

Instructions d'utilisation RTP® Pathogen Kit



REF 1040500200
1040500300



50 préparations
250 préparations



Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
Allemagne

INVITEK
Molecular

Remarques importantes :

Merci d'avoir acheté le dispositif médical **RTP® Pathogen Kit** de la société Invitek Molecular.

Ce produit est conçu pour procéder à l'isolation manuelle d'acides nucléiques (ADN bactérien, ADN/ARN viral) à partir d'une grande diversité d'échantillons cliniques utilisant la technologie des colonnes de centrifugation.

AVERTISSEMENT ! Une manipulation incorrecte et une utilisation non conforme à l'usage prévu peuvent engendrer des risques et des dommages. Nous vous demandons par conséquent de bien vouloir lire le présent mode d'emploi dans son intégralité, et de l'appliquer scrupuleusement. Veuillez toujours le conserver à portée de la main. Afin d'éviter des dommages corporels, veuillez également respecter les consignes de sécurité.

Vous trouverez toutes les versions du mode d'emploi sur notre site Internet à des fins de téléchargement ou vous pouvez demander à les obtenir de notre part à l'adresse Internet suivante : www.invitek-molecular.com

Contact :

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (Allemagne)

+ 49 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Assistance technique :

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular, tous droits réservés

Le kit est conforme au RÈGLEMENT (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux diagnostics in vitro. Mais le kit n'est pas destiné à une utilisation de diagnostic in vitro dans les pays où le RÈGLEMENT (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux diagnostics in vitro n'est pas reconnu.

Marque déposées : Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. Même si elles ne sont pas spécialement désignées comme telles, les marques enregistrées, les marques déposées, etc. utilisées dans le présent document ne doivent pas être considérées comme étant non protégées par la loi.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® sont des marques enregistrées de la société Invitek Molecular GmbH.

Sommaire

1.	Consignes de sécurité	3
2.	Informations sur le produit	4
2.1	Contenu du kit	4
2.2	Réactifs et équipements devant être fournis par l'utilisateur	5
2.3	Entreposage, apparence et durée de vie	5
2.4	Utilisation prévue	6
2.5	Informations sur le produit et spécifications	6
2.6	Principe et procédure	7
3.	Extraction d'acides nucléiques effectuée au moyen du dispositif médical RTP® Pathogen Kit	8
3.1	Avant de lancer un protocole	8
3.2	Échantillonnage et entreposage de matières premières	9
3.3	Préparation de matières premières	10
3.3.1	Sérum, plasma et autres liquides corporels exempts de cellules	10
3.3.2	Écouvillons	10
3.3.3	Échantillons de selles (surnageant)	11
3.3.4	Bactéries cultivées	11
3.3.5	Urine	11
3.3.6	Sécrétions trachéales, LBA, crachats	11
3.3.7	Biopsies de tissus	12
3.3.8	Surnageants de cultures cellulaires	12
3.4	Protocole court RTP® Pathogen	13
3.5	Protocole : Isolation simultanée de ADN bactérien et d'ADN/ARN viral à partir d'échantillons liquides	14
4.	Annexe	15
4.1	Résolution de problèmes	15
4.2	Garantie	16
4.3	Symboles utilisés sur les produits et étiquetage	16
4.4	Documents et informations supplémentaires	17
4.5	Informations sur les commandes	17

1. Consignes de sécurité

Veillez à ce que toute personne qui utilise ce produit ait pris connaissance des instructions portant sur les pratiques de sécurité générales applicables aux laboratoires et des informations de sécurité contenues dans le présent document.

- Lorsque et pendant que vous travaillez avec des produits chimiques, vous devez toujours porter des vêtements de protection, des gants jetables et des lunettes de sécurité.
- Changez toujours les pointes de pipettes entre les transferts de liquides. En vue d'éviter une contamination croisée, nous recommandons d'utiliser des embouts de filtres.
- Ne réutilisez pas des consommables.
- Jetez les gants si ceux-ci sont contaminés.
- Ne combinez pas les composants de différents kits, à moins que les numéros de lots soient identiques.
- Évitez une contamination microbienne des réactifs de kit.
- Afin de diminuer le risque d'infections émanant de matériels potentiellement infectieux, nous recommandons de travailler sous un caisson d'air laminaire jusqu'à ce que les échantillons soient lysés.

Avant de manipuler des produits chimiques, veuillez lire et comprendre l'ensemble des fiches de données de sécurité (MSDS). Celles-ci sont disponibles en ligne à l'adresse Internet suivante : www.invitek-molecular.com.

Pour ce qui concerne l'élimination de résidus de kits et de déchets liquides conformément aux règlements/réglementations de votre pays, veuillez également vous reporter aux MSDS. La société Invitek Molecular n'a pas testé les déchets liquides générés par le kit quant à la présence de matériels infectieux résiduels. La contamination de déchets liquides par des matériels infectieux résiduels est hautement improbable, mais ne peut être entièrement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme étant infectieux, et doivent être manipulés et éliminés conformément aux règlements/réglementations de sécurité locaux.

Les normes relatives aux risques et à la sécurité de la Communauté européenne applicables aux composants du dispositif médical **RTP® Pathogen Kit** auquel elles s'appliquent sont énumérées ci-dessous :

Extraction Tube



Avertissement

H302-H315-H319-H335-H411-P280-
P305+P351+P338-EUH208

Wash Buffer R1



Avertissement

H302-H332-H412-P280-P305+P351+P338-
EUH032

H302 : Nocif en cas d'ingestion

H315 : Provoque une irritation cutanée.

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

H332 : Nocif par inhalation.

H335 : Peut irriter les voies respiratoires.

H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

EUH208 : Contient de la protéinase, du tritirachium album sérine. Est susceptible de provoquer une réaction allergique.

EUH032 : Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

On peut obtenir des informations médicales d'urgence 24 h/24 auprès d'infotrac, www.infotrac.net :

en dehors des États-Unis : 1 – 352 – 323 – 3500

aux États-Unis : 1 – 800 – 535 – 5053

2. Informations sur le produit

2.1 Contenu du kit

	50 purifications	250 purifications
N° de catalogue	1040500200	1040500300
Extraction Tube	50 flacons	5 x 50 flacons
Resuspension Buffer R	30 ml/bouteille	150 ml/bouteille
Binding Solution (remplir avec de l'isopropanol à 99,7%)	bouteille vide (volume final 30 ml)	bouteille vide (volume final 120 ml)
Wash Buffer R1	20 ml/bouteille (volume final 40 ml)	80 ml/bouteille (volume final 160 ml)
Wash Buffer R2	12 ml/bouteille (volume final 60 ml)	50 ml/bouteille (volume final 250 ml)
Elution Buffer R	15 ml/bouteille	60 ml/bouteille
RTA Spin Filter Set	50 jeux	5 x 50 jeux
RTA Receiver Tubes	3 x 50 flacons	15 x 50 flacons
1.5 ml Receiver Tubes	50 flacons	5 x 50 flacons
Short protocol	1 dépliant	1 dépliant

2.2 Réactifs et équipements devant être fournis par l'utilisateur

Équipement de laboratoire

- Microcentrifugeuse (*tous les protocoles ont été validés avec a Centrifuge 5415 D Eppendorf*)
- Centrifugeuse disponible en option pour 15 ou 50 ml
- Thermo-shaker (37° C-95° C)
- Éprouvette graduée (250 ml)
- Gants jetables
- Pipettes et pointes de pipettes
- Mélangeur vortex
- Tubes de réaction (1,5 ml ou 2,0 ml)

Liquides et solvants :

- 1 x une PBS [solution saline tamponnée au phosphate] pour ajuster le volume d'échantillons
- Éthanol 96%-100% (non dénaturé)
- Isopropanol*
- Disponible en option (pour des échantillons respiratoires présentant une viscosité élevée) : solution d'acétylcystéine saturée (ACC) (200 mg/ml)

* Le kit est validé avec 2-Propanol ; Rotipuran® > 99,7%, p.a. [pour analyse], ACS, ISO (N° de commande 6752) de Carl Roth

* Fournisseurs possibles pour l'isopropanol :

Carl Roth

2-Propanol
Rotipuran® > 99,7%, p.a., ACS, ISO
N° de commande 6752

Applichem

2-Propanol conçu pour la biologie
moléculaire
N° de commande A3928

Sigma

2-Propanol
N° de commande 59304-
1L-F

2.3 Entreposage, apparence et durée de vie

Durée de vie : l'ensemble des tampons et des composants du kit doivent être entreposés à température ambiante, leur durée de vie étant indiquée sur l'étiquette extérieure de l'emballage du kit.

Après l'ouverture, les composants individuels du kit ainsi que les composants préparés de manière correspondante avant la première utilisation ont une durée de vie de 3 mois.

Avant chaque utilisation, veillez à ce que l'intégralité des composants soit à température ambiante. Si les solutions contiennent des précipités liés à la température, veuillez les dissoudre en les faisant chauffer avec précaution (jusqu'à 30° C).

La température ambiante (TA) se situe dans une fourchette de 15° C à 30° C.

Wash Buffer R1 et Wash Buffer R2 : après avoir ajouté de l'éthanol, il faut les fermer hermétiquement et les entreposer à température ambiante.

Binding Solution : après avoir ajouté de l'isopropanol, il faut bien la fermer et l'entreposer à température ambiante.

2.4 Utilisation prévue

Le dispositif médical **RTP® Pathogen Kit** est un kit d'extraction d'acides nucléiques qui se base sur la technologie des colonnes de centrifugation, et qui est conçu pour isoler et purifier simultanément de l'ADN bactérien et de l'ADN/ARN viral.

Le kit peut être utilisé pour divers types d'échantillons humains, tels que le sérum et le plasma (à partir de sang stabilisé dans de l'EDTA ou du citrate, mais pas dans de l'héparine), le liquide rincé des écouvillons, les expectorations prétraitées, le LBA, les sécrétions trachéales, le surnageant de la suspension de selles, les bactéries cultivées, les surnageants de culture cellulaire, le matériel/tissu de biopsie, l'urine et d'autres fluides corporels exempts de cellules.

Le produit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang héparinés. Le produit est conçu pour être uniquement utilisé par des professionnels, comme des techniciens de laboratoire, des médecins et des biologistes formés aux techniques de biologie moléculaire et aux procédures de diagnostic *in vitro*.

2.5 Informations sur le produit et spécifications

Matière première	Rendement	Qualité	Durée
<ul style="list-style-type: none">• sérum, plasma, autres liquides corporels exempts de cellules, urine• écouvillons (secs, stabilisés)• surnageant provenant de suspension de selles• bactéries cultivées• sécrétions trachéales, LBA, crachats• surnageant de cultures cellulaires <p>Jusqu'à 10 mg d'échantillons de tissus</p>	En fonction de l'échantillon (entreposage et source)	En fonction du type d'échantillons, des acides nucléiques cibles	Approx. 20 min. (hors lyse)

Le rendement et la qualité d'acides nucléiques purifiés dépendent du type d'échantillons ainsi que de la source, du transport, de l'entreposage, de l'âge des échantillons et du titre du virus.

Le kit se prête uniquement à des échantillons de plasma et de sérum qui à titre d'anticoagulant contiennent de l'EDTA [acide éthylène diamine tétra-acétique] ou du citrate mais pas de l'héparine.

Pour déterminer le rendement, veuillez tenir compte du fait que les acides nucléiques purifiés avec ce kit contiennent du Carier RNA (5 µg par échantillon de 200 µl), ceci représentant la plus grande part d'acides nucléiques présents dans l'éluat. En particulier, les acides nucléiques viraux provenant de matériels d'échantillons biologiques présentent généralement une très faible concentration, ce qui par conséquent rend presque impossible de les quantifier par photométrie. Pour la détermination du rendement, on recommande la technique RT-PCR [transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase] quantitative.

Le dispositif médical **RTP® Pathogen Kit** propose une procédure efficace pour isoler des acides nucléiques de grande qualité. Le kit est conçu pour isoler simultanément de l'ADN/ARN viral et de l'ADN bactérien via un protocole de colonnes de centrifugation lyse-lier-laver-éluer.

Applications en aval :

Le rendement et la qualité des acides nucléiques isolés conviennent en général à de nombreuses applications de diagnostic moléculaire telles que les techniques PCR, NGS et les méthodes d'hybridation. Les applications en aval doivent être réalisées conformément aux spécifications des fabricants respectifs.

2.6 Principe et procédure

1. Échantillons de lyse

Le kit englobe des Extraction Tubes, ceux-ci contenant un mélange lyophilisé de Carrier RNA, de Proteinase K, d'enzymes lytiques et de Lysis Buffer en vue de réaliser une lyse d'échantillons à une étape. Pour lancer la procédure d'extraction, veuillez simplement ajouter l'échantillon au Extraction Tube.

Les échantillons sont lysés à des températures de différentes hauteurs, tout en continuant à les agiter.

2. Liaison d'acides nucléiques

En ajoutant une **Binding Solution** au lysat, on adapte des conditions de liaison optimales. Chaque lysat est ensuite appliqué à un RTA Spin Filter, et les acides nucléiques sont absorbés par la membrane.

3. Lavage destiné à éliminer des contaminations résiduelles

On élimine les contaminants de manière efficace en utilisant un Wash Buffer R1 et un Wash Buffer R2 pendant que les acides nucléiques restent attachés à la membrane.

4. Éluer les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont élués à partir du RTA Spin Filter en utilisant un Elution Buffer R de 60 à 200 µl.

3. Extraction d'acides nucléiques effectuée au moyen du dispositif médical RTP® Pathogen Kit

3.1 Avant de lancer un protocole

Lorsque vous utilisez le kit pour la première fois, veuillez vous assurer que l'ensemble des tampons et des réactifs soient préparés ainsi que cela est indiqué :

Préparations de tampons avant la première utilisation : 50 préparations
Binding Solution (bouteille vide) : Remplissez 30 ml d' isopropanol à 99,7% (qualité de biologie moléculaire) dans la bouteille, et veillez à ce que la bouteille soit toujours bien fermée.
Wash Buffer R1 : Ajoutez 20 ml d' isopropanol à 99,7% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.
Wash Buffer R2 : Ajoutez 48 ml d' éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.
Préparations de tampons avant la première utilisation : 250 préparations
Binding Solution (bouteille vide) : remplissez 120 ml d' isopropanol à 99,7% (qualité de biologie moléculaire) dans la bouteille, et veillez à ce que la bouteille soit toujours bien fermée.
Wash Buffer R1 : Ajoutez 80 ml d' isopropanol à 99,7% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.
Wash Buffer R2 : Ajoutez 200 ml d' éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.

- Ajustez le thermo-shaker à 37° C.
- Ajustez le thermo-shaker/les blocs chauffants à 65° C et 95° C
- Chauffez la quantité requise d'**Elution Buffer R** à 65° C (par échantillon, on a besoin de 60 à 200 µl d'**Elution Buffer R**).
- Déterminez le nombre de réactions requises, y compris les contrôles, et étiquetez le nombre requis de RTA Spin Filters (couvercle), et le nombre requis de Receiver Tubes 1.5 ml (par échantillon : on a besoin d'un Receiver Tube).

Contrôle d'extraction

Veuillez vous reporter aux instructions du fabricant pour déterminer la quantité optimale de contrôle d'extraction en vue de mettre en œuvre des applications en aval spécifiques.

Après l'étape du chauffage, il faut ajouter de l'ADN ou du ARN de contrôle d'extraction au lysat. En vue d'atteindre une efficacité optimale en termes de purification, il faut que les molécules du contrôle d'extraction soient plus longues que 100 nucléotides, puisque des molécules plus petites ne sont pas récupérées de manière efficace.

3.2 Échantillonnage et entreposage de matières premières

En vue d'obtenir des rendements élevés et reproductibles, un entreposage correct des échantillons est essentiel. Les rendements peuvent varier selon des facteurs comme la santé du donneur ainsi que l'âge, le type, le transport et l'entreposage des échantillons.

En vue d'éviter la dégradation d'acides nucléiques, il convient d'éviter des cycles répétés de gel-dégel des échantillons. En général, on obtient les meilleurs résultats en utilisant des échantillons frais. Il est recommandé de tenir compte de conseils techniques, comme les normes CEN/TS et ISO pour le processus d'examen préalable pour procéder à des diagnostics moléculaires, conformément au IVDR [règlement relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro] ainsi que cela est souligné chez G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Sérum, plasma et autres liquides corporels exempts de cellules : Pour l'extraction, on peut utiliser du sérum ou du plasma provenant de sang entier veineux (traité avec des anticoagulants comme EDTA ou du citrate, mais pas avec de l'héparine), d'échantillons de liquide synovial ou d'autres liquides corporels exempts de cellules. Afin d'éviter l'hémolyse, du sang entier ne doit pas être mélangé au vortex. Laissez les tubes de sérum se poser pendant au moins 30 minutes avant de procéder à la centrifugation. Veuillez respecter pour la préparation de sérum ou de plasma les instructions relatives au système de collecte de sang. On recommande de séparer le plasma et le sérum via la centrifugation en l'espace de 12 heures. Les surnageants obtenus en utilisant des systèmes sans gel séparateur doivent être transférés vers des tubes d'échantillons frais. Pour un entreposage de courte durée, les échantillons peuvent être conservés sur de la glace pendant 1 à 2 heures. Les échantillons stockés jusqu'à 24 heures peuvent être entreposés à -20° C. Pour un entreposage de longue durée, on recommande de congeler les échantillons dans des parties aliquotes à -80° C. Des cycles répétés de gel-dégel sont susceptibles d'affecter négativement l'intégrité des échantillons, et de par ex. provoquer la dénaturation/précipitation de protéines, fait qui à son tour peut aboutir à une diminution du rendement, de la qualité ou des titres viraux. En outre, des cryoprécipités qui se sont formés pendant les cycles de gel-dégel peuvent être à l'origine de problèmes. Si des cryoprécipités devaient apparaître, centrifugez à 6800 x g pendant 3 minutes. Le surnageant clair doit être immédiatement utilisé.

Écouvillons :

Écouvillons secs : préparez les échantillons ainsi que cela est décrit dans la méthode de préparation d'échantillons correspondante. Entreposez au sec entre 4° C et 8° C.

Écouvillons se trouvant dans des fluides de stabilisation : on peut manipuler le fluide de stabilisation comme un liquide corporel exempt de cellules. Veuillez tenir compte du fait qu'en raison de l'incompatibilité avec les produits chimiques utilisés dans le kit, certains agents de stabilisation peuvent faire diminuer le rendement. L'entreposage doit se faire conformément aux exigences du fabricant.

Échantillons de selles : Les échantillons contiennent des DNases et des RNases, ceux-ci pouvant rapidement mener à une dégradation de l'ADN et de l'ARN. Les échantillons doivent donc être entreposés en étant congelés à -80° C.

Bactéries cultivées : Après la mise en culture, les bactéries doivent être pastillées et remises en suspension ainsi que cela est décrit dans la méthode de préparation d'échantillons correspondante.

Urine : En fonction du titre de bactéries et de l'application, on recommande un volume de départ de 15 à 50 ml d'urine. Centrifugez l'échantillon en vue de pastiller les bactéries et d'éliminer entièrement le surnageant (des contaminations d'urée sont susceptibles d'inhiber les réactions PCR). Pour certaines applications, on peut directement utiliser de l'urine fais.

Sécrétions trachéales, LBA, crachats : les échantillons contiennent des DNases et des RNases, ceux-ci pouvant rapidement mener à une dégradation de l'ADN et de l'ARN. Les échantillons doivent donc être entreposés en étant congelés à -80° C.

Biopsies de tissus : Les échantillons doivent être immédiatement congelés et entreposés à -20° C ou -80° C. Il convient d'éviter des cycles répétés de gel-dégel. La quantité d'ADN purifié dépend du type de matière première. Dégeler l'échantillon dans un mélange de lyse.

Surnageants de cultures cellulaires : Préparez les échantillons de surnageants comme d'autres échantillons de liquides corporels exempts de cellules décrits dans la méthode de préparation d'échantillons correspondante.

3.3 Préparation de matières premières

On trouvera ci-dessous une description de la préparation de la lyse d'échantillons pour différentes matières premières.

Après la préparation de matières premières, et sauf mention contraire, veuillez vous reporter au Chapitre 3.5 « Protocole : Isolation simultanée de ADN bactérien et d'ADN/ARN viral à partir d'échantillons liquides » pour suivre l'étape 1a) ou 1b) du protocole afin de continuer.

3.3.1 Sérum, plasma et autres liquides corporels exempts de cellules

Veuillez toujours bien mélanger l'échantillon avant de procéder à l'extraction.

Utilisez jusqu'à 200 µl d'échantillons et ajustez le volume à 400 µl avec Resuspension Buffer R.

3.3.2 Écouvillons

a) Écouvillons secs

Rincez les écouvillons dans un flacon approprié avec le volume le plus faible possible de PBS ou de Resuspension Buffer R (pour les prélèvements nasopharyngés, environ 400 µl et pour les prélèvements oraux, environ 600 µl). Pressez l'écouvillon contre la paroi intérieure du flacon en vue d'obtenir la plus grande quantité possible d'échantillons.

Utilisez 400 µl pour le protocole d'extraction.

De manière alternative, placez 400 µl de Resuspension Buffer R dans l'Extraction Tube, et rincez l'écouvillon directement dans le Lysis Buffer dissout.

b) Écouvillons se trouvant dans un fluide de stabilisation

Utilisez 200 µl de solution de stabilisation et ajustez le volume à un total de 400 µl avec Resuspension Buffer R. Avant de le retirer., rincez et pressez l'écouvillon contre la paroi intérieure du flacon.

Certains fluides de stabilisation sont susceptibles d'interférer avec la réaction de lyse ; si vous avez des questions, veuillez vous référer aux FAQ ou prenez contact avec l'assistance.

3.3.3 Échantillons de selles (surnageant)

a) Extraction d'acides nucléiques à partir de virus

En vue de préparer le surnageant, veuillez transférer 100 µl / 100 mg d'échantillons de selles vers un flacon de 2 ml et ajoutez 900 µl de Resuspension Buffer R. Mélangez au vortex pendant 30 secondes, cette opération étant suivie d'une étape de centrifugation d'une 1 minute à 12 000 x g. Utilisez jusqu'à 200 µl de surnageant, et ajustez le volume à 400 µl avec Resuspension Buffer R. Évitez la présence de particules solides dans l'échantillon.

b) Extraction d'ADN bactérien

En vue de préparer le surnageant, veuillez transférer 100 µl / 100 mg d'échantillons de selles vers un flacon de 2 ml et ajoutez 300 µl de Resuspension Buffer R. Mélangez au vortex pendant 30 secondes, cette opération étant suivie d'une étape de centrifugation d'une 1 minute à 1 000 x g. Utilisez jusqu'à 200 µl de surnageant, et ajustez le volume à 400 µl avec Resuspension Buffer R. Évitez la présence de particules solides dans l'échantillon.

3.3.4 Bactéries cultivées

Transférez 1 ml des bactéries mises en culture pendant la nuit vers un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml. Centrifugez pendant 2 minutes à 10 000 x g, et éliminez entièrement le surnageant. Remettez en suspension le culot dans 400 µl de Resuspension Buffer R.

3.3.5 Urine

En fonction du titre de bactéries et de l'application, on recommande un volume de départ de 15 à 50 ml d'urine. Centrifugez l'échantillon en vue de pastiller les bactéries et d'éliminer entièrement le surnageant (des contaminations d'urée sont susceptibles d'inhiber les réactions PCR).

Remettez en suspension le culot bactérien dans 400 µl de Resuspension Buffer R.

Pour certaines applications, on peut directement utiliser de l'urine fais : Utilisez jusqu'à 200 µl d'échantillons et ajustez le volume à 400 µl avec de la Resuspension Buffer R, et commencez avec le protocole d'extraction.

3.3.6 Sécrétions trachéales, LBA, crachats

a) Échantillons non visqueux ou à faible viscosité

Veuillez toujours bien mélanger l'échantillon avant de procéder à l'extraction.

Utilisez jusqu'à 200 µl d'échantillons et ajustez le volume à 400 µl avec Resuspension Buffer R.

b) Isolation de bactéries à partir d'échantillons visqueux

Transférez 150 µl d'échantillons de crachats ou 1 ml de sécrétion trachéale ou de LBA vers un Safe-Lock-Tube, et ajoutez respectivement 150 µl ou 1 ml de solution d'acétylcystéine (ACC) saturée (le rapport échantillon-tampon doit être de 1:1).

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

Centrifugez à 10 000 x g pendant 5 minutes. Jetez le surnageant.

Remettez en suspension le culot bactérien dans 400 µl de PBS ou de Resuspension Buffer R.

c) Isolation d'ADN/ARN viral à partir d'échantillons visqueux

Transférez 150 µl de l'échantillon vers un Safe-Lock-Tube, et ajoutez 150 µl de solution d'acétylcystéine (ACC) saturée à l'échantillon (le rapport échantillon-tampon doit être de 1:1). Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

Laissez l'échantillon se refroidir.

Utilisez jusqu'à 200 µl d'échantillons et ajustez le volume à 400 µl avec Resuspension Buffer R.

3.3.7 Biopsies de tissus

Placez 400 µl de Resuspension Buffer R dans l'Extraction Tube. Ajoutez 1 à 10 mg d'échantillon de biopsie de tissus au Lysis Buffer dissout.

Pour effectuer la lyse, la rupture de tissus difficiles à lyser comme des cartilages, les reins et le muscle cardiaque, on recommande d'appliquer un bead beating [battage de billes] effectué au moyen de billes en zircone.

Après le traitement mécanique, faites incuber pendant 10 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter.

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

Centrifugez pendant 1 minute à 10 000 x g, et transférez le surnageant vers un nouveau tube. Évitez la présence de particules solides

En vue de continuer, veuillez suivre l'étape 2 du protocole

3.3.8 Surnageants de cultures cellulaires

Utilisez jusqu'à 200 µl d'échantillons et ajustez le volume à 400 µl avec Resuspension Buffer R.

3.4 Protocole court RTP® Pathogen



Échantillons de lyse

Concernant le pré-traitement spécifique d'échantillons, veuillez vous reporter au Chapitre 3.3 « Préparation de la matière première ».

1. Ajoutez 400 µl de matériels d'échantillons avec volume ajusté au tube d'extraction

Veillez exécuter les étapes de chauffage suivantes sur un thermo-mixer, tout en continuant à agiter :

a) Isolation simultanée d'acides nucléiques bactériens et viraux :

Faites incuber pendant 10 minutes à 37° C

Faites incuber pendant 15 minutes à 65° C

Disponible en option : Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C

b) Isolation d'acides nucléiques viraux :

Faites incuber pendant 10 minutes à 65° C

En option : faites incuber pendant 10 minutes à 95° C

Veillez ajouter le contrôle d'extraction après la lyse.

Liaison des acides nucléiques

2. Ajoutez 400 µl de **Binding Solution**, et mélangez en pipetant vers le haut et vers le bas ou au vortex.

Transférez l'échantillon vers le RTA Spin Filter Set

Faites incuber pendant 1 minute

Centrifugez pendant 2 minutes à 11 000 x g

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.

Lavage destiné à éliminer des contaminations résiduelles

- c) Ajoutez 500 µl de **Wash Buffer R1**, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.

- d) Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer R2**, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.

- e) Centrifugez pendant 4 minutes à vitesse maximale en vue d'éliminer l'éthanol résiduel

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat.

Eluer les acides nucléiques

- f) Placez le Spin Filter dans un Receiver Tube de 1,5 ml
Ajoutez directement 60 µl d'**Elution Buffer R** (préchauffé à 65° C) sur le RTA Spin Filter.

Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.

Jetez le RTA Spin Filter et entreposez les acides nucléiques élués sur de la glace.

3.5 Protocole : Isolation simultanée de ADN bactérien et d ADN/ARN viral à partir d' échantillons liquides

Concernant le pré-traitement spécifique d'échantillons, veuillez vous reporter au Chapitre 3.3 « Préparation de la matière première ».

1. Ajoutez 400 µl de matériel d'échantillons à l'**Extraction Tube**. En fonction de la matière première, le volume d'échantillons doit être ajusté à 400 µl avec **Resuspension Buffer R** ou un PBS Buffer ; mélangez brièvement au vortex.

En fonction du type d'échantillons et de l'acide nucléique cible, effectuez les étapes de a) ou b) sur un thermo-mixer, tout en continuant à agiter :

a) Isolation d'ADN bactérien ou isolation simultanée d'acides nucléiques bactériens et viraux

Faites incuber pendant 10 minutes à 37° C.

Faites incuber pendant 15 minutes à 65° C.

Pour des bactéries (par ex. des mycobactéries) ou des tissus difficiles à lyser, on recommande de procéder à une incubation supplémentaire pendant 10 minutes à 95° C.

b) Isolation d'acides nucléiques viraux

Faites incuber pendant 10 minutes à 65° C.

Pour des échantillons difficiles à lyser, comme des tissus, on recommande de procéder à une incubation supplémentaire pendant 10 minutes à 95° C.

Remarque : Si vous souhaitez ajouter des acides nucléiques en vue de réaliser le contrôle d'extraction, ajoutez-les maintenant, avant l'étape de liaison.

2. Ajoutez 400 µl de **Binding Solution** et mélangez entièrement l'échantillon en pipétant vers le haut et vers le bas ou mélangez au vortex.
Transférez l'échantillon vers le RTA Spin Filter Set, et faites incuber pendant 1 minute.
Centrifugez pendant 2 minutes à 11 000 x g.
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.
3. Ajoutez 500 µl de **Wash Buffer R1** et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat.
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.
4. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer** au RTA Spin Filter et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat.
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.
5. Éliminez l'éthanol résiduel en procédant à une centrifugation finale pendant 4 minutes à vitesse maximale.
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat.
6. Placez le Spin Filter dans un Receiver Tube de 1,5 ml, et ajoutez directement 60 µl de l'**Élution Buffer R** (préchauffé à 65° C) sur la surface du RTA Spin Filter.
Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.

4. Annexe

4.1 Résolution de problèmes

Problème	Cause possible	Préconisations
Faible quantité d'acides nucléiques	Insuffisance de la lyse cellulaire	Augmentez la durée de la lyse Une agitation continue améliore l'efficacité de la lyse Réduisez la quantité de matière première en vue d'éviter une surcharge des colonnes
	Élution incomplète	Augmentez la durée d'incubation avec un Elution Buffer R préchauffé à 5 à 10 minutes Éluez deux fois avec un Élution Buffer R de 100 µl Utilisez un volume plus élevé d' Elution Buffer R
	Faible concentration d'acides nucléiques dans l'échantillon	Eluer les acides nucléiques avec un plus petit volume de tampon d'éluion R ; ne pas utiliser de volumes inférieurs à 40 µl.
	Entreposage incorrect de la matière première	Veillez vous assurer que la matière première soit correctement entreposée. Évitez des cycles répétés de gel-dégel du matériel d'échantillons.
	Les Wash Buffers ont été mal préparés	Veillez vous assurer que ce soit la bonne quantité d'éthanol/d'isopropanol qui est ajoutée aux Wash Buffers, et que toutes les solutions soient entreposées en étant bien fermées.
Acides nucléiques dégradés	Vieux matériel	Veillez vous assurer que la matière première soit entreposée dans des conditions adaptées (-20° C/-80° C).
	Transfert d'éthanol pendant l'éluion	Veillez augmenter la durée de séchage pour éliminer l'éthanol.
Les acides nucléiques ne présentent pas une bonne performance dans le cadre d'applications en aval (par ex. PCR ou NGS en temps réel)	Pendant l'éluion, il peut se produire un transfert de sel	Contrôlez les Wash Buffers quant à la présence de précipités de sel. Si des précipités devaient apparaître, veuillez les dissoudre en les faisant chauffer avec précaution jusqu'à 30° C Veillez vous assurer qu'avant l'utilisation les Wash Buffers soient à la température ambiante.
	Insuffisance de la lyse cellulaire	Voir ci-dessus.
Présence de résidus colorés sur le RTA Spin Filter après le lavage	Lavage insuffisant	Répétez l'étape du lavage
	Les Wash Buffers ont été mal préparés incorrecte	Voir ci-dessus.

4.2 Garantie

La société Invitek Molecular garantit le fonctionnement correct du kit pour les applications décrites dans le présent manuel et en accord avec l'usage prévu. Conformément au Système de gestion de la qualité de la société Invitek Molecular, certifié selon la norme EN ISO 13485, la performance de l'intégralité des composants du kit a été testée en vue d'assurer la qualité du produit.

Dès sa détection, tout problème, tout incident ou tout défaut doit immédiatement être signalé à la société Invitek Molecular. Veuillez dès la réception examiner le produit afin de vous assurer qu'il soit complet et intact. En cas de différences, vous devez sans délai en informer la société Invitek Molecular par écrit. Des modifications apportées au kit et aux protocoles, et une utilisation qui s'écarte de l'usage prévu ne sont pas couvertes par la garantie.

La société Invitek Molecular se réserve le droit de changer, de transformer ou de modifier à tout moment tout produit en vue d'améliorer sa performance et sa conception.

La société Invitek Molecular garantit les produits ainsi que cela est indiqué dans les Conditions Générales de Vente, celles-ci étant disponibles à l'adresse Internet suivante : www.invitek-molecular.com. Si vous avez des questions, veuillez prendre contact avec techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Symboles utilisés sur les produits et étiquetage



Fabricant



Numéro de lot



Identifiant unique d'un dispositif médical



Numéro de catalogue



Date d'expiration



Consultez le mode d'emploi



Limitation de la température



Ne pas réutiliser



Quantité de préparations d'échantillons



Dispositif de diagnostic médical in vitro

4.4 Documents et informations supplémentaires

Consultez www.invitek-molecular.com pour de plus amples informations sur :

- Foire aux questions et conseils pour la résolution de problèmes
- Manuels rédigés en plusieurs langues
- Fiches de données de sécurité (MSDS)
- Assistance Internet
- Vidéos produits

Si malgré une lecture attentive du mode d'emploi et des informations supplémentaires, vous avez encore besoin d'aide, veuillez nous contacter à l'adresse Internet suivante : techsupport@invitek-molecular.com ou adressez-vous au concessionnaire qui est compétent pour vous.

4.5 Informations sur les commandes

Produit	Taille de l'emballage	N° de catalogue
RTP® Pathogen Kit	50 préparations	1040500200
RTP® Pathogen Kit	250 préparations	1040500300

Historique des révisions

Révision	Date	Description
FR-v1-2022	2022-05-18	Nouveau document
FR-v2-2022	2022-06-30	Erreur de forme concernant la désignation Resuspension Buffer R

INVITEK Molecular

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Allemagne

Téléphone: +49 30 9489 2908
Fax: +49 30 9489 3795
info@invitek-molecular.com

www.invitek-molecular.com



<https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html>

2022-06-30 FR-v2-2022