

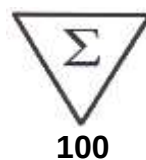
HybriDetect

Universal lateral flow dipstick for detection of biotin- and FITC-labeled analytes (proteins, genomic amplicates); development platform
English: Page 1-8
Revision: Page 17

Universeller Lateralfluss-Dipstick zum Nachweis von Biotin- und FITC-markierten Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate); Entwicklungsplattform
Deutsch: Seite 9-16
Revision: Seite 17

REF:

MGHD 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>



Explanation of Symbols

Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung	Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung
	Expiry date Haltbarkeitsdatum		Package size Packungsgröße
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum		Manufacturer Hersteller
	Batch code Los-Bezeichnung		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung
REF	Catalogue number Artikel-Nummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten
	Storage conditions Lagerungsbedingungen		Consult attended documents Begleitdokumente beachten

Note: Significant changes are indicated by dotted lines in the margin.
In the end of the IFU you will find a table with causes of changes.

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 disposal of waste materials must be carried out according to current local regulations.
- The assay buffer contains an anti-microbial reagent; therefore avoid contact with skin and/or mucous membranes.
- For professional users

Materials Supplied, Storage and Stability

Components	Cat.-No.	Content	Preparation	Storage	Shelf Life
HybriDetect Dipsticks: Membrane coated with biotin-ligand; polyclonal (rabbit) anti-FITC antibody in gold conjugate	MGDS	2 x 50 tests (green lamination)	Ready-to use	2 –8°C; Container must be always closed (moisture protection)!	until expiry date
HybriDetect Assay Buffer: Tris-buffered saline	MGCB	2 vials à 10 mL (red 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 a solution, containing two different labeled detectors for the analyte.

Following conditions are necessary:

- 1) Detectors must be labeled with:
 - FITC (fluorescein isothiocyanate)
 - Biotin
- 2) Use about 100 µL fluid (sample material and analyte-specific solution) for the assay procedure.
- 3) The provided buffer (MGCB) may be used as a basic for this analyte-specific solution.

Example of use:

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

Notice:

Volumes, analyte-specific solution, 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". The amplification product should be biotinylated and the specific hybridization probe should be FITC labeled. In principle all amplification procedures (Polymerase Chain Reaction or isothermal amplifications like LAMP or RPA) can be used.

Method

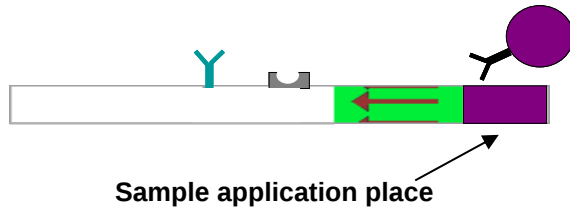
Milenia® HybriDetect is a ready-to-use, universal test strip (dipstick), which bases on the lateral flow technology using gold particles. The dipstick is designed to develop qualitative or quantitative rapid test systems for several analytes such as proteins, antibodies, or gene amplifications. The user needs to develop an analyte-specific solution, which contains a first detector (e.g. antibody, antigen, specific probe) labeled with FITC and a second one (e.g. antibody, primer) labeled with biotin, (see “Common Testprinciple” on page 5).

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

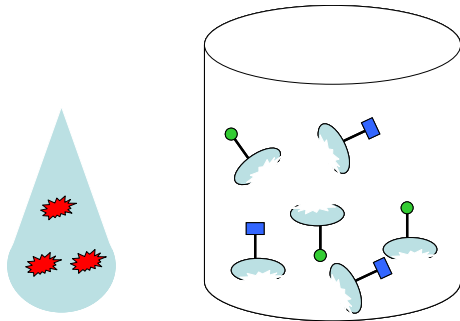
The complexed analyte, labeled with FITC and biotin, binds first to the gold-labeled FITC-specific antibodies in the sample application area of the dipstick. By capillarity the gold complexes diffuse over the membrane. Only the analyte captured gold particles will bound when they overflow the immobilized biotin-ligand molecules at the test band 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.

Common Testprinciple

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

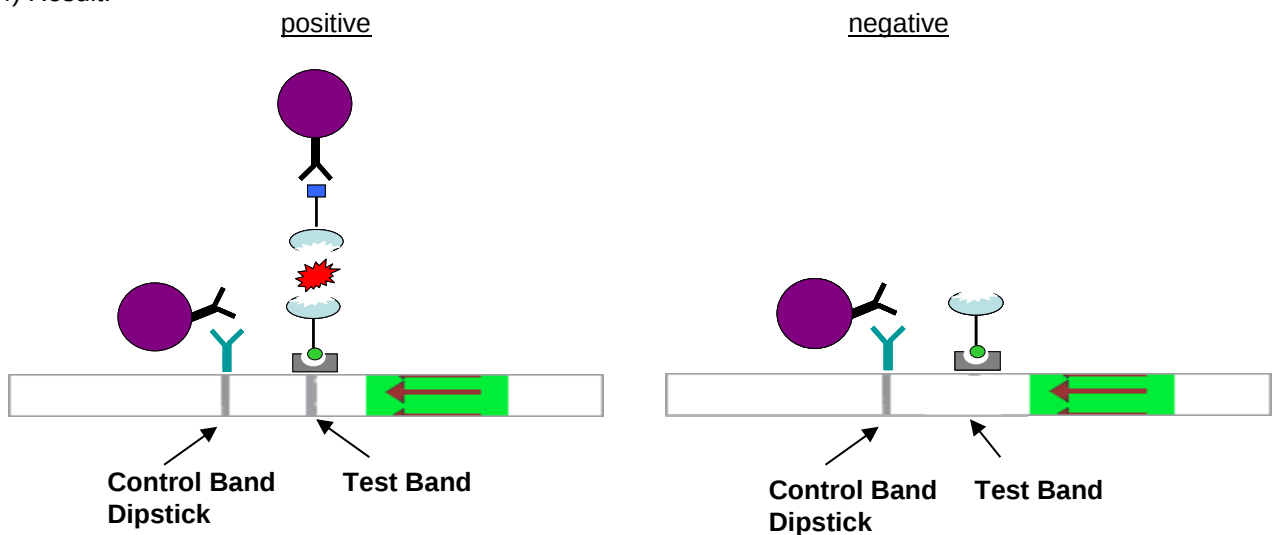


2) Addition of sample and analyte-specific solution



3) Incubation

4) Result:



Symbols:

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

Control Band Dipstick

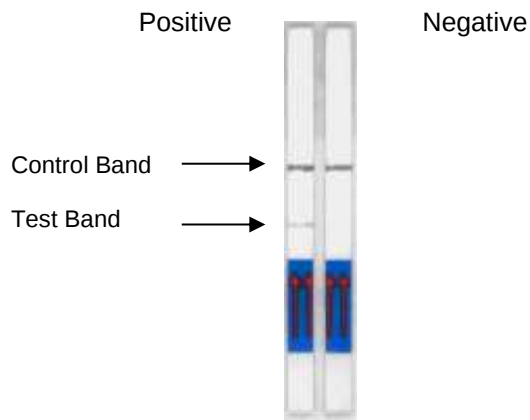
In any case, the control band must be always visible!

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 Milenia® HybriDetect dipstick results:

1) Qualitative by visual interpretation



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

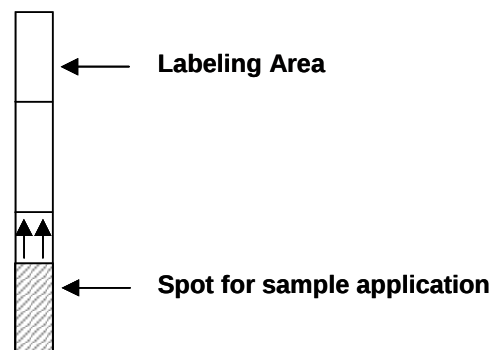


3) Quantitative with the Milenia® POCScan Reader and appropriate software



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.

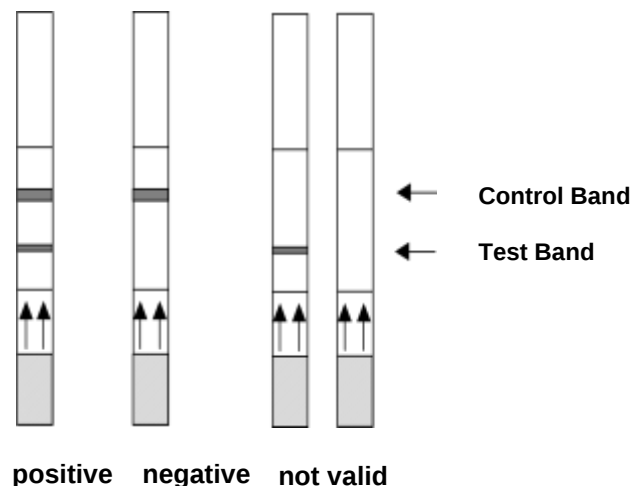


Notice:

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

Interpretation of „PCR“ Results

1. Test band <u>and</u> control band are clearly formed red bands Notes: 1.1 Weakly stained test bands have to be regarded as positive also. 1.2 Positive results may be visible during 1-2 minutes. 1.3 In case of very high concentrations of hybridization product, control band's intensity may be affected. Nevertheless, the control band should be still visible clearly.	The PCR amplicon was detected (positive) .
2. Only control band is visible as red line.	No PCR amplicon was detected (negative) .



Important note:

To check specificity of the reaction the introduction of a PCR negative control is strongly recommended.

Trouble Shooting „PCR“

Problem	Possible cause(s)	Recommendation
Control band is not visible.	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	a) detection of an unspecific PCR product in agarose gel b) hybridization was not successful	Check identity of PCR product by Southern blotting oder sequence analysis Check conditions of hybridization.
Mineral oil	a) mineral oil affects flow characteristics of the assay b) development of test 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 is equivalent to an Ethidium Bromide stained agarose gel. Dependent on the size of the PCR product and the number of amplification cycles up to 5 pg DNA can 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

Additional Available Products

Product Name	Order No.	Content	Description
Milenia [®] HybriDetect HS	MGHT 1	40 tests	Test strips with one test band (in a housing)
Milenia [®] HybriDetect 2T	MGHD2 1	100 tests	Dipsticks with two different test bands (as third labeling with digoxigenine is required)
Milenia [®] POCScan Reader	MSCAN 1	1 device	Interpretation device for HybriDetect products
Milenia [®] HybriDetect Software	MGSW	1 CD	Software for documentation and/or quantification of results
Milenia [®] Carrier	MGCA 1	15 pieces	Holder for insertion of Milenia [®] Dipsticks in the Milenia [®] POCScan Reader

HybriDetect

Universal lateral flow dipstick for detection of biotin- and FITC-labeled analytes (proteins, genomic amplicates);
development platform
English: Page: 1-8
Revision: Page: 17

**Universeller Lateralfuss-Dipstick zum Nachweis von Biotin- und FITC-markierten Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate);
Entwicklungsplattform
Deutsch: Seite: 9-16
Revision: Seite: 17**

REF:

MGHD 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>



MGHD / B / 2013-01-10

Erklärung der Symbole

Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung	Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung
	Expiry date Haltbarkeitsdatum		Package size Packungsgröße
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum		Manufacturer Hersteller
	Batch code Los-Bezeichnung		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung
REF	Catalogue number Artikel-Nummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten
	Storage conditions Lagerungsbedingungen		Consult attended documents Begleitdokumente beachten

Hinweis: Signifikante Änderungen sind mit einer gepunkteten Linie am Rand gekennzeichnet. Eine Änderungshistorie befindet sich am Ende der Packungsbeilage

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
- Der Puffer dieses Testkits enthält ein Konservierungsmittel zum Schutz gegen mikrobielles Wachstum; daher ist die Berührung mit der Haut und/ oder Schleimhäuten zu vermeiden.
- Die Abfallentsorgung muss gemäß den örtlichen Bestimmungen durchgeführt werden.
- Für Fachpersonal

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Art-Nr.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
HybriDetect Dipsticks: Membran beschichtet mit Biotin-Ligand, polyklonaler (Kaninchen) anti-FITC-Antikörper im Goldkonjugat	MGDS	2 x 50 Stück (grüne Laminierung)	gebrauchsfertig	2 – 8 °C Vorratsgefäß verschlossen halten (Feuchtigkeitschutz)!	bis zum Verfallsdatum
HybriDetect Puffer (HybriDetect Assay Buffer): Tris-gepufferte Salzlösung	MGCB	2 Fl. à 10 ml (roter 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 einer Lösung, die zwei verschieden markierte Detektoren für den gesuchten Analyten enthält.

Es gelten folgende Rahmenbedingungen:

- 1) Detektoren müssen markiert werden mit:
 - FITC (Fluoresceinisothiocyanat)
 - Biotin
- 2) Im Testsystem kann ca. 100 µl Flüssigkeit eingesetzt werden (Probe + Analyt-spezifische Lösung).
- 3) Der im Kit enthaltene Puffer (MGCB) kann als Basis für diese Analyt-spezifische Lösung verwendet werden.

Anwendungsbeispiel:

20 µl Probe und 80 µl Analyt-spezifische Lösung 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.

Methodik

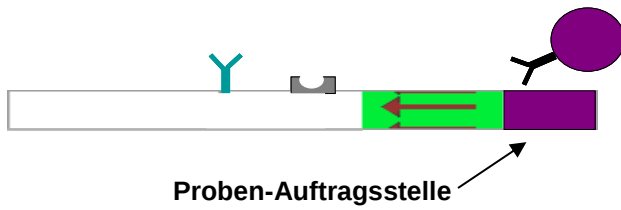
Milenia® HybriDetect ist ein gebrauchsfertiger, universeller Teststreifen (Dipstick), welcher auf der Lateralfuss-Technologie mittels Goldpartikeln basiert. Der Dipstick kann zur Entwicklung von qualitativen oder quantitativen Schnelltest-Nachweissystemen für verschiedenste Analyte wie Proteine, Antikörper oder Gen-Amplifikate verwendet werden. Der Anwender muss dazu eine Analyt spezifische Lösung entwickeln, die einen ersten Detektor (z.B. Antikörper, Antigen, Gensonde) markiert mit FITC enthält sowie einen zweiten Detektor (z.B. Antikörper, Primer) markiert mit Biotin (Aufbau siehe Schemazeichnungen „Allgemeines Testprinzip“ Seite 13).

Die zu untersuchende Probe wird mit der entwickelten, Analyt-spezifischen Pufferlösung gemischt und der Dipstick dann in die Lösung gestellt.

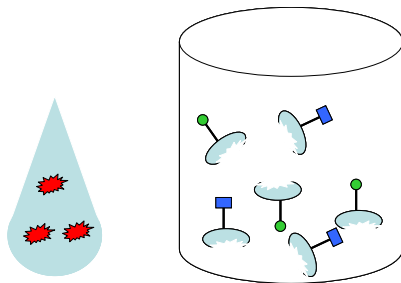
Der komplexierte Analyt, markiert mit FITC und Biotin, bindet als erstes an die mit Gold-markierten FITC-spezifischen Antikörper im Probenauftrag des Dipsticks. Durch Kapillarkräfte, diffundieren die Gold-Komplexe über die Membran. Beim Überströmen des an der Testbande immobilisierten Biotin-Liganden werden nur die an den Analyt gekoppelten Goldpartikel gebunden und bilden mit zunehmender Testzeit eine rot-blaue Testbande. Nicht abgefangene Goldpartikel überströmen die Kontrollbande und werden dort durch Spezies-spezifische Antikörper gebunden. Mit zunehmender Testzeit wird die Bildung einer intensiv gefärbten Kontrollbande beobachtet.

Allgemeines Testprinzip

1) Gebrauchsfertiger universeller Dipstick (Analyt-unabhängig)

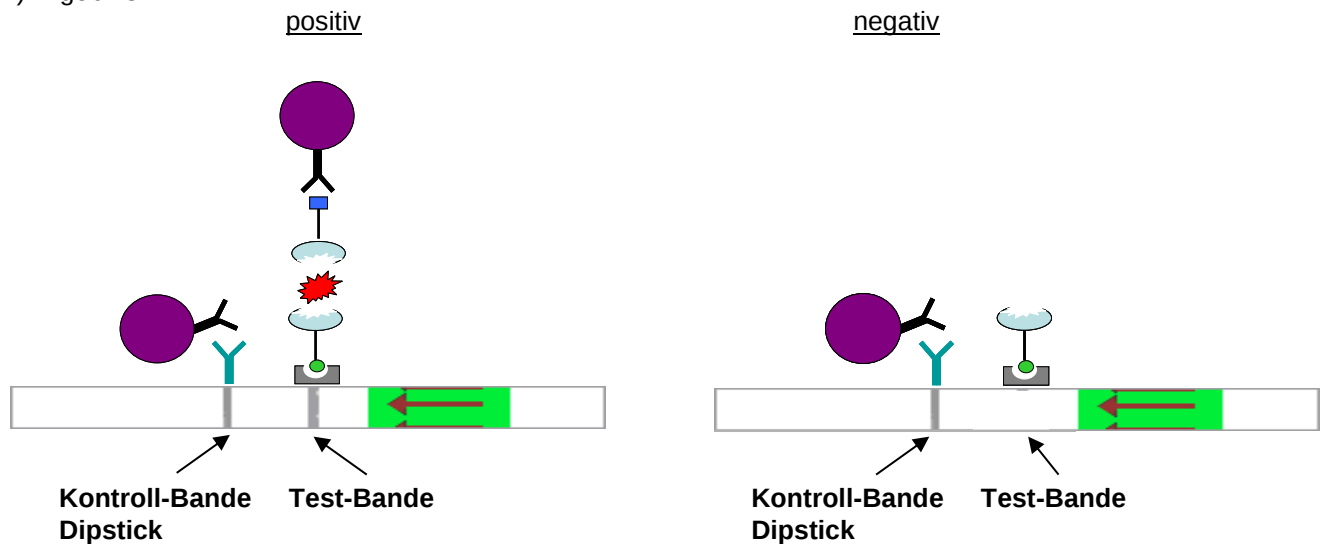


2) Zugabe von Probe und Analyt-spezifischer Lösung



3) Inkubation

4) Ergebnis:



Symbole:

	FITC
	Biotin
	Goldpartikel
	anti-FITC-Antikörper
	anti-Kaninchen-Antikörper
	Analyt-Detektor 1 + 2
	Analyt (Protein, Antikörper, genetisches Amplifikat)
	Biotin-Ligand

Kontroll-Bande Dipstick

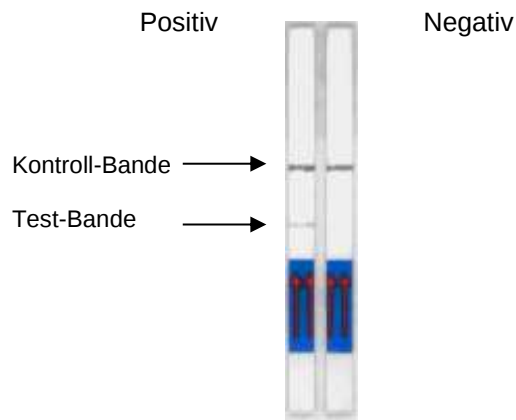
Die Kontroll-Bande muss immer sichtbar werden!

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 Dipstick-Ergebnisse auszuwerten:

1) Qualitativ mittels visueller Auswertung



2) Semi-quantitativ, z. B. mit Auswertekarte

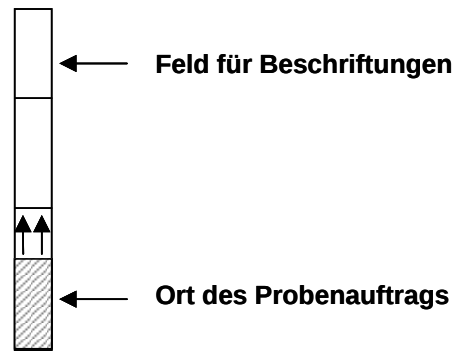


3) Quantitativ mittels Milenia® POCScan Reader und dazugehöriger Software



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 der 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.

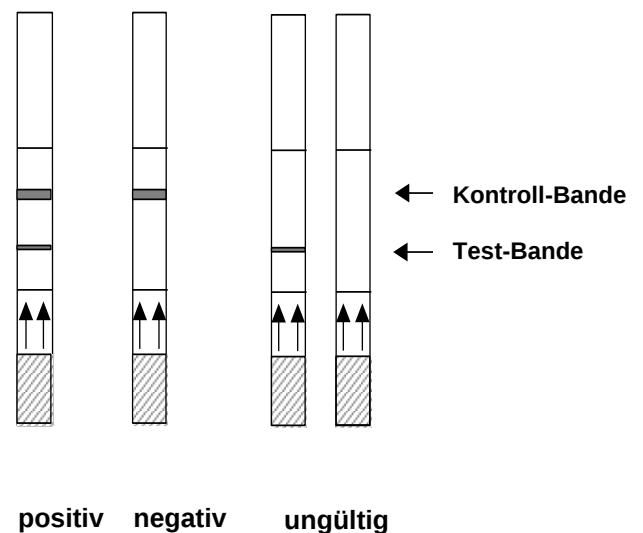


Hinweise:

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

Interpretation der „PCR“-Ergebnisse

1. Testbande <u>und</u> Kontrollbande sind sichtbar. <u>Achtung:</u> 1.1 Auch eine schwach gefärbte Test-Bande ist als positiv zu werten. 1.2 Positive Resultate können bereits nach 1-2 Minuten sichtbar werden. 1.3 Bei sehr hoher Konzentration des Hybridisierungsproduktes kann die Intensität der Kontrollbande deutlich verringert sein. Allerdings muss die Kontrollbande immer noch klar sichtbar sein.	Das Amplifikationsprodukt ist nachweisbar (positiv) .
2. Nur die Kontrollbande ist sichtbar.	Das Amplifikationsprodukt ist nicht nachweisbar (negativ) .



Achtung:

Um die Spezifität der Reaktionen im Milenia® HybriDetect zu überprüfen, wird die Verwendung einer PCR-Negativkontrolle empfohlen.

Fehlersuche „PCR“

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
Es ist keine Kontroll-Bande sichtbar.	a) falsche oder nicht mehr funktionsfähige Lösung 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 auf dem Dipstick verlangsamt oder behindert die Entwicklung.	PCR-Produkt langsam vom Boden des Reaktionsgefäßes pipettieren.

Testsensitivität „PCR“

Die analytische Sensitivität des Milenia® HybriDetect 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

Zusätzlich verfügbare Produkte

Produktname	Bestell-Nr.	Inhalt	Beschreibung
Milenia® HybriDetect HS	MGHT 1	40 Tests	Teststreifen mit einer Testbande in einem Plastikgehäuse
Milenia® HybriDetect 2T	MGHD2 1	100 Tests	Dipsticks mit zwei verschiedenen Testbanden (als dritte Markierung ist Digoxigenin nötig)
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

Date/ Datum	Revision	Cause of Revision/ Änderungsgrund
10.01.2013	MGHD / B / 2013-01-10	Symbols adapted according DIN EN ISO15223 Symbole gemäß DIN EN ISO15223 angepasst