

Instruções de utilização RTP® Pathogen Kit

INVITEK
diagnostics



Língua: PT



REF 1040500200
1040500300

 50 preparações
250 preparações

 ALS Life Sciences Portugal, S.A.
Zona Industrial de Tondela, ZIM II,
Lote 6, 3460-070 Tondela
Portugal

Notas importantes

Obrigado por ter adquirido o **RTP® Pathogen Kit** da Invitek Diagnostics.

O produto destina-se ao isolamento manual de ácidos nucleicos (ADN bacteriano, ADN/ARN viral) a partir de uma variedade de amostras clínicas utilizando a tecnologia de coluna de purificação.

ATENÇÃO! O manuseamento inadequado e o uso para fins diferentes da utilização pretendida podem causar perigo e danos. Por isso, solicitamos que leia estas instruções de utilização com atenção e que as siga cuidadosamente. Mantenha-as sempre ao seu alcance. Para evitar ferimentos pessoais, observe também as instruções de segurança.

Todas as versões das instruções de utilização podem ser encontradas no nosso website para download ou podem ser solicitadas através do seguinte endereço: www.invitek.com.

Contacto:

Apoio técnico:

techsupport@invitek.com

ALEMANHA

Haynauer Str. 60, 12249 Berlim, Alemanha

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6, 3460-070 Tondela, Portugal

+351 232 817 817

© 2025 Invitek Diagnostics, todos os direitos reservados.

O kit está em conformidade com o REGULAMENTO (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro. No entanto, não se destina ao uso para diagnóstico in vitro em países onde o REGULAMENTO (UE) 2017/746 não é reconhecido.

Marcas comerciais: InviSorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. As marcas registadas, marcas comerciais, etc. mencionadas neste documento, mesmo que não sejam especificamente identificadas como tal, não devem ser consideradas desprotegidas por lei.

InviGenius®, InviMag®, InviSorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® são marcas registadas da Invitek Molecular GmbH.

Índice

1.	Instruções de segurança.....	3
2.	Informações sobre o produto.....	5
2.1	Conteúdo do kit.....	5
2.2	Reagentes e equipamento a fornecer pelo utilizador.....	6
2.3	Armazenamento, aspeto e prazo de validade	6
2.4	Utilização prevista.....	7
2.5	Informações e especificações do produto	7
2.6	Princípio e procedimento	8
3.	Extração de ácido nucleico com o kit RTP® Pathogen	8
3.1	Antes de iniciar um protocolo	8
3.2	Amostragem e armazenamento do material inicial	9
3.3	Preparação dos materiais iniciais.....	10
3.3.1	Soro, plasma, outros líquidos corporais sem células	10
3.3.2	Zaragatoas.....	11
3.3.3	Amostras de fezes (sobrenadante).....	11
3.3.4	Bactérias cultivadas	11
3.3.5	Urina	11
3.3.6	Secreção traqueal, BAL, expetoração	12
3.3.7	Biópsias de tecidos	12
3.3.8	Sobrenadantes de culturas celulares	12
3.4	Protocolo curto do RTP® Pathogen Kit	13
3.5	Protocolo: Isolamento simultâneo de ADN bacteriano e ADN/ARN viral de amostras líquidas	14
4.	Apêndice.....	15
4.1	Resolução de problemas	15
4.2	Garantia.....	16
4.3	Símbolos utilizados no produto e na rotulagem.....	16
4.4	Outros documentos e informações complementares	17
4.5	Informações para encomenda.....	17

1. Instruções de segurança

Certifique-se de que qualquer pessoa que utilize este produto recebeu instruções sobre as práticas gerais de segurança para laboratórios, bem como as informações de segurança fornecidas neste documento.

- Quando e enquanto trabalhar com produtos químicos, use sempre vestuário de proteção, luvas descartáveis e óculos de segurança.
- Substituir sempre as pontas de pipeta entre transferências de líquidos. Para evitar a contaminação cruzada, recomendamos a utilização de pontas de pipeta com barreira de aerossóis.
- Não reutilizar os consumíveis.
- Descartar as luvas se ficarem contaminadas.
- Não combinar componentes de kits diferentes.
- Evitar a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para minimizar o risco de infecções causadas por material potencialmente infeccioso, recomendamos que se trabalhe em câmara de fluxo laminar até as amostras serem lisadas.

Antes de manusear produtos químicos, leia e compreenda todas as fichas de dados de segurança (FDS) aplicáveis. Estas estão disponíveis em www.invitek.com.

Elimine os resíduos do kit e os fluidos residuais em conformidade com os regulamentos do seu país e consulte novamente a FDS. A Invitek Diagnostics não realizou testes nos resíduos líquidos gerados pelo kit para detetar materiais infecciosos residuais. Embora a contaminação dos resíduos líquidos com materiais infecciosos residuais seja altamente improvável, esta não pode ser completamente excluída. Por conseguinte, os resíduos líquidos devem ser considerados infecciosos e devem ser manuseados e eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais

As frases de risco e de segurança da Comunidade Europeia aplicadas aos componentes do **RTP® Pathogen Kit** estão enumeradas a seguir:

Extraction Tubes



Perigo

Contém: cloreto de amónio; brometo de hexadeciltrimetilamónio

Advertências de perigo

H302 - Nocivo por ingestão.

H315 - Provoca irritação cutânea.

H318 - Provoca lesões oculares graves.

H373 - Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

H410 - Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Recomendações de prudência

P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 - Lavar as mãos, os antebraços e o rosto cuidadosamente após manuseamento.

P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P273 - Evitar a libertação para o ambiente.

P280 - Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial/protecção auditiva.

P301+P312 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P302+P352 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água.

P305+P351+P338 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com

água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

P310 - Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P314 - Em caso de indisposição, consulte um médico.

P321 - Tratamento específico (ver as instruções suplementares de primeiros socorros no presente rótulo).

P330 - Enxaguar a boca.

P332+P313 - Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

P362+P364 - Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num ponto de recolha de resíduos perigosos ou especiais, de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

Declarações EUH:

EUH208 - Contém Proteinase, Tritirachium album serine (39450-01-6). Pode provocar uma reacção alérgica.

Wash Buffer R1



Perigo

Contém: tiocianato de guanidínio

Advertências de perigo

H302 - Nocivo por ingestão.

H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Recomendações de prudência

P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 - Lavar as mãos, os antebraços e o rosto cuidadosamente após manuseamento.

P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P273 - Evitar a libertação para o ambiente.

P280 - Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial/protecção auditiva.

P301+P312 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P301+P330+P331 - EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.

P303+P361+P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.

P304+P340 - EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num ponto de recolha de resíduos perigosos ou especiais, de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

Informações médicas de emergência podem ser obtidas 24 horas por dia no infotrac, www.infotrac.net:

fora dos EUA: 1 - 352 - 323 - 3500

nos EUA: 1 - 800 - 535 - 5053

2. Informações sobre o produto

2.1 Conteúdo do kit

	50 preparações	250 preparações
N.º de catálogo	1040500200	1040500300
Extraction Tube	50 unidades	250 unidades
Resuspension Buffer R	30 ml/garrafa	150 ml/garrafa
Binding Solution (Preencher com isopropanol a 99,7%)	garrafa vazia (Volume final 30 ml)	garrafa vazia (Volume final 120 ml)
Wash Buffer R1	20 ml/garrafa (volume final 40 ml)	80 ml/garrafa (volume final 160 ml)
Wash Buffer R2	12 ml/garrafa (Volume final 60 ml)	50 ml/garrafa (Volume final 250 ml)
Elution Buffer R	15 ml/garrafa	60 ml/garrafa
RTA Spin Filter Set	50 unidades	250 unidades
RTA Receiver Tubes	150 unidades	750 unidades
1.5 ml Receiver Tubes	50 unidades	250 unidades
Protocolo curto	1 folheto	1 folheto

2.2 Reagentes e equipamento a fornecer pelo utilizador

Equipamento de laboratório:

- Microcentrífuga (*todos os protocolos foram validados com uma centrífuga 5415 D Eppendorf*)
- Opcional: centrífuga para 15 ou 50 ml
- Agitador térmico (37°C - 95°C)
- Proveta graduada (250 ml)
- Luvas descartáveis
- Pipeta e pontas de pipeta
- Agitador vortex
- Tubos de reação (1,5 ml, 2,0 ml)

Líquidos e solventes:

- Água livre de DNase/RNase ou 1 x PBS para ajustar o volume da amostra
- Etanol a 96-10% (não desnaturado)
- Isopropanol*
- Opcional (para amostras respiratórias com elevada viscosidade): solução saturada de acetilcisteína (ACC) (200 mg/ml)

*O kit foi validado com 2-Propanol; Rotipuran® >99,7%, p.a., ACS, ISO (Referência 6752) de Carl Roth

*** Possíveis fornecedores de Isopropanol:**

Carl Roth
2-Propanol
Rotipuran® >99,7%, p.a., ACS, ISO
N.º de encomenda 6752

Applichem
2-Propanol para a biologia molecular
N.º de encomenda A3928

Sigma
2-Propanol
N.º de encomenda
59304-1L-F

2.3 Armazenamento, aspeto e prazo de validade

Prazo de validade: Todos os tampões e componentes do kit devem ser armazenados à temperatura ambiente e têm um prazo de validade conforme indicado no rótulo exterior da embalagem do kit.

Após a abertura, os componentes individuais do kit, bem como os componentes preparados em conformidade antes da primeira utilização, têm um prazo de validade de 3 meses.

Antes de cada utilização, certifique-se de que todos os componentes estão à temperatura ambiente. Se houver precipitados relacionados com a temperatura nas soluções, dissolva-os por aquecimento cuidadoso (até 30°C).

A temperatura ambiente (TA) é definida como um intervalo de 15-30°C.

Wash Buffer R1 e Wash Buffer R2: após adicionar etanol ao frasco, este deve ser firmemente fechado e armazenado à temperatura ambiente.

Binding Solution: após adicionar isopropanol ao frasco vazio, este deve ser firmemente fechado e armazenado à temperatura ambiente .

2.4 Utilização prevista

O **RTP® Pathogen Kit** é um kit de extração de ácidos nucleicos baseado na tecnologia de colunas de purificação, destinado ao isolamento e purificação simultâneos de ADN bacteriano e ADN/ARN viral.

O kit pode ser utilizado para uma variedade de tipos de amostras humanas, tais como soro e plasma (de sangue estabilizado em EDTA ou citrato, mas não em heparina), líquido lavado de esfregaços, expetoração pré-tratada, BAL, secreção traqueal, sobrenadante de suspensão de fezes, bactérias cultivadas, sobrenadantes de culturas celulares, material/tecido de biopsia, urina e outros fluidos corporais sem células.

O produto não é adequado para o uso com amostras de sangue heparinizado. O produto destina-se exclusivamente à utilização por profissionais, tais como técnicos de laboratório, médicos e biólogos com formação em técnicas de biologia molecular e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

2.5 Informações e especificações do produto

Material inicial	Rendimento	Qualidade	Tempo
- Soro, plasma, outros líquidos corporais sem células, urina - zarcatoas (secas, estabilizadas) - sobrenadante de suspensões de fezes - bactérias cultivadas - secreção traqueal, BAL (lavado broncoalveolar), expetoração - sobrenadante de cultura celular Até 10 mg de amostra de tecido	Dependendo da amostra (armazenamento e origem)	dependendo do tipo de amostra, ácidos nucleicos alvo	aprox. 20 min (exclui lise)

O rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos purificados dependem do tipo de amostra, da sua origem, do transporte, do armazenamento, da idade e da titulação viral.

O kit é adequado para amostras de plasma e soro estabilizadas em EDTA ou citrato, mas não em heparina.

Para a determinação do rendimento, deve ser tido em consideração que os ácidos nucleicos purificados com este kit contêm Carrier RNA (5 µg por 200 µl de amostra), que representa a maioria dos ácidos nucleicos presentes no eluato. Especialmente os ácidos nucleicos virais de amostras biológicas são normalmente muito pouco concentrados e, por conseguinte, quase impossíveis de quantificar fotometricamente. Recomenda-se a utilização da tecnologia de RT-PCR quantitativa para a determinação do rendimento.

O **RTP® Pathogen Kit** oferece um procedimento eficiente para o isolamento de ácidos nucleicos de alta qualidade. O kit foi desenvolvido para o isolamento simultâneo de ADN/ARN viral e de ADN bacteriano utilizando um protocolo com colunas de centrifugação que inclui etapas de lise, ligação, lavagem, eluição.

Aplicações subsequentes:

O rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos isolados são geralmente adequados para diversas aplicações de diagnóstico molecular, tais como técnicas de PCR, NGS e métodos de

hibridação. As aplicações subsequentes devem ser efetuadas de acordo com as especificações dos respectivos fabricantes.

2.6 Princípio e procedimento

1. Lise das amostras

O kit contém Extraction Tubes constituídos por uma mistura liofilizada de Carrier RNA, Proteinase K, enzimas líticas e Lysis Buffer para efetuar a lise da amostra num passo único. Para iniciar o procedimento de extração, basta adicionar a amostra ao Extraction Tube. As amostras são lisadas a diferentes temperaturas elevadas, com agitação constante.

2. Ligação de ácidos nucleicos

Ao adicionar Binding Solution ao lisado, são ajustadas as condições ótimas de ligação. Cada lisado é então aplicado a um RTA Spin Filter e os ácidos nucleicos são adsorvidos à membrana.

3. Lavagem para remoção de contaminações residuais

Os contaminantes são eficientemente removidos utilizando o Wash Buffer R1 e o Wash Buffer R2, enquanto os ácidos nucleicos permanecem ligados à membrana.

4. Eluição de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são eluídos do RTA Spin Filter utilizando 60 - 200 µl de Elution Buffer R.

3. Extração de ácido nucleico com o kit RTP® Pathogen

3.1 Antes de iniciar um protocolo

Quando utilizar o kit pela primeira vez, certifique-se de que todos os tampões e reagentes estão preparados conforme indicado:

Preparações de tampão antes da primeira utilização: 50 preparações
Binding Solution (garrafa vazia): Adicionar 30 ml de isopropanol a 99,7% (grau de biologia molecular) à garrafa. Manter a garrafa bem fechada.
Wash Buffer R1: Adicionar 20 ml de etanol a 96-100% à garrafa e misturar bem. Manter a garrafa bem fechada.
Wash Buffer R2: Adicionar 48 ml de etanol a 96-100% à garrafa. Manter a garrafa bem fechada.
Preparações de tampão antes da primeira utilização: 250 preparações
Binding Solution (garrafa vazia): Adicionar 120 ml de isopropanol a 99,7% (grau biológico molecular) na garrafa, mantendo sempre a garrafa bem fechada.
Wash Buffer R1: Adicionar 80 ml de etanol a 96-100% à garrafa e misturar bem. Manter a garrafa bem fechada.
Wash Buffer R2: Adicionar 200 ml de etanol a 96-100% à garrafa e misturar bem. Manter a garrafa bem fechada.

- Ajustar o agitador térmico para 37°C.
- Ajustar o agitador térmico/blocos de aquecimento para 65°C e 95°C
- Aquecer o volume necessário de **Elution Buffer R** a 65°C (são necessários 60 - 200 µl de **Elution Buffer R** por amostra).
- Determinar o número de reações necessárias, incluindo os controlos, e rotular a quantidade necessária de Filtros Spin RTA (tampa) e a quantidade necessária de 1,5 ml Receiver Tubes (por amostra: é necessário 1 Receiver Tubes).

Controlo da extração

Consulte as instruções do fabricante para determinar a quantidade ideal de controlo de extração para aplicações específicas subsequentes.

O ADN ou ARN do controlo de extração deve ser adicionado ao lisado após o passo de aquecimento. Para otimizar a eficiência da purificação, as moléculas do controlo de extração devem ter um comprimento superior a 100 nucleótidos, uma vez que as moléculas mais pequenas não são recuperadas eficazmente.

3.2 Amostragem e armazenamento do material inicial

Armazenar as amostras corretamente é fundamental para garantir rendimentos reprodutíveis e elevados. Os rendimentos podem variar em função de fatores como a saúde do dador, a idade e tipo de amostra, as condições de transporte e a conservação.

Devem evitar-se ciclos repetidos de congelação-descongelação das amostras para evitar a degradação dos ácidos nucleicos. Em geral, os melhores resultados são obtidos com amostras frescas. Recomenda-se que sejam tidas em conta orientações técnicas, como, por exemplo, as normas CEN/TS e ISO, sobre o processo de pré-exame para o diagnóstico molecular no âmbito do Regulamento Europeu de Dispositivos Médicos de Diagnóstico in Vitro (IVDR), conforme salientado em G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Soro, plasma, outros líquidos corporais sem células: Podem ser utilizadas amostras de soro ou plasma derivados de sangue total venoso (tratado com anticoagulantes como EDTA ou citrato, mas não com heparina), bem como amostras de líquido sinovial ou outros líquidos corporais sem células. O sangue total não deve ser agitado em vórtex para evitar a hemólise. Deixar os tubos de soro repousar durante pelo menos 30 minutos antes da centrifugação. Seguir as instruções do sistema de colheita de sangue para a preparação de soro ou plasma. Recomenda-se a separação do plasma/soro por centrifugação no prazo de 12 h. Os sobrenadantes obtidos com sistemas sem separador de gel devem ser transferidos para tubos de amostras novos. Para armazenamento a curto prazo, as amostras podem ser mantidas em gelo durante 1-2 horas. Durante um período máximo de 24 horas, as amostras podem ser armazenadas a -20°C. Para armazenamento a longo prazo, recomenda-se a congelação das amostras em alíquotas a -80°C. Os ciclos repetidos de congelação-descongelação podem afetar negativamente a integridade da amostra e causar, por exemplo, a desnaturação/precipitação de proteínas, resultando numa potencial redução do rendimento, da qualidade ou dos títulos virais. Além disso, os crioprecipitados formados durante os ciclos de descongelação-descongelação podem causar problemas. Se for visível um crioprecipitado, centrifugar a 6.800 x g durante 3 min. O sobrenadante límpido deve ser utilizado imediatamente.

Zaragatoas:

Zaragatoas secas: preparar as amostras conforme descrito no método de preparação de amostras correspondente. Armazenar a seco a 4-8°C.

Zaragatoas em meio de estabilização: o líquido de estabilização pode ser manuseado como fluido corporal livre de células. Tenha em atenção que alguns agentes de estabilização podem reduzir o rendimento devido à incompatibilidade com a química utilizada no kit. Armazenar de acordo com os requisitos do fabricante.

Amostras de fezes: As amostras contêm DNases e RNases que podem causar rapidamente a degradação do ADN e do ARN. Por conseguinte, as amostras devem ser armazenadas congeladas a -80°C.

Bactérias cultivadas: Após o cultivo, as bactérias devem ser sedimentadas e congeladas a -20°C ou -80°C para armazenamento a longo prazo. A ressuspensão é descrita no método de preparação de amostras correspondente.

Urina: Dependendo do título de bactérias e da aplicação, recomenda-se um volume inicial de 15-50 ml de urina. Centrifugar a amostra para sedimentar as bactérias e remover completamente o sobrenadante (as contaminações com ureia podem inibir as reações de PCR). Para algumas aplicações, a urina fresca pode ser utilizada diretamente.

Secreção traqueal / BAL / Expetoração: As amostras contêm DNases e RNases, que podem causar rapidamente a degradação do ADN e do ARN. Por conseguinte, as amostras devem ser armazenadas congeladas a -80°C.

Biópsias de tecidos: As amostras devem ser imediatamente congeladas e armazenadas a -20°C ou -80°C. Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados. A quantidade de ADN purificado depende do tipo de material de partida. Descongelar a amostra na mistura de lise.

Sobrenadantes de culturas celulares: Preparar amostras de sobrenadante como outras amostras de fluidos corporais sem células, de acordo com o descrito no método de preparação de amostras correspondente.

3.3 Preparação dos materiais iniciais

De seguida, descreve-se a preparação da lise da amostra para diferentes materiais iniciais. Após a preparação dos materiais iniciais, consultar o capítulo 3.5 "Protocolo: Isolamento simultâneo de ADN bacteriano e ADN/ARN viral a partir de amostras líquidas" para seguir as etapas 1a) ou 1b) do protocolo para continuar, exceto se indicado em contrário.

3.3.1 Soro, plasma, outros líquidos corporais sem células

Misturar sempre bem a amostra antes da extração.

Utilizar até 200 µl de amostra e ajustar o volume para 400 µl com Resuspension Buffer R.

3.3.2 Zaragatoas

a) Zaragatoas secas

Lavar as zaragatoas num frasco adequado com o menor volume possível de PBS ou de Resuspension Buffer R (para as zaragatoas nasofaríngeas, cerca de 400 µl, para as zaragatoas orais, cerca de 600 µl). Apertar a zaragatoa contra a parede interna do frasco para obter o máximo de amostra possível.

Utilizar 400 µl para o protocolo de extração.

Como alternativa, adicionar 400 µl de Resuspension Buffer R no Extraction Tube e lavar a zaragatoa diretamente no tampão de lise dissolvido.

b) Zaragatoas em líquido de estabilização

Utilizar 200 µl da solução de estabilização e ajustar o volume para um total de 400 µl com Resuspension Buffer R. Enxaguar e apertar a zaragatoa contra a parede interna do frasco antes de a retirar.

Alguns meios de estabilização podem interferir com a reação de lise (se tiver alguma dúvida, consulte as FAQ ou contacte o apoio ao cliente).

3.3.3 Amostras de fezes (sobrenadante)

a) Extração de ácidos nucleicos de vírus

Para preparar o sobrenadante, transferir 100 µl / 100 mg de amostra de fezes para um frasco de 2 ml e adicionar 900 µl de Resuspension Buffer R. Agitar em vórtex durante 30 segundos, seguido de um passo de centrifugação de 1 min a 12.000 x g. Utilizar até 200 µl de sobrenadante e ajustar o volume para 400 µl com Resuspension Buffer R. Evitar partículas sólidas na amostra.

b) Extração de ADN bacteriano

Para preparar o sobrenadante, transferir 100 µl / 100 mg de amostra de fezes para um frasco de 2 ml e adicionar 300 µl de Resuspension Buffer R. Agitar em vórtex durante 30 s, seguido de um passo de centrifugação de 1 min a 1.000 x g. Utilizar até 200 µl de sobrenadante e ajustar o volume para 400 µl com Resuspension Buffer R. Evitar partículas sólidas na amostra.

3.3.4 Bactérias cultivadas

Transferir 1 ml da cultura bacteriana para um tubo 2.0 ml Safe-Lock-Tube. Centrifugar durante 2 minutos a 10.000 x g e remover completamente o sobrenadante. Ressuspender o sedimento em 400 µl de Resuspension Buffer R.

3.3.5 Urina

Dependendo do título da bactéria e da aplicação, recomenda-se um volume inicial de 15-50 ml de urina. Centrifugar a amostra para sedimentar as bactérias e remover completamente o sobrenadante (as contaminações com ureia podem inibir as reações de PCR).

Ressuspender o pellet de bactérias em 400 µl de Resuspension Buffer R.

Para algumas aplicações, pode ser utilizada diretamente urina fresca: Utilizar até 200 µl de amostra e ajustar o volume para 400 µl com Resuspension Buffer R e iniciar o protocolo de extração.

3.3.6 Secreção traqueal, BAL, expetoração

a) Amostras não viscosas ou de baixa viscosidade

Misturar sempre bem a amostra antes da extração.

Utilizar até 200 µl de amostra e ajustar o volume para 400 µl com o Resuspension Buffer R.

b) Isolamento de bactérias de amostras viscosas

Transferir 150 µl da amostra de expetoração ou 1 ml de secreções traqueais ou BAL para um tubo de segurança e adicionar 150 µl ou 1 ml de solução saturada de acetilcisteína (ACC), respetivamente (o rácio amostra/tampão deve ser de 1:1).

Incubar durante 10 minutos a 95°C, agitando continuamente.

Centrifugar a 10.000 x g durante 5 min. Deitar fora o sobrenadante.

Resuspender o sedimento bacteriano em 400 µl de PBS ou Resuspension Buffer R.

c) Isolamento de ADN/ARN viral de amostras viscosas

Transferir 150 µl da amostra para um tubo de segurança e adicionar 150 µl de solução saturada de acetilcisteína (ACC) à amostra (o rácio amostra/tampão deve ser de 1:1).

Incubar durante 10 minutos a 95°C, agitando continuamente.

Deixar arrefecer a amostra.

Utilizar até 200 µl de amostra e ajustar o volume para 400 µl com o Resuspension Buffer R.

3.3.7 Biópsias de tecidos

Colocar 400 µl de Resuspension Buffer R no Extraction Tube. Adicionar 1-10 mg de amostra de biópsia de tecido ao tampão de lise dissolvido.

Para a lise de tecidos difíceis de lisar, como a cartilagem, músculo do rim e o músculo cardíaco, recomenda-se a utilização de esferas de zircónio.

Após o tratamento mecânico, incubar durante 10 minutos a 65°C, agitando continuamente.

Incubar durante 10 minutos a 95°C, agitando continuamente.

Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 x g e transferir o sobrenadante para um novo tubo.

Evitar partículas sólidas.

Siga o passo 2 do protocolo para continuar

3.3.8 Sobrenadantes de culturas celulares

Utilizar até 200 µl de amostra e ajustar o volume para 400 µl com o Resuspension Buffer R.

3.4 Protocolo curto do RTP® Pathogen Kit

Lise das amostras

Consultar o capítulo 3.3 "Preparação do materiais iniciais" para o pré-tratamento específico da amostra.



1. Adicionar 400 µl de material de amostra de volume ajustado ao Extraction Tube

Efetuar os seguintes passos de aquecimento num termobloco, agitando continuamente:

a) Isolamento simultâneo de ácidos nucleicos bacterianos e virais:

Incubar 10 min a 37°C

Incubar 15 min a 65°C

Opcional: Incubar 10 min a 95°C

b) Isolamento de ácidos nucleicos virais:

Incubar 10 min a 65°C

Opcional: incubar 10 min a 95°C

Adicionar o controlo de extração após a lise.

Ligação de ácidos nucleicos

2. Adicionar 400 µl de **Binding Solution** e misturar pipetando para cima e para baixo ou agitando em vórtex.
Transferir a amostra para RTA Spin Filter Set
Incubar durante 1 min à temperatura ambiente
Centrifugar 2 minutos a 11.000 x g

Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e colocar o RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube.

Lavagem para remoção de contaminações residuais

3. Adicionar 500 µl de **Wash Buffer R1**, centrifugar 1 min a 11.000 x g
Descartar o tubo recetor RTA com o filtrado e coloque o filtro de centrifugação RTA num novo tubo recetor RTA.
4. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2**, centrifugar 1 min a 11.000 x g
Descartar o tubo recetor RTA com o filtrado e coloque o filtro de centrifugação RTA num novo tubo recetor RTA.
5. Centrifugar 4 min. à velocidade máxima para remover o etanol residual
Descartar o tubo recetor RTA com o filtrado.

Eluição de ácidos nucleicos

6. Colocar o filtro rotativo num tubo recetor de 1,5 ml
Adicionar 60 µl de **Elution Buffer R** (pré-aquecido a 65°C) diretamente ao RTA Spin Filter.
Incubar 1 min à temperatura ambiente e centrifugar 1 min a 11.000 x g

Descartar o RTA Spin Filter e armazenar os ácidos nucleicos eluídos em gelo.

3.5 Protocolo: Isolamento simultâneo de ADN bacteriano e ADN/ARN viral de amostras líquidas

Consultar o capítulo 3.3 "Preparação do material inicial" para o pré-tratamento específico da amostra.

1. Adicionar 400 µl de material de amostra ao **Extraction Tube**. Dependendo do material de partida, o volume da amostra deve ser ajustado para 400 µl com **Resuspension Buffer R** ou tampão PBS, agitar rapidamente no vórtex.

Dependendo do tipo de amostra e do ácido nucleico alvo, efetuar os passos em a) ou b) num agitador térmico, agitando continuamente:

a) Isolamento de ADN bacteriano ou isolamento simultâneo de ácidos nucleicos bacterianos e virais

Incubar 10 min a 37°C.

Incubar 15 min a 65°C.

Para bactérias difíceis de lisar (por exemplo, micobactérias) ou tecidos, recomenda-se uma incubação adicional durante 10 min a 95°C.

b) Isolamento de ácidos nucleicos virais

Incubar 10 min a 65°C.

Para amostras difíceis de lisar, como tecidos, recomenda-se uma incubação adicional de 10 min a 95°C.

Nota: Se pretender adicionar ácidos nucleicos para controlo da extração, adicione-os agora, antes da etapa de ligação.

2. Adicionar 400 µl de **Binding Solution** e misturar completamente a amostra, pipetando para cima e para baixo ou agitando em vórtex.
Transferir a amostra para o RTA Spin Filter Set e incubar durante 1 min.
Centrifugar durante 2 minutos a 11.000 x g.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e coloque o RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube.
3. Adicionar 500 µl de **Wash Buffer R1** e centrifugar 1 min a 11.000 x g.
Descartar o tubo recetor RTA com o filtrado e coloque o filtro rotativo RTA num novo tubo recetor RTA.
4. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RTA Spin Filter e centrifugar 1 min a 11.000 x g.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e coloque o RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube.
5. Remover o etanol residual por centrifugação final durante 4 minutos à velocidade máxima.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.
6. Colocar o filtro Spin num tubo recetor de 1,5 ml e adicionar 60 µl do **Elution Buffer R** (pré-aquecido a 65°C) diretamente na superfície do RTA Spin Filter.
Incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

4. Apêndice

4.1 Resolução de problemas

Problema	Causa possível	Recomendação
Baixa quantidade de ácidos nucleicos	Lise celular insuficiente	Aumentar o tempo de lise A agitação contínua melhora a eficiência da lise Reduzir a quantidade de material de partida para evitar a sobrecarga da coluna
	Eluição incompleta	Aumentar o tempo de incubação com o Elution Buffer R pré-aquecido para 5-10 min Eluir duas vezes com 100 µl de Elution Buffer R Utilizar um volume mais elevado de Elution Buffer R
	Baixa concentração de ácido nucleico na amostra	Eluir os ácidos nucleicos com um volume menor de Elution Buffer R ; não utilizar volumes inferiores a 40 µl
	Armazenamento incorreto do material inicial	Assegurar que o material inicial é corretamente armazenado. Evitar ciclos repetidos de descongelação-congelação do material de amostra.
	Tampões de lavagem preparados incorretamente	Assegurar que a quantidade correta de etanol/isopropanol é adicionada aos Tampões de Lavagem e que todas as soluções são armazenadas firmemente fechadas.
Ácidos nucleicos degradados	Material antigo	Assegurar que o material inicial é armazenado em condições adequadas (-20°C/-80°C).
	Transferência de etanol durante a eluição	Aumentar o tempo da etapa de secagem para remover o etanol.
Os ácidos nucleicos não têm um bom desempenho em aplicações a jusante (por exemplo, PCR em tempo real ou NGS)	Transferência de sal durante a eluição	Verificar se existem precipitados de sal nos Wash Buffers . Se forem visíveis quaisquer precipitados, dissolvê-los aquecendo cuidadosamente até 30°C Assegurar que os Wash Buffers estão à temperatura ambiente antes da utilização.
	Lise celular insuficiente	Ver acima
Resíduos coloridos no filtro RTA Spin após a lavagem	Lavagem ineficaz	Repetir a lavagem
	Tampões de lavagem preparados incorretamente	Ver acima

4.2 Garantia

A Invitek Diagnostics garante o funcionamento correto do kit para as aplicações descritas neste manual e de acordo com a utilização prevista. Em conformidade com o Sistema de Gestão da Qualidade da Invitek Diagnostics, certificado pela norma EN ISO 13485, o desempenho de todos os componentes do kit foi testado para garantir a qualidade do produto.

Quaisquer problemas, incidentes ou defeitos devem ser comunicados à Invitek Diagnostics imediatamente assim que forem detectados. Após a receção, inspecione o produto para garantir que está completo e intacto. Em caso de discrepâncias, o utilizador deve informar imediatamente a Invitek Diagnostics por escrito. Modificações no kit e nos protocolos, bem como usos que se desviem do propósito original, não estão cobertos por qualquer garantia.

A Invitek Diagnostics reserva-se o direito de mudar, alterar ou modificar qualquer produto para melhorar o seu desempenho e design em qualquer momento.

A Invitek Diagnostics garante os produtos conforme estabelecido nos Termos e Condições Gerais disponíveis em www.invitek.com. Caso tenha alguma dúvida, contacte techsupport@invitek.com

4.3 Símbolos utilizados no produto e na rotulagem

	Fabricante
	Número do lote
	Identificador único de um dispositivo médico
	Número de catálogo
	Data de expiração
	Consultar o manual de instruções
	Limitação da temperatura
	Não reutilizar
	Quantidade de preparações de amostras
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Data de fabrico
	Marcação CE de Conformidade

4.4 Outros documentos e informações complementares

Visite www.invitek.com para obter mais informações sobre:

- FAQs e dicas de resolução de problemas
- Manuais em diferentes línguas
- Fichas de dados de segurança (FDS)
- Suporte Web
- Vídeos de produtos

Se, apesar da leitura atenta do manual de instruções e de outras informações, continuar a necessitar de assistência, contacte-nos através do endereço techsupport@invitek.com ou o revendedor responsável por si.

4.5 Informações para encomenda

Produto	Tamanho da embalagem	N.º de catálogo
RTP® Pathogen Kit	50 preparações	1040500200
RTP® Pathogen Kit	250 preparações	1040500300

Histórico de revisões

Revisão	Data	Descrição
DE 806.01	2025-04-22	Novo documento



INVITEK
diagnostics

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6
3460-070 Tondela
Portugal

Phone: +351 232 817 817

GERMANY

Haynauer Str. 60, 12249
Berlin, Germany

info@invitek.com
www.invitek.com