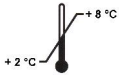

Tel.: +49-(0)641-94 88 83 - 0

Fax: +49-(0)641-94 88 83 - 80

E-Mail: info@milena-biotec.de

<http://www.milena-biotec.de>

Explanation of Symbols

Symbols (GB) Symbole (DE) Symboles (FR) Simboli (IT) Símbolos (ES) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL)	Explanation Erklärung Significato Significato Signification Magyarázat objaśnienia Επαξήγηση Verklaring	Symbols (GB) Symbole (DE) Simboli (IT) Símbolos (ES) Symboles (FR) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL)	Explanation Erklärung Significato Significato Signification Magyarázat objaśnienia Επαξήγηση Verklaring
	Expiry date Haltbarkeitsdatum Data di scadenza Fecha de caducidad Date d'expiration Lejárati idő Data przydatności Ημερομηνία Λήξης Uiterste gebruiksdatum		Package size Packungsgröße Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests par trousse Kiszerezés nagysága Ilość testów Μέγεθος Συσκευασίας Verpakkingsgrootte
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Para uso en el Diagnóstico <i>in vitro</i> Diagnostic <i>in vitro</i> In vitro diagnosztikum Do diagnostyki <i>In Vitro</i> In Vitro ιατρική διαγνωστική συσκευή Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek		Manufacturer Hersteller Produttore Fabricante Fabriqué par Gyártó Producent Παραγωγός Fabrikant
	Batch code Los-Bezeichnung Codice del lotto Lote Numéro de lot Sarzszám Kod partii towaru Αριθμός Παρτίδας Partijnummer		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung Solo per uso sperimentale Con fines exclusivos de evaluación Pour évaluation uniquement Kizárólag vizsgálati célokra Tylko do oceny produktu Μόνο για λόγους αξιολόγησης Uitsluitend ter evaluatie
REF	Catalogue number Artikel-Nummer Numero di catalogo Referencia Référence Katalógusszám Numer katalogowy Αριθμός Καταλόγου Catalogusnummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instrucciones de uso Consulter la notice A használati utasítás tanulmányozandó Informacja dla użytkownika Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Storage conditions Lagerungsbedingungen Temperatura di conservazione Temperatura de conservación Température de conservation Tárolási körülmények Temperatura przechowywania Συνθήκες Φύλαξης Bewaarcondities		Consult attended documents Begleitdokumente beachten Consultare i documenti relativi Consultar documentos adjuntos Consulter le document avec attention A csatolt dokumentumok tanulmányozandók Dodatkowe dokumenty Συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα έντυπα Raadpleeg bijgevoegde documenten

Materials Supplied, Storage and Stability

Component	Cat.-No.	Content	Preparation	Storage	Shelf Life
HybriDetect 2T Dipsticks: Membrane coated with biotin-ligand and polyclonal (goat) digoxigenine antibody; polyclonal (rabbit) anti-FITC antibody in gold conjugate	MGDS2	2 x 50 tests (blue lamination)	Ready-to use	2 –8°C; Containers must be always closed (moisture protection)!	until expiry date
HybriDetect 2T Assay Buffer: Tris-buffered saline	MGCB2	2 vials à 10 mL (yellow cap)	Ready-to use	2 –8°C	until expiry date

Material Safety Data Sheets are available on request (look as well www.milenia-biotec.de).

Materials Required

- Pipets
- Pipet tips (containing protective filters for PCR)
- Reaction tubes or 96-well microtiter plate

Necessary Development Work - Development Platform

Development of two solutions (A and B). Each solution must contain two different labeled detectors for the respective analyte.

Following conditions are necessary:

- 1) **Solution A:** Detectors must be labeled with:
 - FITC (fluorescein isothiocyanate)
 - Biotin
- 2) **Solution B:** Detectors must be labeled with:
 - FITC (fluorescein isothiocyanate)
 - Digoxigenine
- 3) Use about 100 µL fluid (sample material and analyte-specific solutions, A and B) for the assay procedure.
- 4) The provided buffers (MGCB2) may be used as a basic for these analyte-specific solutions.

Example of use:

20 µl sample material and 80 µl analyte-specific solutions with 5 min incubation time.

Notice:

Volumes, analyte-specific solutions, and incubation time are part of the individual test development.

A basic procedure for the detection of genomic amplicons is explained on page 7: "Assay performance PCR products." One amplification product should be biotinylated and the specific hybridization probe should be FITC labeled. The second amplification product should be labelled with digoxigenine and the specific hybridization probe should be FITC labeled. Various amplification procedures (Polymerase Chain Reaction or isothermal amplifications like LAMP or RPA) can be used.

Warnings and Precautions

- All reagents should be stored at 2 – 8° C in their original containers.
- Before use, bring all reagents to room temperature (18 – 28° C).
- The expiration date of all components must be observed.
- Protect dipsticks from humidity; Container must always be closed.
- Touch and label only the foil-covered areas of the dipsticks (labeling area).

The assay buffer contains an anti-microbial reagent; therefore avoid contact with skin and/or mucous membranes.

Method

Milenia[®] HybriDetect 2T is a ready-to-use, universal test strip (dipstick), which bases on the lateral flow technology using gold particles. The dipstick is designed to develop qualitative or quantitative rapid test systems for simultaneous detection of two different analytes such as proteins, antibodies, or gene amplifications. The user needs to develop two analyte-specific solutions, with following conditions. Solution A: Contains a first detector (e.g. antibody, antigen, specific probe) labeled with FITC and a second one (e.g. antibody, primer) labeled with biotin, and solution B: Contains a first detector (e.g. antibody, antigen, specific probe) labeled with FITC again and but a second one (e.g. antibody, primer) labeled with digoxigenine, (see “Common Testprinciple” on page 5).

The sample to be determined is mixed with the developed analyte-specific solutions, and then the dipstick is placed into this solution.

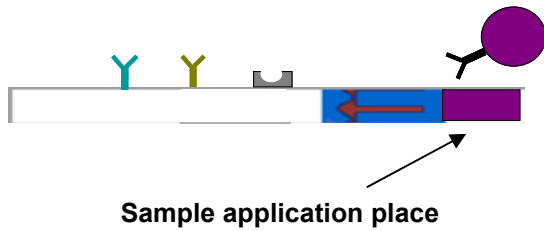
The complexed analyte (A)-labeled with FITC and biotin, binds first to the gold-labeled FITC-specific antibodies in the sample application area of the dipstick as well as the complexed analyte B (labeled with FITC and digoxigenine). The gold complexes A and B diffuse over the membrane by capillarity. Only the analyte captured gold particles will bound when they overflow the immobilized biotin-ligand molecules at the respective test band (test band A- analyt A, test band B- analyt B) and generate there a red-blue band over the time. Not-captured gold particles flow over the control band and will be fixed there by species-specific antibodies. With increasing incubation time, the formation of an intensely colored control band appears.

Additional available Products

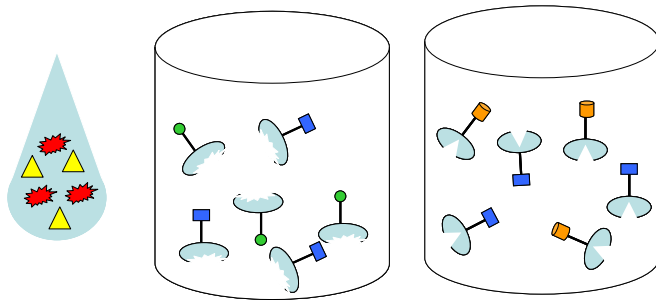
Product Name	Order No.	Content	Description
Milenia [®] HybriDetect	MGHD 1	100 tests	Dipsticks with one test band
Milenia [®] HybriDetect HS	MGHT 1	40 tests	Test strips with one test band (in a housing)
Milenia [®] POCScan Reader	MSCAN 1	1 device	Interpretation device for HybriDetect products
Milenia [®] HybriDetect Software	MGSW	1 CD	Software for the documentation and/or quantification of results
Milenia [®] Carrier	MGCA 1	15 pieces	Holder for insertion of Milenia [®] Dipsticks in the Milenia [®] POCScan Reader

Common Testprinciple

1) Ready-to-use (analyte-independent) dipstick



2) Addition of sample, resp. analyte A and B-specific solutions

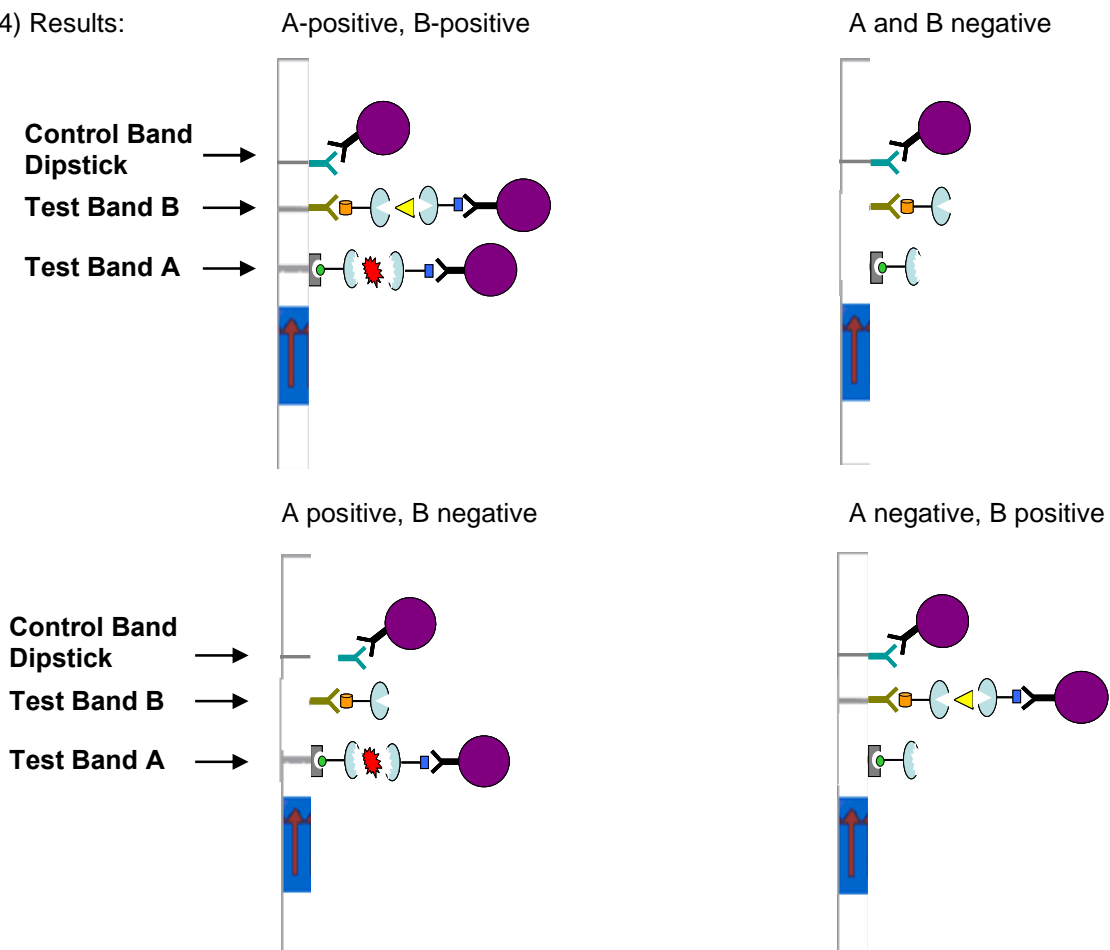


Symbols:

	FITC
	Biotin
	Digoxigenine
	Goldparticle
	anti-FITC Antibody
	Analyte A Detector 1 + 2
	Analyte A (Protein, antibody, genetic amplicon)
	Analyte B Detector 1 + 2
	Analyte B (Protein, antibody, genetic amplicon)
	Biotin-Ligand
	anti-Digoxigenine Antibody
	anti-rabbit Antibody

3) Incubation

4) Results:



Control Band Dipstick

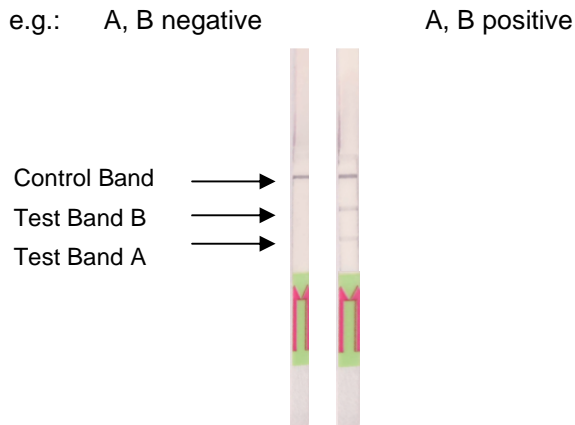
In any case, the control band must be always visible!

It is a control function and can not be used to assess the test band. If the control band is not visible after the incubation period, the result is invalid! The test must be repeated with a new dipstick!

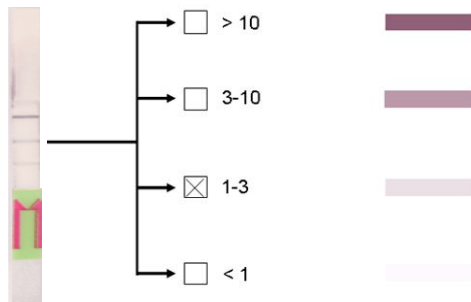
Interpretation of Results

There are three possibilities to interpret the Milenia®HybriDetect 2T dipstick results:

1) Qualitative by visual interpretation



2) Semi-quantitative, e.g. by interpretation cards

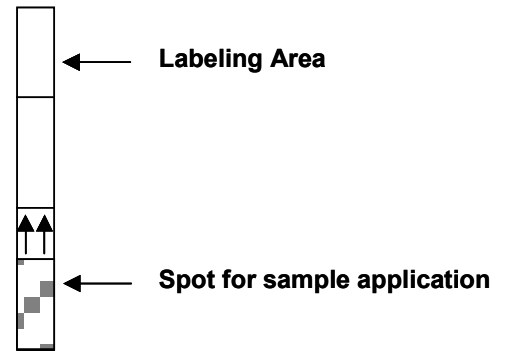


3) Quantitative interpretation with the Milenia® POCScan Reader and appropriate software



Assay Performance “PCR Products”

1. Take the required number of dipsticks out of the container and mark them.
2. For each sample to be analyzed pipet **100 µL** HybriDetect Assay Buffer or individual developed buffer into a reaction tube or a well of a microtiter plate.
3. Pipet **5 – 10 µl** of the hybridization product directly on the sample application area, or **alternatively**: add **5 – 10 µl** of the hybridization product into the solution of the reaction tube / well.
4. Place the dipsticks with the sample application area into the solution and incubate them e. g. for **5 - 15 minutes** in an upright position.
5. In the end of incubation period, remove dipsticks from assay solution and interpret test results immediately.



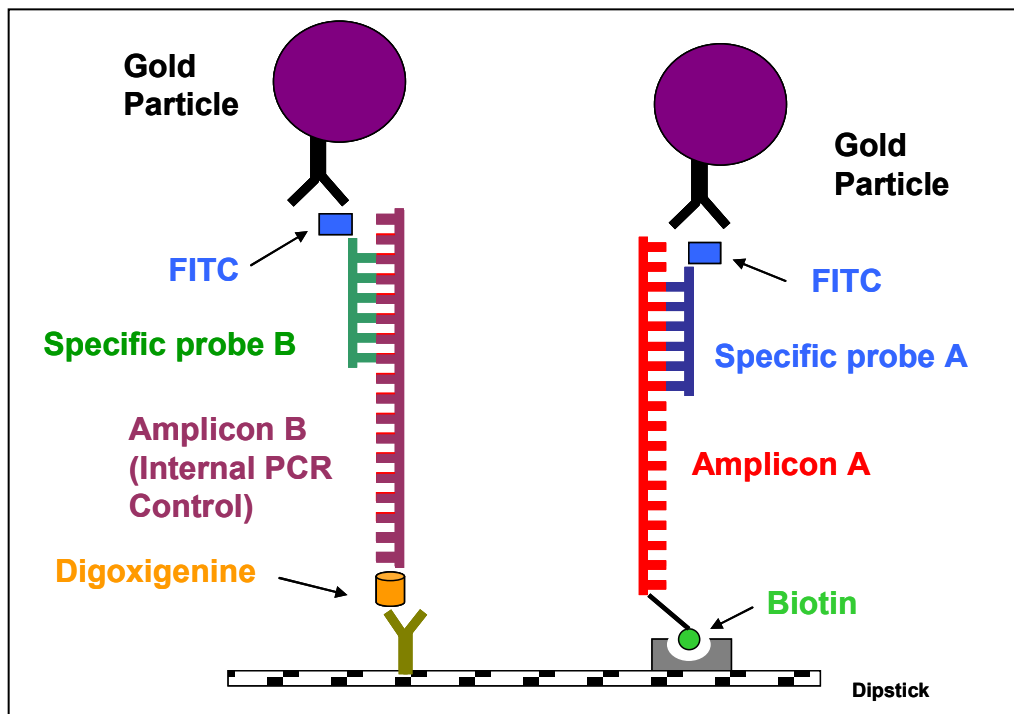
Notice:

- If a higher analytical sensitivity is required, it could be helpful to increase the volume of the PCR product.
- Volumes, analyte-specific solutions, and incubation time are always part of the individual test development.

Interpretation of “PCR” Results

Applying an internal PCR control:

While the biotin-labeled **amplicon A** is mainly used for the detection of a specific target sequence the digoxigenine-labeled **amplicon B** is provided as an internal PCR amplification control.



Test band A	Test band B	Control band	Interpretation
positive	positive	positive	<ul style="list-style-type: none"> control band is clearly visible, test run is valid amplicon A is detected (positive) internal PCR control is positive (amplicon B)
negative	positive	positive	<ul style="list-style-type: none"> control band is clearly visible, test run is valid amplicon A is not detected (negative) internal PCR control is positive (amplicon B)
positive	negative	negative	<ul style="list-style-type: none"> test runs were not valid because control band did not appear
negative	positive		
negative	negative		
negative	negative	positive	<ul style="list-style-type: none"> rapid test performed properly because control band is clearly visible PCR amplification did not work due (amplicon B is not detectable)
positive			

Trouble Shooting „PCR“

Problem	Possible cause(s)	Recommendation
Control band is not visible.	<ul style="list-style-type: none"> a) wrong or destroyed assay buffer b) expiration date of dipsticks is exceeded c) wrong storage conditions of dipsticks 	apply new (fresh) chemicals
Negative result with dipstick but clearly visible band in agarose gel	<ul style="list-style-type: none"> a) detection of an unspecific PCR product in agarose gel b) hybridization was not successful 	Check identity of PCR product by Southern blotting or sequence analysis Check conditions of hybridization.
Mineral oil	<ul style="list-style-type: none"> a) mineral oil affects flow characteristics of the assay b) development of band might be hampered 	Remove PCR product very slowly from the bottom of the reaction vial.

Assay Sensitivity “PCR”

Analytical sensitivity of the Milenia® HybriDetect 2T is equivalent to agarose gel electrophoresis and subsequent staining with Ethidiumbromide. Independent on the size of the PCR product and the number of amplification cycles as low as 5 pg DNA could be detected.

Literature-References

Kiatpathomchai W, et al, J Virol Methods (2008); 153: 214-217
 Puthawibool T, et al, J Virol Methods (2009); 156 (1-2): 27-31
 Jaroenram W, et al, Mol Cell Probes (2009); 23 (2): 65-70
 Nimitphak T, et al, Mol Cell Probes (2009); 24 (1): 1-5
 Kikuchi T, et al, Nematology (2009) ; 99 (12): 1365-1369
 Piepenburg O, et al, PloS Biology 2006, Volume 4, Issue 7, e204

HybriDetect 2T

Universal lateral flow dipstick for simultaneous detection of two different analytes (proteins, genomic amplicates) labelled with FITC, biotin and digoxigenine; development platform

English: 1-8

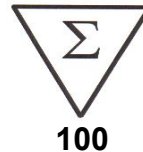
Universeller Lateralffluss-Dipstick zum gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate) markiert mit FITC, Biotin und Digoxigenin; Entwicklungsplattform

Deutsch: 9-16

- Nur für Forschungszwecke -

REF:

MGHD2 1



Milenia Biotec GmbH

Versailler Straße 1

D-35394 Gießen, Germany









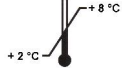

Tel.: +49-(0)641-94 88 83 - 0

Fax: +49-(0)641-94 88 83 - 80

E-Mail: info@milenia-biotec.de

<http://www.milenia-biotec.de>

Erklärung der Symbole

Symbols (GB) Symbole (DE) Symboles (FR) Simboli (IT) Símbolos (ES) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL)	Explanation Erklärung Significato Significado Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring	Symbols (GB) Symbole (DE) Simboli (IT) Símbolos (ES) Symboles (FR) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL)	Explanation Erklärung Significato Significado Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring
	Expiry date Haltbarkeitsdatum Data di scadenza Fecha de caducidad Date d'expiration Lejárati idő Data przydatności Ημερομηνία λήξης Uiterste gebruiksdatum		Package size Packungsgröße Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests par trousse Kiszerezés nagysága Ilość testów Μέγεθος Συσκευασίας Verpakingsgrootte
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Para uso en el Diagnóstico <i>in vitro</i> Diagnostic <i>in vitro</i> In vitro diagnosztikum Do diagnostyki <i>In Vitro</i> In Vitro ιατρική διαγνωστική συσκευή Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek		Manufacturer Hersteller Produttore Fabricante Fabriqué par Gyártó Producent Παραγωγός Fabrikant
	Batch code Los-Bezeichnung Codice del lotto Lote Numéro de lot Sarzszám Kod partii towaru Αριθμός Παρτίδας Partijnummer		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung Solo per uso sperimentale Con fines exclusivos de evaluación Pour évaluation uniquement Kizárólag vizsgálati célokra Tylko do oceny produktu Μόνο για λόγους αξιολόγησης Uitsluitend ter evaluatie
	Catalogue number Artikel-Nummer Numero di catalogo Referencia Référence Katalógusszám Numer katalogowy Αριθμός Καταλόγου Catalogusnummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instrucciones de uso Consulter la notice A használati utasítás tanulmányozandó Informacja dla użytkowników Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Storage conditions Lagerungsbedingungen Temperatura di conservazione Temperatura de conservación Température de conservation Tárolási körülmények Temperatura przechowywania Συνθήκες Φύλαξης Bewaarcondities		Consult attended documents Begleitdokumente beachten Consultare i documenti relativi Consultar documentos adjuntos Consulter le document avec attention A csatolt dokumentumok tanulmányozandók Dodatkowe dokumenty Συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα έντυπα Raadpleeg bijgevoegde documenten

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Art-Nr.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
HybriDetect 2T Dipsticks: Membran beschichtet mit Biotin-Liganden und polyklonalen (Ziege) anti-Digoxigenin-Antikörpern, polyklonaler (Kaninchen) anti-FITC-Antikörper im Goldkonjugat	MGDS2	2 x 50 Stück (blaue Laminierung)	gebrauchsfertig	2 – 8 °C Vorratsgefäß verschlossen halten (Feuchtigkeitschutz)!	bis zum Verfallsdatum
HybriDetect 2T Laufpuffer (HybriDect 2T Assay Buffer): Tris-gepufferte Salzlösung	MGCB2	2 Fl. à 10 ml (gelber Deckel)	gebrauchsfertig	2 – 8 °C	bis zum Verfallsdatum

Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich (siehe auch unter www.milenia-biotec.de).

Erforderliche Materialien

- Pipetten
- Pipettenspitzen (mit Kontaminationsschutz für PCR)
- Reaktionsgefäße oder eine 96-well Mikrotiterplatte

Nötige Entwicklungsarbeiten - Entwicklungsplattform

Entwicklung zweier Lösungen (A und B), die jeweils zwei verschieden markierte Detektoren für den gesuchten Analyten enthalten.

Es gelten folgende Rahmenbedingungen:

- 1) **Lösung A:** Detektoren müssen markiert werden mit:
 - FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)
 - Biotin
- 2) **Lösung B:** Detektoren müssen markiert werden mit:
 - FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)
 - Digoxigenin
- 3) Im Testsystem kann ca. 100 µl Flüssigkeit eingesetzt werden (Probe + Analyt-spezifische Lösungen, A und B).
- 4) Der im Kit enthaltene Puffer (MGCB2) kann als Basis für diese Analyt-spezifischen Lösungen verwendet werden.

Anwendungsbeispiel:

20 µl Probe und 80 µl Analyt-spezifische Lösungen bei 5-minütiger Inkubation.

Wichtig:

Volumina, Analyt-spezifische Lösung und Inkubationszeit sind Teil der individuellen Testentwicklung!

Eine Basis-Anleitung für den Nachweis von Gen-Amplifikaten ist unter „Testdurchführung PCR-Produkte“ auf Seite 15 beschrieben. Hierbei sollte das Amplifikationsprodukt biotinyliert und die spezifische Hybridisierungssonde mit FITC markiert sein. Im Prinzip können alle Amplifikationsmethoden (Polymerase-Kettenreaktion oder isothermale Amplifikationen wie LAMP oder RPA) eingesetzt werden.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Die Lagerung der Reagenzien sollte bei 2 – 8 °C in den Originalverpackungen erfolgen.
- Vor der Verwendung sind die erforderlichen Reagenzien auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) zu bringen.
- Die angegebenen Verfallsdaten aller Komponenten sind zu beachten.
- Die Dipsticks sind empfindlich gegenüber Feuchtigkeit; Vorratsgefäß immer verschlossen halten.
- Nur die mit Folie bedeckten Bereiche des Dipsticks (Schriftfeld) berühren und beschriften

Die Puffer dieses Testkits enthalten ein Konservierungsmittel zum Schutz gegen mikrobielles Wachstum; daher ist die Berührung mit der Haut und/ oder Schleimhäuten zu vermeiden.

Methodik

Milenia® HybriDetect 2T ist ein gebrauchsfertiger, universeller Teststreifen (Dipstick), welcher auf der Lateralfuss-Technologie mittels Goldpartikeln basiert. Der Dipstick kann zur Entwicklung von qualitativen oder quantitativen Schnelltest-Systemen für den gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Analyten wie Proteinen, Antikörpern oder Gen-Amplifikaten (z.B. PCR-Produkt und interne PCR-Kontrolle) verwendet werden. Der Anwender muss dazu zwei Analyt-spezifische Lösungen entwickeln. Es gelten folgende Rahmenbedingungen:

Lösung A / Analyt A: Ein Detektor (z.B. Antikörper, Antigen, Gensonde) wird FITC markiert, der zweite Detektor (z.B. Antikörper, Primer) mit Biotin.

Lösung B / Analyt B: Ein Detektor wird FITC markiert, der zweite Detektor mit Digoxigenin (s. „Allgemeines Testprinzip“ Seite 13).

Die zu untersuchende Probe wird mit den entwickelten Analyt A- und B-spezifischen Pufferlösungen gemischt und der Dipstick dann in die Lösung gestellt

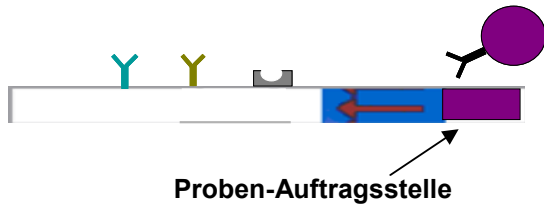
Der Analyt A-Komplex, markiert mit FITC und Biotin, bindet an die mit Gold-markierten FITC-spezifischen Antikörper im Probenauftrag des Dipsticks, genauso bindet der Analyt B-Komplex, markiert mit FITC und Digoxigenin, an die mit Gold-markierten FITC-spezifischen Antikörper. Durch Kapillarkräfte diffundieren die Gold-Komplexe A und B über die analytische Membran. Bei Überströmen des an der Testbande A immobilisierten Biotin-Liganden werden nur die mit Analyt-A gekoppelten Goldpartikel gebunden und bilden mit zunehmender Testzeit eine rot-blaue Testbande A. Bei Überströmen der an der zweiten Testbande B immobilisierten anti-Digoxigenin-Antikörpern werden nur die mit Analyt-B gekoppelten Goldpartikel gebunden und bilden mit zunehmender Testzeit eine rot-blaue Testbande B. Nicht abgefangene Goldpartikel überströmen die Kontrollbande und werden dort durch Spezies-spezifische Antikörper gebunden. Mit zunehmender Testzeit wird dort die Ausbildung einer intensiv gefärbten Kontrollbande beobachtet.

Zusätzlich verfügbare Produkte

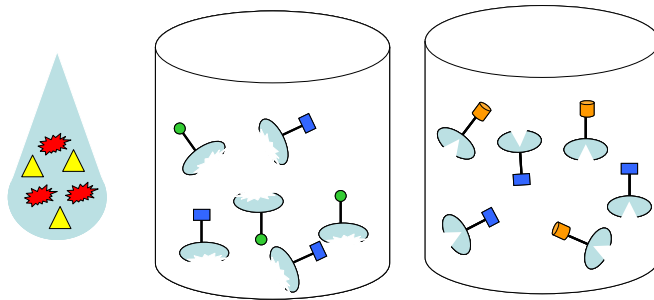
Produktname	Bestell-Nr.	Inhalt	Beschreibung
Milenia® HybriDetect	MGHD 1	100 Tests	Dipsticks mit einer Testbande
Milenia® HybriDetect HS	MGHT 1	40 Tests	Teststreifen mit einer Testbande in einem Plastikgehäuse
Milenia® POCScan Reader	MSCAN 1	1 Gerät	Auswertegerät für HybriDetect Produkte
Milenia® HybriDetect Software	MGSW	1 CD	Software zur Dokumentation und/oder Quantifizierung der Ergebnisse
Milenia® Carrier	MGCA 1	15 Stück	Halterung zum Einlegen von Milenia® Dipsticks in den Milenia® POCScan Reader

Allgemeines Testprinzip

1) Gebrauchsfertiger (Analyt-unabhängiger) Dipstick



2) Zugabe von Probe, bzw. Analyt A- und B-spezifischer Lösung

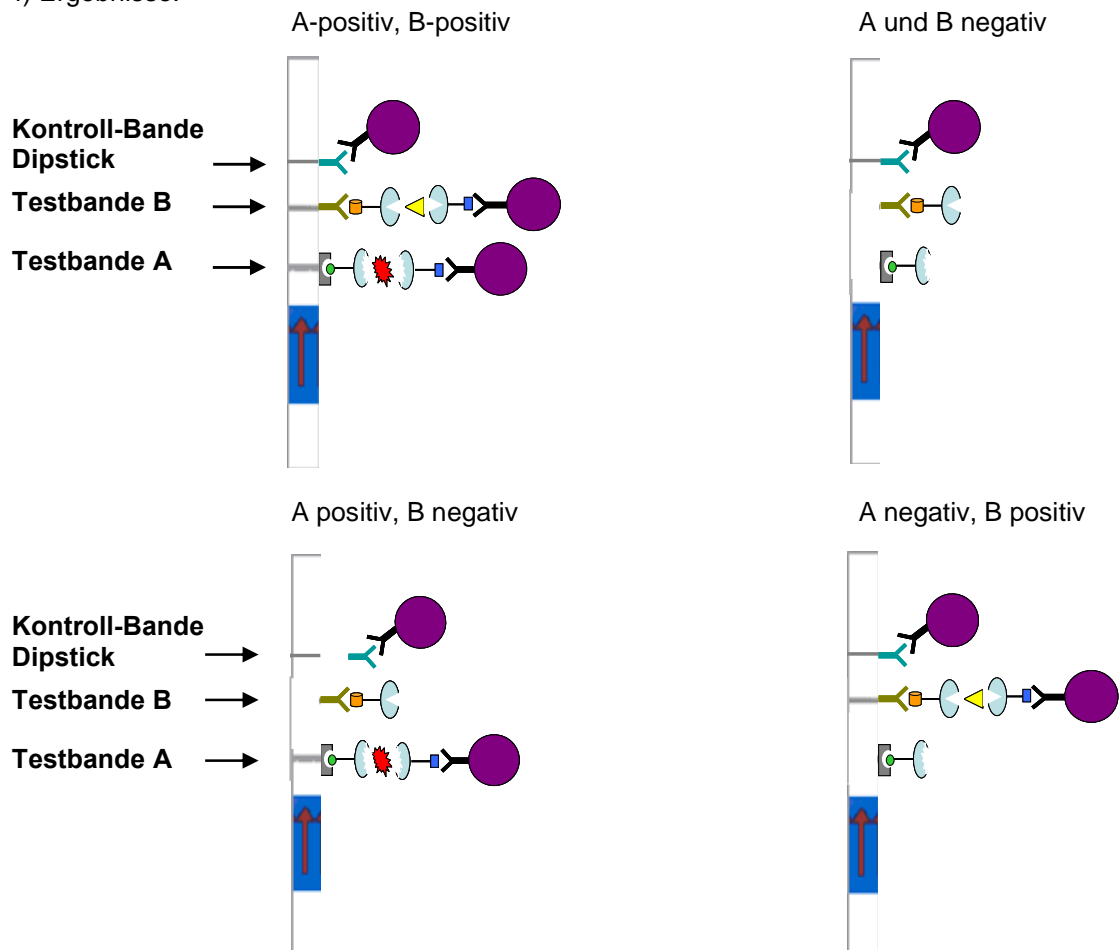


Symbole:

	FITC
	Biotin
	Digoxigenin
	Goldpartikel
	anti-FITC Antikörper
	Analyt A Detektor 1 + 2
	Analyt A (Protein, Antikörper, Genamplifikate)
	Analyt B Detektor 1 + 2
	Analyt B (Protein, Antikörper, Genamplifikate)
	Biotin-Ligand
	anti-Digoxigenin Antikörper
	anti-Kaninchen Antikörper

3) Inkubation

4) Ergebnisse:



Kontroll-Bande Dipstick

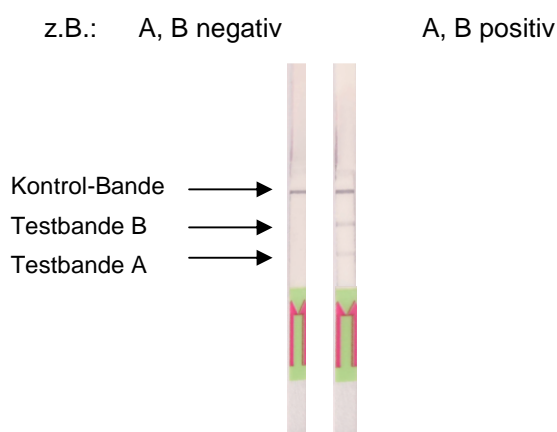
Die Kontroll-Bande muss immer sichtbar werden!

Sie dient als Funktionskontrolle und kann nicht zur Beurteilung der Testbande herangezogen werden. Wenn die Kontroll-Bande nach der Inkubationszeit nicht sichtbar ist, ist das Ergebnis ungültig! Der Test muss mit einem neuen Dipstick wiederholt werden!

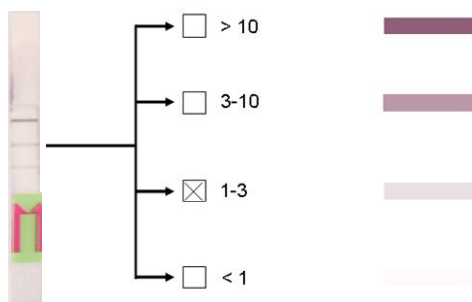
Auswertung der Ergebnisse

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten die Milenia® HybriDetect 2T Dipstick-Ergebnisse auszuwerten:

1) Qualitativ : visuelle Auswertung



2) Semi-quantitativ mit Auswertekarte

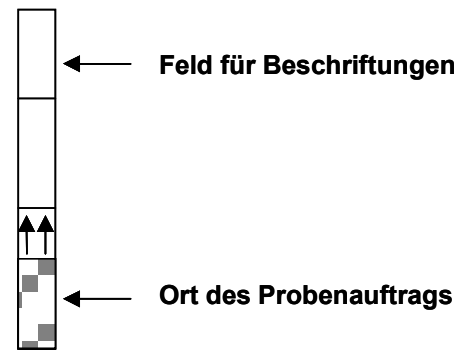


3) Quantitative Auswertung mittels Milenia® POCScan Reader und dazugehöriger Software



Testdurchführung „PCR Produkte“

1. Die erforderliche Anzahl Dipsticks aus dem Röhrchen nehmen und beschriften.
2. Für jede zu untersuchende Probe **100 µl** HybriDetect Puffer bzw. individuell entwickelten Puffer in einzelne Reaktionsgefäße oder in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorlegen.
3. **5 – 10 µl** des Hybridisierungsansatzes direkt auf den Probenauftrag pipettieren oder
alternativ: **5 – 10 µl** des Hybridisierungsansatzes zu der Lösung im Reaktionsgefäß / in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettieren.
4. Dipsticks mit dem Probenauftrag in die Lösung stellen und z.B. **5 - 15 Minuten** aufrecht stehend inkubieren.
5. Nach Ablauf der Testzeit die Dipsticks aus der Lösung nehmen und auswerten.



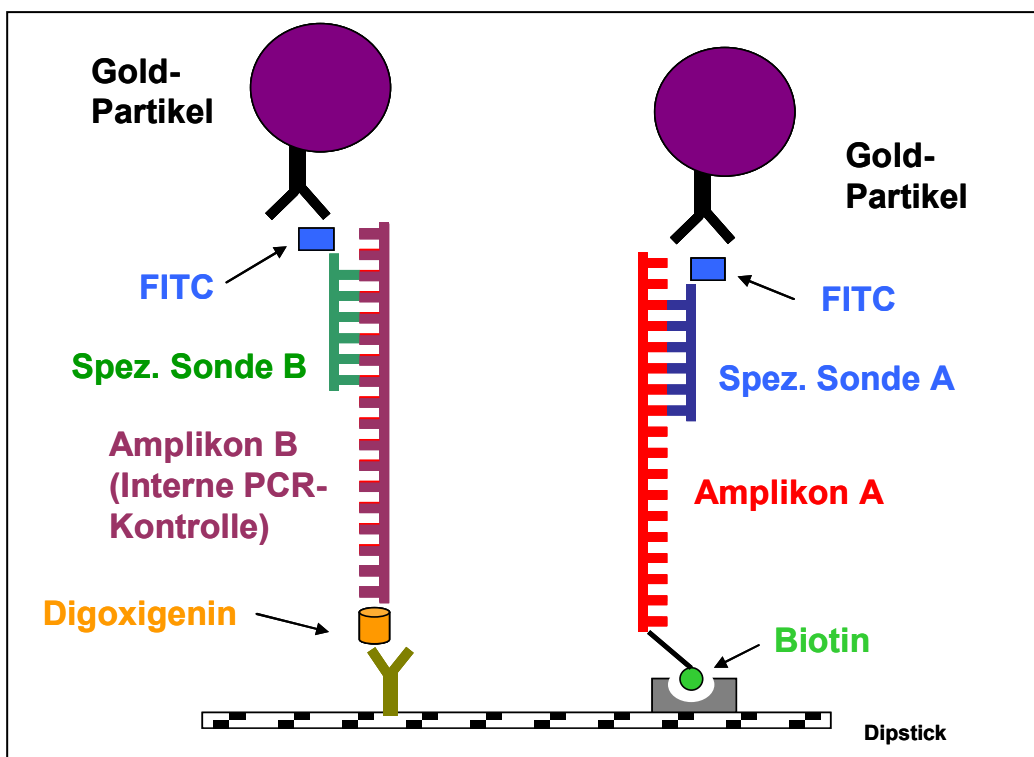
Hinweise:

- Für eine höhere Nachweisempfindlichkeit des Tests kann es hilfreich sein, ein größeres Volumen des PCR-Produktes einzusetzen.
- Volumina, Pufferlösungen und Inkubationszeit sind immer Teil der individuellen Testentwicklung!

Interpretation der „PCR“-Ergebnisse

Verwendung mit interner PCR-Kontrolle:

Während das Biotin-markierte **Amplikon A** hauptsächlich für den spezifischen Nachweis einer bestimmten Zielsequenz verwendet wird, ist das Digoxigenin-markierte **Amplikon B** als interne PCR-Kontrolle vorgesehen.



Testbande A	Testbande B	Kontrollbande	Interpretation
positiv	positiv	positiv	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrollbande ist positiv, gültiger Testlauf • Amplikon A ist nachweisbar (positiv) • interne PCR-Kontrolle (Amplikon B) ist positiv
negativ	positiv	positiv	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrollbande ist positiv, gültiger Testlauf • Amplikon A ist nicht nachweisbar (negativ) • interne PCR-Kontrolle (Amplikon B) ist positiv
positiv	negativ	negativ	<ul style="list-style-type: none"> • Testläufe sind ungültig, da Kontrollbande nicht nachweisbar ist • Testläufe wiederholen
negativ	positiv		
negativ	negativ		
negativ	negativ	positiv	<ul style="list-style-type: none"> • Testläufe sind ungültig • Schnelltest ist ordnungsgemäß entwickelt, da die Kontrollbande positiv ist • Amplifikationsreaktionen sind nicht ordnungsgemäß verlaufen (Amplikon B ist nicht nachweisbar) • Amplifikationsreaktionen wiederholen
positiv			

Fehlerquellen und Lösungen „PCR“

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
Es ist keine Kontrollbande sichtbar.	a) falscher oder nicht mehr funktionsfähiger Assaypuffer b) Haltbarkeit der Dipsticks überschritten c) falsche Lagerung der Dipsticks	Neue Chemikalien verwenden
Mit dem Teststreifen wird ein negatives Ergebnis erhalten, aber auf einem Agarosegel ist eine Bande sichtbar.	a) Die Bande auf dem Gel resultiert von einem unspezifischen PCR-Produkt b) Die Hybridisierung war nicht erfolgreich	PCR-Produkt auf Identität überprüfen (z. B. Southern Blot oder Sequenzierung) Hybridisierungsbedingungen überprüfen.
Mineralöl	a) Mineralöl verändert die Fließeigenschaften des Testsystems. b) Die Entwicklung der Banden könnte verlangsamt oder verhindert sein.	PCR-Produkt langsam vom Boden des Reaktionsgefäßes pipettieren.

Testsensitivität „PCR“

Die analytische Sensitivität des Milenia® HybriDetect 2T entspricht derjenigen eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels. Abhängig von der Größe des PCR-Produktes sowie der Zahl der durchgeführten Amplifikationszyklen können bis zu 5 pg DNS nachgewiesen werden.

Literatur-Referenzen

- Kiatpathomchai W, et al, J Virol Methods (2008); 153: 214-217
 Puthawibool T, et al, J Virol Methods (2009); 156 (1-2): 27-31
 Jaroenram W, et al, Mol Cell Probes (2009); 23 (2): 65-70
 Nimitphak T, et al, Mol Cell Probes (2009); 24 (1): 1-5
 Kikuchi T, et al, Nematology (2009) ; 99 (12): 1365-1369
 Piepenburg O, et al, PloS Biology 2006, Volume 4, Issue 7, e204