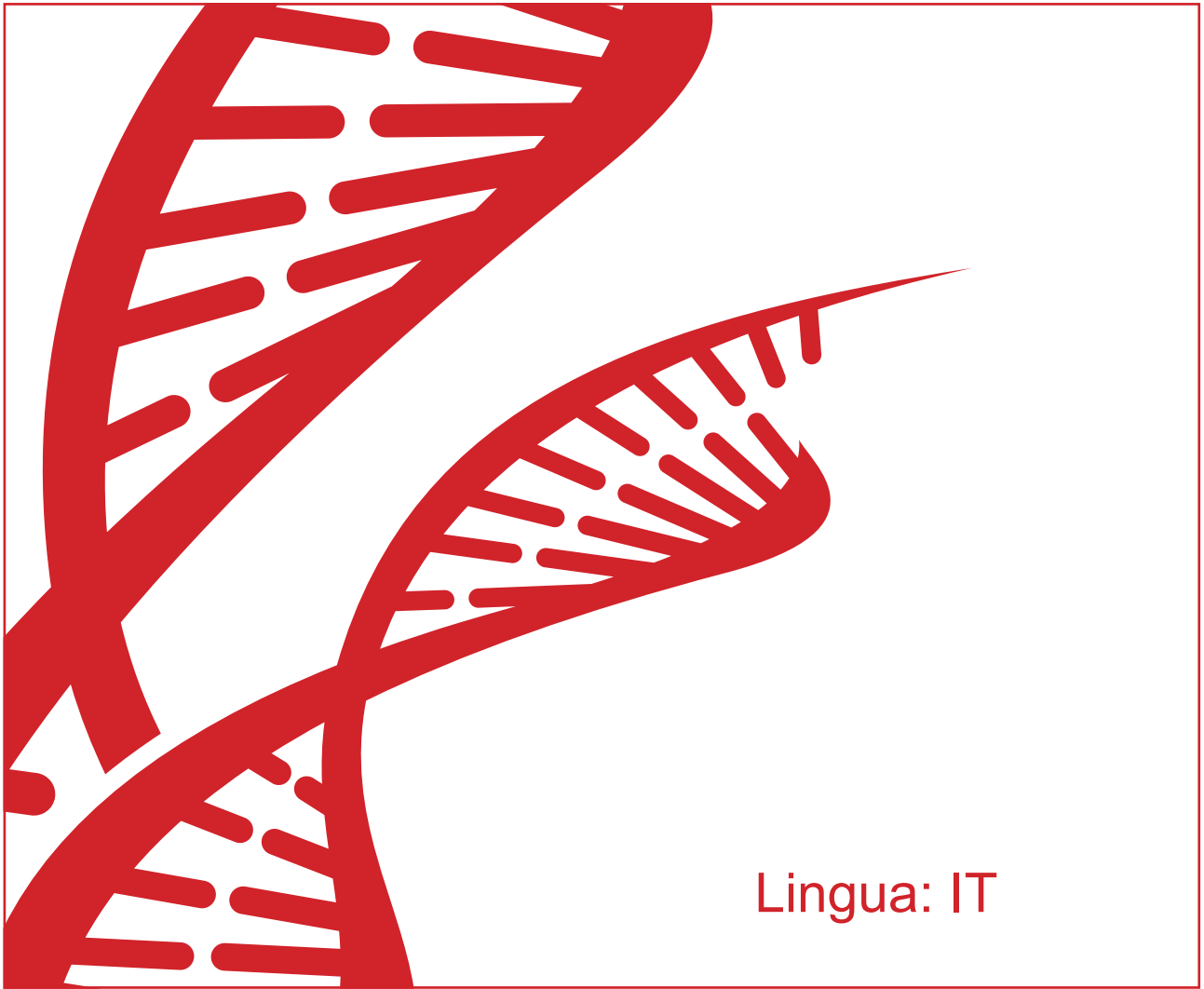


Istruzioni per l'uso RTP® Pathogen Kit



REF 1040500200
1040500300



50 preparazioni
250 preparazioni



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

INVITEK
Molecular

Note importanti

Grazie per aver acquistato **RTP® Pathogen Kit** di Invitek Molecular.

Il prodotto serve ad isolare manualmente gli acidi nucleici (DNA batterico, DNA/RNA virale) da una varietà di campioni clinici, utilizzando la tecnologia Spin Column.

AVVERTENZA! Un uso e una manipolazione impropri per scopi diversi da quelli previsti possono causare pericoli e danni. Pertanto, si invita a leggere e seguire attentamente le presenti istruzioni per l'uso. Tenerle sempre a portata di mano. Per evitare lesioni a persone, osservare anche le istruzioni di sicurezza.

Tutte le versioni delle istruzioni per l'uso sono scaricabili dal nostro sito web o possono essere richieste su: www.invitek-molecular.com

Contatto:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germania

+ 49 (0) 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Supporto tecnico:

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular, tutti i diritti riservati.

Il kit è conforme al REGOLAMENTO (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Tuttavia, non è pensato per l'uso diagnostico in vitro nei Paesi in cui il REGOLAMENTO (UE) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro non è riconosciuto.

Marchi commerciali: Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. I marchi registrati, quelli commerciali, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non specificatamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non tutelati dalla legge.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® sono marchi commerciali registrati di Invitek Molecular GmbH.

Indice dei contenuti

1.	Istruzioni di sicurezza.....	3
2.	Informazioni sul prodotto.....	4
2.1	Il kit contiene.....	4
2.2	Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire	5
2.3	Conservazione, aspetto e scadenza	5
2.4	Uso previsto.....	6
2.5	Informazioni sul prodotto e specifiche	6
2.6	Principio e procedura.....	7
3.	Estrazione di acido nucleico con il RTP® Pathogen Kit.....	8
3.1	Prima di avviare un protocollo.....	8
3.2	Campionamento e conservazione del materiale di partenza	9
3.3	Preparazione del materiale di partenza.....	10
3.3.1	Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule.....	10
3.3.2	Tamponi.....	10
3.3.3	Campione di feci (surnatante)	10
3.3.4	Batteri coltivati.....	11
3.3.5	Urina	11
3.3.6	Secrezione tracheale, BAL, espettorato	11
3.3.7	Biopsie di tessuto	12
3.3.8	Surnatanti di colture cellulari	12
3.4	Protocollo breve RTP® Pathogen Kit.....	13
3.5	Protocollo: isolamento simultaneo di DNA batterico e DNA/RNA virale da campioni liquidi	14
4.	Appendice.....	15
4.1	Risoluzione di problemi.....	15
4.2	Garanzia.....	16
4.3	Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura	16
4.4	Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive	17
4.5	Informazioni sull'ordine	17

1. Istruzioni di sicurezza

Accertarsi che chiunque utilizzi il presente prodotto abbia ricevuto le istruzioni sulle pratiche di sicurezza generali per i laboratori e le informazioni sulla sicurezza riportate nel presente documento.

- Nel maneggiare i prodotti chimici, indossare sempre indumenti protettivi, guanti monouso e occhiali di sicurezza.
- Cambiare sempre i puntali delle pipette tra un trasferimento di liquidi e l'altro. Per evitare la contaminazione incrociata, si consiglia l'uso di puntali per pipette con barriera antiaerosol.
- Non riutilizzare i materiali di consumo.
- Gettare i guanti qualora fossero esposti a contaminazioni.
- Non combinare componenti di kit diversi a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare una contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per minimizzare il rischio di infezioni dal materiale potenzialmente infettivo, raccomandiamo di lavorare in flusso d'aria laminare fino alla lisi dei campioni.

Prima di maneggiare i prodotti chimici, leggere e comprendere tutte le schede dati di sicurezza applicabili (MSDS). Queste sono reperibili su www.invitek-molecular.com.

Smaltire i residui del kit e i rifiuti liquidi in conformità alle normative nazionali, far riferimento alle MSDS. Invitek Molecular non ha testato i materiali infettivi residui nei rifiuti liquidi generati dal kit. La contaminazione di rifiuti liquidi con materiali infettivi residui è altamente improbabile ma non può essere esclusa del tutto. Pertanto, i rifiuti liquidi vanno considerati infettivi e devono essere manipolati e smaltiti in conformità alle normative di sicurezza locali.

Le frasi di rischio e sicurezza della Comunità Europea per i componenti di RTP® Pathogen Kit a cui si applicano sono elencate di seguito come segue:

Extraction Tube



Attenzione

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

Wash Buffer R1



Attenzione

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

H302: Nocivo se ingerito.

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca grave irritazione oculare.

H332: Nocivo se inalato.

H335: Può irritare le vie respiratorie.

H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata

H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P305+P351+P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

EUH208: Contiene proteinasi, tritiracium album-serina. Può causare una reazione allergica.

EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.

Informazioni mediche di emergenza possono essere ottenute 24 ore al giorno da infotrac, www.infotrac.net:

al di fuori degli USA: 1 – 352 – 323 – 3500

negli USA: 1 – 800 – 535 – 5053

2. Informazioni sul prodotto

2.1 Il kit contiene

	50 purificazioni	250 purificazioni
N. catalogo	1040500200	1040500300
Extraction Tube	50 fiale	5 x 50 fiale
Resuspension Buffer R	30 ml/flacone	150 ml/flacone
Binding Solution (riempire con isopropanolo al 99,7%)	Flacone vuoto (Volume finale 30 ml)	Flacone vuoto (Volume finale 120 ml)
Wash Buffer R1	20 ml/flacone (Volume finale 40 ml)	80 ml/flacone (Volume finale 160 ml)
Wash Buffer R2	12 ml/flacone (Volume finale 60 ml)	50 ml/flacone (Volume finale 250 ml)
Elution Buffer R	15 ml/flacone	60 ml/flacone
RTA Spin Filter Set	50 set	5 x 50 set
RTA Receiver Tubes	3 x 50 pezzi	15 x 50 pezzi
Receiver Tubes da 1,5 ml	50 pezzi	5 x 50 pezzi
Short Protocol	1 volantino	1 volantino

2.2 Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire

Attrezzatura da laboratorio:

- microcentrifuga (*tutti i protocolli sono stati validati con una centrifuga 5415 D Eppendorf*)
- opzionale: centrifuga per 15 o 50 ml
- termoshaker (37 °C - 95 °C)
- cilindro di misurazione (250 ml)
- guanti monouso
- pipette e puntali per pipette
- miscelatore Vortex
- provette di reazione (1,5 ml, 2,0 ml)

Liquidi e solventi:

- 1 x PBS per regolare il volume del campione
- 96 - 100 % etanolo (non denaturato)
- isopropanolo*
- opzionale (per campioni respiratori ad alta viscosità): soluzione satura di acetilcisteina (ACC) (200 mg/ml)

*Il kit è validato con 2-propanolo; Rotipuran® >99,7%, p.a., ACS, ISO (n. ordine 6752) di Carl Roth

*** Possibili fornitori di isopropanolo:**

Carl Roth
2-Propanolo
Rotipuran® >99,7%, p.a., ACS, ISO
N. ordine 6752

Applichem
2-Propanolo per la biologia molecolare
N. ordine A3928

Sigma
2-Propanolo
N. ordine 59304-1L-F

2.3 Conservazione, aspetto e scadenza

Data di scadenza: tutti i tamponi e i kit di componenti possono essere conservati a temperatura ambiente e presentano una scadenza, come riportato sull'etichetta della confezione del kit esterno.

Dopo l'apertura, i componenti individuali del kit, come quelli preparati in modo conforme prima del primo uso, hanno una scadenza di 3 mesi.

Prima di ogni uso, accertarsi che tutti i componenti siano a temperatura ambiente. Se nelle soluzioni sono presenti precipitati per via della temperatura, scioglierli riscaldandoli accuratamente (fino a 30 °C).

La temperatura ambiente è definita come intervallo di 15-30 °C.

Wash Buffer R1 and Wash Buffer R2: dopo aver aggiunto l'etanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

Binding Solution: dopo aver aggiunto l'isopropanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

2.4 Uso previsto

RTP® Pathogen Kit è un kit di estrazione dell'acido nucleico basato sulla tecnologia Spin Column, destinato all'isolamento e alla purificazione simultanea del DNA batterico e del DNA/RNA virale.

Il kit può essere utilizzato per una varietà di tipi di campioni umani, come siero e plasma (da sangue stabilizzato in EDTA o citrato ma non eparina), liquido risciacquato da tamponi, espettorato pretrattato, BAL, secreto tracheale, surnatante da sospensione di feci, batteri coltivati, surnatanti di colture cellulari, materiale/tessuto di biopsia, urina e altri fluidi corporei senza cellule.

Il prodotto non è pensato per essere impiegato con campioni di sangue eparinizzato. Esso è previsto per l'uso esclusivo da parte di professionisti, come tecnici di laboratorio, medici e biologi con formazione in tecniche di biologia molecolare e procedure diagnostiche *in vitro*.

2.5 Informazioni sul prodotto e specifiche

Materiale di partenza	Resa	Qualità	Tempo
<ul style="list-style-type: none">Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule, urinaTamponi (asciutti, stabilizzati)Surnatante da sospensioni di feciBatteri coltivatiSecrezione tracheale, BAL, espettoratoSurnatante di coltura cellulare <p>Fino a 10 mg di campione di tessuto</p>	A seconda del campione (archiviazione e fonte)	A seconda del tipo di campione, gli acidi nucleici target	Circa 20 min. (escl. lisi)

La resa e la qualità degli acidi nucleici purificati dipendono dal tipo di campione, dalla fonte del campione, dal trasporto, dalla conservazione, dall'età e dal titolo del virus.

Il kit è adatto solo per campioni di plasma e siero che contengono EDTA o citrato, non eparina, come anticoagulante.

Per la determinazione della resa, tenere presente che gli acidi nucleici purificati con questo kit contengono Carrier RNA (5 µg per 200 µl di campione), che rappresenta la maggior parte degli acidi nucleici presenti nell'eluato. In particolare gli acidi nucleici virali derivanti dal materiale ottenuto da campioni biologici sono generalmente a concentrazione molto bassa e quindi quasi impossibili da quantificare fotometricamente. La RT-PCR quantitativa è consigliata per la determinazione della resa.

Il **RTP® Pathogen Kit** fornisce una procedura efficiente per isolare gli acidi nucleici di alta qualità. Il kit è pensato per l'isolamento simultaneo di DNA/RNA virale, DNA batterico tramite un protocollo Spin Column di lisi-legame-lavaggio-eluizione.

Applicazioni a valle:

La resa e la qualità degli acidi nucleici isolati sono generalmente adatti a numerose applicazioni di diagnostica molecolare, come le tecniche PCR, NGS e i metodi di ibridazione. Le applicazioni a valle devono essere eseguite secondo le specifiche dei rispettivi produttori.

2.6 Principio e procedura

1. Campioni di lisi

Il kit include provette di estrazione contenenti un mix liofilizzato di Carrier RNA, Proteinase K, enzimi litici e Lysis Buffer per eseguire una lisi del campione in 1 fase. Per avviare la procedura di estrazione, aggiungere semplicemente il campione all'Extraction Tube (provetta di estrazione).

I campioni vengono lisati a diverse temperature elevate agitando continuamente.

2. Legare gli acidi nucleici

Aggiungendo la Binding Solution al lisato, vengono regolate condizioni di legame ottimali. Ogni lisato è poi applicato ad un RTA Spin Filter e gli acidi nucleici vengono adsorbiti alla membrana.

3. Lavare per rimuovere le contaminazioni residue

I contaminanti vengono eliminati in modo efficiente utilizzando Wash Buffer R1 e Wash Buffer R2, mentre gli acidi nucleici rimangono legati alla membrana.

4. Eluire acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono eluiti dall'RTA Spin Filter utilizzando 60 - 200 µl di Elution Buffer M.

3. Estrazione di acido nucleico con il RTP® Pathogen Kit

3.1 Prima di avviare un protocollo

Quando si utilizza il kit per la prima volta, accertarsi che tutti i tamponi e i reagenti siano preparati come indicato:

Preparazioni di tampone prima del primo utilizzo: 50 preparazioni
Binding Solution (flacone vuoto): riempire il flacone con 30 ml di isopropanolo al 99,7% (grado per biologia molecolare) nel flacone, tenendolo sempre ben chiuso.
Wash Buffer R1: aggiungere 20 ml di isopropanolo al 99,7% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
Wash Buffer R2: aggiungere 48 ml di etanolo al 96 -100% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
Preparazioni di tampone prima del primo utilizzo: 250 preparazioni
Binding Solution (flacone vuoto): riempire il flacone con 120 ml di isopropanolo al 99,7% (grado per biologia molecolare) nel flacone, tenendolo sempre ben chiuso.
Wash Buffer R1: aggiungere 80 ml di isopropanolo al 99,7% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
Wash Buffer R2: aggiungere 200 ml di etanolo al 96 -100% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.

- Regolare il termoshaker a 37 °C.
- Regolare il termoshaker/i blocchi di riscaldamento a 65 °C e 95 °C
- Riscaldare la quantità necessaria di **Elution Buffer R** a 65 °C (occorrono 60 - 200 µl di **Elution Buffer R** per campione).
- Determinare il numero di reazioni necessarie inclusi i controlli ed etichettare la quantità necessaria di RTA Spin Filter (coperchio) e di Receiver Tubes da 1,5 ml (per campione: 1 Receiver Tube necessario).

Controllo dell'estrazione

Far riferimento alle istruzioni del produttore per determinare l'importo ottimale di controllo dell'estrazione per applicazioni a valle specifiche.

Il controllo dell'estrazione DNA o RNA andrebbe aggiunto al lisato dopo la fase di riscaldamento. Per un'efficienza di purificazione ottimale, le molecole di controllo dell'estrazione non dovrebbero essere più lunghe di 100 nucleotidi, in quanto le molecole più piccole non vengono recuperate in modo efficiente.

3.2 Campionamento e conservazione del materiale di partenza

Per rese riproducibili ed elevate, è essenziale una corretta conservazione del campione. Le rese possono variare a seconda di fattori come salute del donatore, età del campione, tipo di campione, trasporto e conservazione.

Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo dei campioni per evitare una degradazione dell'acido nucleico. In linea generale, sono i campioni freschi a dare i migliori risultati. Si raccomanda di tener conto di guide tecniche, come standard CEN/TS e ISO, in materia di processo di pre-esame per la diagnostica molecolare in IVDR, come evidenziato in G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule: per l'estrazione possono essere utilizzati siero o plasma derivati da sangue intero venoso (trattato con anticoagulanti come EDTA o citrato, ma non con eparina), campioni di liquido sinoviale o altri fluidi corporei privi di cellule. Il sangue intero non deve essere agitato su vortex per evitare l'emolisi. Far riposare le provette di siero per almeno 30 minuti prima della centrifugazione. Seguire le istruzioni del sistema di raccolta del sangue per la preparazione del siero o del plasma. Si raccomanda di separare plasma/siero mediante centrifugazione entro 12 ore. I surnatanti ottenuti utilizzando sistemi senza gel separatore devono essere trasferiti in provette per campioni fresche. Per la conservazione a breve termine, i campioni possono essere conservati in ghiaccio per 1-2 ore. I campioni possono essere conservati a -20°C per un massimo di 24 ore. Per la conservazione a lungo termine, si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -80°C. Cicli ripetuti di congelamento-scongelo possono influire negativamente sull'integrità del campione e causare ad es. denaturazione/precipitazione delle proteine, con conseguente potenziale riduzione di resa, qualità o dei titoli virali. Inoltre, i crioprecipitati formati durante i cicli di scongelamento e congelamento possono causare problemi. Se il crioprecipitato è visibile, centrifugare a 6,800 x g per 3 min. Il surnatante trasparente deve essere utilizzato immediatamente.

Tamponi:

tamponi asciutti: preparare i campioni come descritto nel metodo di preparazione del campione corrispondente. Conservare a secco a 4-8 °C.

Tamponi in fluido stabilizzante: il liquido stabilizzante può essere maneggiato come fluido corporeo privo di cellule. Si noti che alcuni agenti stabilizzanti possono causare una resa ridotta a causa dell'incompatibilità con la chimica utilizzata nel kit. Conservare secondo i requisiti del produttore.

Campioni di feci: i campioni contengono DNasi e RNasi che possono causare rapidamente la degradazione del DNA e dell'RNA. Pertanto, i campioni devono essere conservati congelati a -80°C.

Batteri coltivati: dopo la coltivazione, i batteri devono essere pellettizzati e risospesi come descritto nel corrispondente metodo di preparazione del campione.

Urina: a seconda del titolo batterico e dell'applicazione si raccomanda un volume iniziale di 15-50 ml di urina. Centrifugare il campione per pellettizzare i batteri e rimuovere completamente il surnatante (le contaminazioni da urea possono inibire le reazioni della PCR). Per alcune applicazioni è possibile utilizzare direttamente l'urina fresca.

Secrezione tracheale / BAL / espettorato: i campioni contengono DNasi e RNasi, che possono causare rapidamente la degradazione di DNA e RNA. Pertanto, i campioni devono essere conservati congelati a – 80°C.

Biopsie di tessuto: i campioni devono essere congelati immediatamente e conservati a – 20°C or –80°C. Evitare un congelamento e uno scongelamento ripetuti. La quantità di DNA purificato dipende dal tipo di materiale di partenza. Scongelare il campione nella miscela di lisi.

Surnatanti di colture cellulari: preparare campioni di surnatanti come altri campioni di fluidi corporei privi di cellule descritti nel metodo di preparazione del campione corrispondente.

3.3 Preparazione del materiale di partenza

Di seguito viene descritta la preparazione della lisi del campione per diversi materiali di partenza.

Dopo la preparazione del materiale di partenza, far riferimento al capitolo 3.5 “Protocollo: isolamento simultaneo di DNA batterico e DNA/RNA virale da campioni liquidi” per seguire il passaggio 1a) o 1b) del protocollo per continuare, salvo diversa indicazione.

3.3.1 Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Utilizzare fino a 200 µl di campione e regolare il volume fino a 400 µl con Resuspension Buffer R.

3.3.2 Tamponi

a) Tamponi asciutti

Sciacquare i tamponi in una fiala adatta nel volume più basso possibile di PBS o Resuspension Buffer R (per tamponi nasofaringei circa 400 µl, per tamponi orali circa 600 µl). Premere il tampone sulla parete interna della fiala per ottenere quanto più campione possibile.

Utilizzare 400 µl per il protocollo di estrazione.

In alternativa, mettere 400 µl di Resuspension Buffer R nell'Extraction Tube e sciacquare il tampone direttamente nel tampone di lisi disciolto.

b) Tamponi nel liquido stabilizzante

Utilizzare 200 µl di soluzione stabilizzante e regolare il volume ad un totale di 400 µl con Resuspension Buffer R. Sciacquare e premere il tampone sulla parete interna della fiala prima di rimuoverlo.

Alcuni fluidi stabilizzanti possono interferire con la reazione di lisi (per chiarimenti, far riferimento alle FAQ o rivolgersi al supporto di assistenza).

3.3.3 Campione di feci (surnatante)

a) Estrazione di acidi nucleici da virus

Per preparare il surnatante, trasferire 100 µl / 100 mg di campione di feci in una fiala da 2 ml e aggiungere 900 µl di Resuspension Buffer R. Agitare su vortex per 30 secondi, proseguire con una fase di centrifugazione di 1 minuto a 12.000 x g. Utilizzare fino a 200 microlitri di surnatante e regolare il volume a 400 microlitri con Resuspension Buffer R. Evitare particelle solide nel campione.

b) Estrazione di DNA batterico

Per preparare il surnatante, trasferire 100 µl / 100 mg di campione di feci in una fiala da 2 ml e aggiungere 300 µl di Resuspension Buffer R. Agitare su vortex per 30 secondi, proseguire con una fase di centrifugazione di 1 minuto a 1.000 x g. Utilizzare fino a 200 microlitri di surnatante e regolare il volume a 400 microlitri con Resuspension Buffer R. Evitare particelle solide nel campione.

3.3.4 Batteri coltivati

Trasferire 1 ml di coltura batterica durante la notte in una provetta Safe Lock da 2,0 ml. Centrifugare per 2 min a 10.000 x g e rimuovere completamente il surnatante. Risospendere il pellet in 400 µl di Resuspension Buffer R.

3.3.5 Urina

A seconda del titolo batterico e dell'applicazione si raccomanda un volume iniziale di 15-50 ml di urina. Centrifugare il campione per pellettizzare i batteri e rimuovere completamente il surnatante (le contaminazioni da urea possono inibire le reazioni della PCR).

Risospendere il pellet batterico in 400 µl di Resuspension Buffer R.

Per alcune applicazioni è possibile utilizzare direttamente l'urina fresca: utilizzare fino a 200 µl di campione e regolare il volume a 400 µl con Resuspension Buffer R e iniziare con il protocollo di estrazione.

3.3.6 Secrezione tracheale, BAL, espettorato

a) Campioni non viscosi o a bassa viscosità

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Utilizzare fino a 200 µl di campione e regolare il volume a 400 µl con Resuspension Buffer R.

b) Isolamento di batteri da campioni viscosi

Trasferire 150 µl del campione di espettorato o 1 ml di secreto tracheale o BAL in una provetta Safe Lock e aggiungere rispettivamente 150 µl o 1 ml di soluzione satura di acetilcisteina (ACC) (con rapporto campione/tampone 1:1).

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

Centrifugare a 10.000 x g per 5 min. Eliminare il surnatante.

Risospendere il pellet batterico in 400 µl di PBS o Resuspension Buffer R.

c) Isolamento di DNA/RNA virali da campioni viscosi

Trasferire 150 µl del campione in una provetta Safe Lock e aggiungere rispettivamente 150 µl o 1 ml di soluzione satura di acetilcisteina (ACC) (con rapporto campione/tampone 1:1).

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

Far raffreddare il campione.

Utilizzare fino a 200 µl di campione e regolare il volume a 400 µl con Resuspension Buffer R.

3.3.7 Biopsie di tessuto

Mettere 400 µl di Resuspension Buffer R nell'Extraction Tube. Aggiungere 1-10 mg di campione di biopsia di tessuto al tampone di lisi dissolto.

Per la lisi, si raccomanda la rottura di tessuti difficili da lisare, come cartilagine, reni e muscolo cardiaco, mediante bead beating con sfere di Zirconia.

Dopo il trattamento meccanico, incubare per 10 min a 65 °C agitando continuamente.

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

Centrifugare per 1 minuto a 10.000 x g e trasferire il surnatante ad un nuovo tubo. Evitare le particelle solide.

Seguire il passaggio 2 del protocollo per continuare

3.3.8 Surnatanti di colture cellulari

Utilizzare fino a 200 µl di campione e regolare il volume a 400 µl con Resuspension Buffer R.

3.4 Protocollo breve RTP® Pathogen Kit



Campioni di lisi

Fare riferimento al capitolo 3.3 “Preparazione del materiale di partenza” per il pretrattamento specifico del campione.

1. Aggiungere 400 µl di materiale campione con volume regolato all'Extraction Tube

Eeguire le seguenti fasi di riscaldamento su un termomixer agitando continuamente:

a) isolamento simultaneo di acidi nucleici batterici e virali:

incubare 10 min a 37 °C

incubare 15 min a 65°C

opzionale: incubare 10 min a 95°C

b) isolamento di acidi nucleici virali:

incubare 10 min a 65°C

opzionale: incubare 10 min a 95 °C

Aggiungere il controllo di estrazione dopo la lisi.

Acidi nucleici leganti

2. Aggiungere 400 µl di **Binding Solution**, miscelare pipettando su e giù o agitando su vortex.

Trasferire il campione nel set di RTA Spin Filter

Incubare per 1 min

Centrifugare per 2 min a 11.000 x g

Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.

Lavare per rimuovere le contaminazioni residue

- c) Aggiungere 500 µl di **Wash Buffer R1**, centrifugare 1 min a 11.000 x g

Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.

- d) Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer R2**, centrifugare 1 min a 11.000 x g

Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.

- e) Centrifugare 4 min a velocità max. per rimuovere l'etanolo residuo

Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato

Eluire acidi nucleici

- f) Posizionare lo Spin Filter nel Receiver Tube da 1,5 ml
Aggiungere 60 µl di **Elution Buffer R** (preriscaldato a 65 °C)
direttamente sull'RTA Spin Filter.

Incubare 1 min a temperatura ambiente e centrifugare 1 min a 11.000 x g

Eliminare l'RTA Spin Filter e conservare gli acidi nucleici eluiti sul ghiaccio.

3.5 Protocollo: isolamento simultaneo di DNA batterico e DNA/RNA virale da campioni liquidi

Fare riferimento al capitolo 3.3 “Preparazione del materiale di partenza” per il pretrattamento specifico del campione.

1. Aggiungere 400 µl di materiale campione all'**Extraction Tube**. A seconda del materiale di partenza, il volume del campione deve essere regolato a 400 µl con **Resuspension Buffer R** o tampone PBS, agitare brevemente su vortex.

In base al tipo di campione e all'acido nucleico target, eseguire i passaggi a) o b) su un termomixer agitando continuamente:

a) del DNA batterico o isolamento simultaneo di acidi nucleici batterici e virali

Incubare 10 min a 37 °C.

Incubare 15 min a 65 °C.

Per batteri difficili da lisare (ad es. micobatteri) o incubazione aggiuntiva dei tessuti per 10 min. si consiglia una temperatura di 95 °C.

b) Isolamento di acidi nucleici virali

Incubare 10 min a 65 °C.

Per campioni difficili da lisare come i tessuti si consiglia un'ulteriore incubazione per 10 min a 95 °C.

Nota: Se si desidera aggiungere acidi nucleici per il controllo dell'estrazione, farlo ora, prima della fase di legamento.

2. Aggiungere 400 µl di **Binding Solution**, miscelare il campione pipettando su e giù o agitando su vortex.
Trasferire il campione nel set di RTA Spin Filter e incubare per 1 min.
Centrifugare per 2 min a 11.000 x g
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
3. Aggiungere 500 µl di **Wash Buffer R1** e centrifugare 1 min a 11.000 x g
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
4. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer R2** all'RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
5. Rimuovere l'etanolo residuo con una centrifugazione finale per 4 min alla velocità massima.
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato.
6. Posizionare lo Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml e aggiungere 60 µl di **Elution Buffer R** (preriscaldato a 65 °C) direttamente sulla superficie dell'RTA Spin Filter.
Incubare 1 min a temperatura ambiente e centrifugare 1 min a 11.000 x g

4. Appendice

4.1 Risoluzione di problemi

Problema	Causa possibile	Raccomandazione
Quantità ridotta degli acidi nucleici	Lisi cellulare insufficiente	Aumentare il tempo di lisi L'agitazione continua migliora l'efficienza della lisi Ridurre la quantità di materiale di partenza per evitare un sovraccarico della colonna
	Eluizione incompleta	Aumentare il tempo di incubazione con Elution Buffer R preriscaldato a 5-10 min Eluire due volte con 100 µl di Elution Buffer R Impiegare un volume maggiore di Elution Buffer R
	Bassa concentrazione di acido nucleico nel campione	Eluire gli acidi nucleici con un volume inferiore di Elution Buffer R , non usare volumi inferiori a 40 µl
	Conservazione errata del materiale di partenza	Assicurarsi che il materiale di partenza sia conservato in modo consono. Evitare ripetuti cicli di scongelamento del materiale campione.
	I Wash Buffer sono stati preparati in modo scorretto	Accertarsi che la quantità corretta di etanolo/isopropanolo sia aggiunta ai Wash Buffer e che tutte le soluzioni siano conservate ben chiuse.
Acidi nucleici degradati	Materiale vecchio	Assicurarsi che il materiale di partenza sia conservato in condizioni adeguate (-20°C/-80°C).
	Etanolo residuo durante l'eluizione	Aumentare il tempo di asciugatura per la rimozione dell'etanolo.
Gli acidi nucleici non funzionano bene nelle applicazioni a valle (ad es. PCR in tempo reale o NGS)	Riporto di sale durante l'eluizione	Controllare eventuali precipitati di sale nei Wash Buffer . Se sono visibili dei precipitati, scioglierli riscaldandoli accuratamente fino a 30 °C Accertarsi che i Wash Buffer siano a temperatura ambiente prima dell'uso.
	Lisi cellulare insufficiente	Vedi sopra
Residui colorati sull'RTA Spin filter dopo il lavaggio	Lavaggio inefficiente	Ripetere la fase di lavaggio
	I Wash Buffer sono stati preparati in modo scorretto	Vedi sopra

4.2 Garanzia











Invitek Molecular garantisce il perfetto funzionamento del kit per le applicazioni descritte nel presente manuale e in conformità all'uso previsto. In conformità al sistema di gestione della qualità a norma EN ISO 13485 di Invitek Molecular, la prestazione di tutti i componenti del kit è stata testata per assicurare la qualità del prodotto.

Qualsiasi problema, incidente o difetto sarà riportato a Invitek Molecular subito dopo il rilevamento. Ispezionare il prodotto al ricevimento dello stesso per garantirne la completezza e l'integrità. In presenza di discrepanze, informare subito Invitek Molecular per iscritto. La garanzia non copre eventuali modifiche al kit e ai protocolli né un uso diverso da quello previsto.

Invitek Molecular si riserva il diritto di modificare, alterare o cambiare qualsiasi prodotto per migliorarne la prestazione e il design in qualsiasi momento.

Invitek Molecular garantisce i prodotti come stabilito nelle Condizioni Generali disponibili all'indirizzo www.invitek-molecular.com. Per eventuali domande contattare techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura

	Produttore
	Numero di lotto
	Identificatore univoco del dispositivo medico
	Numero di catalogo
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazione della temperatura
	Non riutilizzare
	Quantità di preparati per campioni
	dispositivo medico diagnostico in vitro

4.4 Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive

Visitare www.invitek-molecular.com per ulteriori informazioni su:

- FAQ e suggerimenti per la risoluzione di problemi
- Manuali in varie lingue
- Schede dati di sicurezza (MSDS)
- Supporto web
- Video prodotti

Se, nonostante un attento studio delle istruzioni per l'uso e ulteriori informazioni, si avesse ancora bisogno di assistenza, scrivere all'indirizzo techsupport@invitek-molecular.com o contattare il proprio rivenditore.

4.5 Informazioni sull'ordine

Prodotto	Dimensione della confezione	N. catalogo
RTP® Pathogen Kit	50 preparazioni	1040500200
RTP® Pathogen Kit	250 preparazioni	1040500300

Cronologia delle revisioni

Revisione	Data	Descrizione
IT-v1-2022	2022-05-18	Nuovo documento
IT-v2-2022	2022-06-30	Errore di forma relativo alla designazione Resuspension Buffer R

INVITEK Molecular

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

Telefono: +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 IT-v2-2022