

Instruções de utilização Invisorb® Spin Universal Kit

INVITEK
diagnostics



InviSorb®

Língua: PT



REF 1050100200
1050100300

 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 **InviSorb® Spin Universal Kit** da Invitek Diagnostics.

O produto destina-se ao isolamento manual de ácidos nucleicos (ADN genómico, ADN bacteriano, ADN/ARN viral) 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 equipamentos a serem fornecidos 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 InviSorb® Spin Universal Kit.....	9
3.1	Antes de iniciar um protocolo.....	9
3.2	Amostragem e armazenamento do material inicial	10
3.3	Preparação dos materiais iniciais.....	12
3.3.1	Soro, plasma, outros líquidos corporais sem células	12
3.3.2	Sangue	12
3.3.3	Zaragatoa.....	12
3.3.4	Amostras de fezes (sobrenadante)	12
3.3.5	Bactérias cultivadas	13
3.3.6	Urina.....	13
3.3.7	Secreção traqueal, BAL, expetoração	13
3.3.8	Biópsias de tecidos	13
3.3.9	Sobrenadantes de culturas celulares	13
3.4	Protocolo curto InviSorb® Spin Universal Kit.....	14
3.5	Protocolo: Isolamento simultâneo de ácidos nucleicos (ADN e ARN) de amostras líquidas	15
4.	Apêndice.....	17
4.1	Resolução de problemas.....	17
4.2	Garantia.....	18
4.3	Símbolos utilizados no produto e na rotulagem	18
4.4	Outros documentos e informações complementares	19
4.5	Informações para encomenda	19

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 **InviSorb® Spin Universal Mini Kit** estão enumeradas a seguir:

Proteinase K



Perigo

Advertências de perigo

H315 - Provoca irritação cutânea.

H319 - Provoca irritação ocular grave.

H334 - Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias.

H335 - Pode provocar irritação das vias respiratórias.

Recomendações de prudência

P261 - Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

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

P271 - Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.

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

P284 - Usar protecção respiratória.

P302+P352 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente 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.

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.

P312 - Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

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.

Lysis Buffer HLT



Atenção

Contém: cloreto de guanidínio

Advertências de perigo

H302 - Nocivo por ingestão.

H315 - Provoca irritação cutânea.

H319 - Provoca irritação ocular grave.

Recomendações de prudência

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

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

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

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.

P337+P313 - Caso a irritação ocular persista: 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.

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	1050100200	1050100300
Lysis Buffer HLT	15 ml/garrafa	60 ml/garrafa
Proteinase K	1 frasco para 1,1 ml de solução de trabalho	3 frascos para 3 x 2 ml de solução de trabalho
Carrier RNA	1 frasco para 1,2 ml de solução de trabalho	3 frascos para 3 x 2 ml de solução de trabalho
RNase Free Water	2 x 2 ml/frasco	15 ml/garrafa
Binding Solution (Preencher com isopropanol a 99,7%)	garrafa vazia (volume final 15 ml)	garrafa vazia (volume final 80 ml)
Wash Buffer HLT	30 ml/garrafa (volume final 50 ml)	105 ml/garrafa (volume final 175 ml)
Wash Buffer	2 x 18 ml/garrafa (volume final 2 x 60 ml)	2 x 60 ml/garrafa (volume final 2 x 200 ml)
Elution Buffer M	30 ml/garrafa	120 ml/garrafa
RTA Spin Filter Set	50 unidades	250 unidades
RTA Receiver Tubes	100 unidades	500 unidades
1.5 ml Receiver Tubes	50 unidades	250 unidades
2.0 ml Safe-Lock-Tubes	50 unidades	250 unidades
Protocolo curto	1 folheto	1 folheto

2.2 Reagentes e equipamentos a serem fornecidos 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 vórtex
- 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)
- Opcional: Lysozyme (10 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
Referência 6752

Applichem
2-Propanol para a biologia molecular
Referência A3928

Sigma
2-Propanol
Referência 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: depois de adicionar etanol, deve ser firmemente fechado e armazenado à temperatura ambiente.

Tampão de Lavagem HLT e Binding Solution: após a adição de isopropanol, devem ser firmemente fechados e armazenados à temperatura ambiente.

Carrier RNA: uma vez dissolvido em água livre de DNase/RNase, o Carrier RNA deve ser armazenado a -20°C.

Proteinase K: uma vez dissolvida em água livre de DNase/RNase, a Proteinase K pode ser armazenada a 2 - 8°C durante um máximo de dois meses. Para uma conservação mais longa, manter a -20°C, congelar-descongelar apenas uma vez.

2.4 Utilização prevista

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

O kit pode ser utilizado para uma variedade de tipos de amostras humanas, tais como sangue total venoso fresco ou congelado anticoagulado com EDTA ou citrato ou as respectivas preparações de plasma, soro, líquido lavado de zangaratoas, expetoração pré-tratada, BAL, secreção traqueal, bactérias cultivadas, sobrenadante de suspensão de fezes, líquido cefalorraquidiano, sobrenadantes de cultura de células, 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
Até 200 µl - Soro, plasma, outros líquidos corporais sem células, urina - zangaratoas (secos, estabilizados) - sobrenadante de suspensões de fezes - bactérias cultivadas - secreção traqueal, BAL, expetoração - sobrenadante de cultura celular Até 100 µl: - sangue fresco ou congelado (estabilizado com EDTA/citrato, mas <u>não com</u> heparina) Até 10 mg de amostra de tecido	Dependendo da amostra (armazenamento e origem) Sangue total: em média 1 µg de ADN	ADN genómico do sangue: $A_{260} : A_{280}$ 1.8 - 2.1 Outros tipos de amostras: dependendo do tipo de amostra, o núcleo alvo ácidos	aprox. 30 min para 12 amostras (excluindo lise)

O rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos purificados dependem do tipo de amostra, da sua origem, do transporte, do armazenamento, da idade, do título viral e no caso das amostras de sangue, também da contagem de leucócitos.

Para a determinação do rendimento, deve-se ter em conta que os ácidos nucleicos purificados com este kit contêm *Carrier RNA* (5 µg por 200 µl de amostra), que representa a maior parte dos ácidos nucleicos presentes no eluido. Em particular os ácidos nucleicos virais de amostras

biológicas são geralmente muito pouco concentrados e, por conseguinte, o que torna quase impossível a sua quantificação fotométrica. Recomenda-se a utilização da tecnologia RT-PCR quantitativa para a determinação do rendimento.

O **InviSorb® Spin Universal 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, ADN bacteriano e ADN genómico utilizando um protocolo com colunas de centrifugação que inclui etapas de lise, ligação, lavagem e eluição. .

O kit está validado para contagens de leucócitos entre 3×10^6 - 1×10^7 células/ml . Contagens de células excessivamente elevadas podem levar ao entupimento do *RTA Spin Filter*, resultando em efeitos indesejáveis no processo de purificação. Por conseguinte, recomenda-se considerar o volume de entrada da amostra como um parâmetro durante a implementação do seu protocolo de diagnóstico in vitro. Caso necessário, as amostras podem ser pré-diluídas com PBS ou água livre de DNase/RNase antes do processo de isolamento e purificação.

Aplicações a jusante:

O rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos isolados são, em geral, adequados para diversas aplicações de diagnóstico molecular, tais como técnicas de PCR, NGS, métodos de hibridação e tipagem HLA. As aplicações subsequentes devem ser realizadas de acordo com as especificações dos respetivos fabricantes.

2.6 Princípio e procedimento

1. Lise das amostras

As amostras são lisadas a temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença de *Lysis Buffer HLT*, *Proteinase K* e, opcionalmente, *lisozima* para romper as paredes celulares bacterianas e digerir as proteínas.

A adição de *Carrier RNA* é necessária para melhorar e estabilizar a recuperação do ADN/ARN viral e para purificar quantidades muito pequenas de ácidos nucleicos virais.

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 HLT* e o *Wash Buffer*, enquanto os ácidos nucleicos permanecem ligados à membrana.

4. Eluição de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são eluídos do *RTA Spin Filter* utilizando 100 - 200 µl de *Elution Buffer M*.

3. Extração de ácido nucleico com o InviSorb® Spin Universal Kit

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
Carrier RNA: Ressuspender o Carrier RNA liofilizado, adicionando 1,2 ml de água livre de DNase/RNase ao frasco e misturar bem até que esteja completamente dissolvido (pelo menos 1 minuto).
Proteinase K: Ressuspender a Proteinase K liofilizada adicionando 1,1 ml de água livre de DNase/RNase ao frasco e misturar bem até que esteja completamente dissolvido.
Binding Solution (garrafa vazia): Adicionar 15 ml de isopropanol a 99,7% (grau de biologia molecular) à garrafa. Mantenha a garrafa bem fechada.
Wash Buffer HLT: Adicionar 20 ml de isopropanol a 99,7% ao frasco. Misturar bem, mantendo sempre o frasco firmemente fechado.
Wash Buffer: Adicionar 42 ml de etanol a 96-100% ao frasco. Misturar bem, mantendo sempre o frasco firmemente fechado.
Preparações de tampão antes da primeira utilização: 250 preparações
Carrier RNA: Ressuspender o Carrier RNA liofilizado adicionando 1 ml de água livre de DNase/RNase ao frasco e misturar bem até à dissolução completa (pelo menos 1 minuto). Em seguida, adicionar mais 1 ml de água livre de DNase/RNase .
Proteinase K: Ressuspender a Proteinase K liofilizada adicionando 2 ml de água livre de DNase/RNase ao frasco e misturar bem até dissolver completamente.
Binding Solution (frasco vazio): Adicionar 80 ml de isopropanol a 99,7% (grau biológico molecular) no frasco.
Wash Buffer HLT: Adicionar 70 ml de isopropanol a 99,7% ao frasco. Misturar bem e manter sempre o frasco bem fechado.
Wash Buffer: Adicionar 140 ml de etanol a 96-100% ao frasco. Misturar bem e manter sempre o frasco bem fechado.

- Ajustar o agitador térmico a 65°C.
- Aquecer a o volume necessário de **Elution Buffer M** a 65°C (são necessários 50 - 200 µl de **Elution Buffer M** por amostra).
- Determinar o número de reações necessárias, incluindo os controlos, e rotular a quantidade necessária de *RTA Spin Filter* (tampa) e a quantidade necessária de 1,5 ml *Receiver Tubes* (por amostra: é necessário 1 *Receiver Tube*).

Mistura principal

Para facilitar o manuseamento, recomenda-se a preparação da mistura principal constituída por *Lysis Buffer HLT*, *Proteinase K* e, se necessário, *Carrier RNA*. Prepare um volume que exceda em 5% o número total de reações, para garantir uma margem de segurança.

A mistura principal deve ser preparada imediatamente antes do uso.

Isolamento do ADN genómico, do ADN bacteriano e do ADN/ARN viral:

Por amostra, são necessários 200 µl de *Lysis Buffer HLT*, 20 µl de *proteinase K* e 20 µl de *Carrier RNA*.

Isolamento do ADN genómico:

Por amostra, são necessários 220 µl de *Lysis Buffer HLT* e 20 µl de *proteinase K*. Não é necessário adicionar *Carrier RNA*.

Controlo da extração

Consulte as instruções do fabricante para determinar a quantidade ideal de controlo de extração para a aplicação pretendida.

Volumes pequenos de controlo de extração devem ser combinados com o *Carrier RNA* fornecido, numa única mistura. Os frascos com *Carrier RNA* contêm 1,2 ml ou 2,0 ml de solução-mãe, dependendo do tamanho da embalagem. Adicionar a respectiva quantidade de ácido nucleico de controlo de extração ao *Carrier RNA*; se for necessário um volume elevado (> 25% do volume total de *Carrier RNA*), substituir a quantidade correspondente de água livre de DNase/RNase durante a diluição do *Carrier RNA*.

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 relativo aos Dispositivos Médicos de Diagnóstico *in Vitro* (IVDR), conforme destacado por G. Dagher *et al.* (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Soro, plasma, outros líquidos corporais isentos de 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 livres de 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. Siga as instruções do sistema de colheita de sangue para a preparação de soro ou plasma. Recomenda-se separar o plasma/soro por centrifugação em 12 h após colheita. 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. Para até 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. Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento afetam negativamente a integridade da amostra e causar, por exemplo, a desnaturação/precipitação de proteínas, resultando potencialmente em redução no rendimento, da qualidade ou dos títulos virais. Além disso, os crioprecipitados formados durante os ciclos de descongelamento/descongelamento podem causar problemas. Se um crioprecipitado for visível, centrifugar a 6.800 x *g* durante 3 min. O sobrenadante límpido deve ser utilizado imediatamente.

Sangue: As amostras de sangue (estabilizadas com EDTA ou citrato, mas não heparinizadas) podem ser armazenadas à temperatura ambiente por 2-3 horas. Para armazenamento a curto prazo (até 24 horas), as amostras devem ser armazenadas a 2-8°C. Para armazenamento a longo prazo, recomenda-se a congelação das amostras a -20°C ou -80°C.

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 compactadas 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 bacteriano 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 (contaminações com ureia podem inibir as reações de PCR). Para algumas aplicações, a urina fresca pode ser utilizada diretamente. Para o armazenamento a longo prazo, recomenda-se o congelamento das amostras a -20°C ou -80°C.

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 cultura celular: Preparar amostras de sobrenadante como outras amostras de fluidos corporais, conforme o método de preparação de amostras correspondente. Para armazenamento a longo prazo, recomenda-se a congelação das amostras a -20°C ou -80°C.

3.3 Preparação dos materiais iniciais

A seguir, é descrita a preparação da lise de amostras para diferentes materiais de partida. Utilize 2 ml *Safe-Lock Tubes* para a preparação das amostras, uma vez que estes também são necessários na etapa subsequente de lise. Após a preparação dos materiais iniciais, consulte o capítulo 3.5 "Protocolo: Isolamento simultâneo de ácidos nucleicos (ADN e ARN) de amostras líquidas" para seguir com as etapas 1a) - d) 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 200 µl de amostra para extração. Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, ajustar com PBS Buffer ou água livre de DNase/RNase para um volume final de 200 µl.

3.3.2 Sangue

Misturar sempre bem a amostra antes da extração.

Diluir 100 µl de sangue fresco ou descongelado com 100 µl de água livre de DNase/RNase.

3.3.3 Zaragatoa

a) Zaragatoas secas

Enxágue as zaragatoas num frasco adequado com o menor volume possível de PBS ou água livre de DNase/RNase (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 200 µl da solução lavada para a extração.

Como alternativa, as zaragatoas podem ser diretamente lavados numa mistura de 200 µl de Lysis Buffer HLT, 20 µl de proteinase K, 20 µl de Carrier RNA (opcional para a preparação de ADN genómico) e 200 µl de água sem DNase/RNase. Incubar os zaragatoas durante 5-10 minutos à temperatura ambiente, misturando ocasionalmente. Ter o cuidado de evitar a contaminação cruzada.

b) Zaragatoas em meio de estabilização

Utilizar 200 µl da solução de estabilização para a extração.

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

3.3.4 Amostras de fezes (sobrenadante)

a) Extração de ácidos nucleicos de vírus

Para preparar o sobrenadante, transfira 100 µl / 100 mg de amostra de fezes para um frasco de 2 ml e adicione 900 µl de água sem DNase/RNase. Agitar em vórtex durante 30 segundos, seguido de um passo de centrifugação de 1 minuto a 12.000 x g.

Transferir 200 µl de sobrenadante para um novo frasco para extração da amostra. 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 água sem DNase/RNase. Agitar em vórtice durante 30 s, seguido de um passo de centrifugação de 30 s a 1.000 x g.

Transferir 200 µl de sobrenadante para um novo frasco para extração da amostra. Evitar partículas sólidas na amostra.

3.3.5 Bactérias cultivadas

Transferir 1 ml de uma cultura bacteriana para um tubo 2,0 ml *Safe-Lock-Tubes*. Centrifugar durante 2 minutos a 10.000 x g e remover completamente o sobrenadante. Ressuspender o sedimento em 200 µl de tampão PBS e iniciar a extração da amostra.

3.3.6 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 200 µl de PBS Buffer.

Para algumas aplicações, podem ser utilizados diretamente 200 µl de urina fresca.

3.3.7 Secreção traqueal, BAL, expetoração

a) Amostras não viscosas ou de baixa viscosidade

Misturar sempre bem a amostra antes da extração.

Utilizar 200 µl de amostra para extração. Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, ajustar com PBS Buffer ou água livre de DNase/RNase para um volume final de 200 µl.

b) Isolamento de ADN bacteriano de amostras viscosas

Transferir 150 µl da amostra de expetoração ou 1 ml de secreções traqueais ou BAL para um *Safe LockTube* 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 minutos. Descartar o sobrenadante.

Ressuspender o sedimento bacteriano em 200 µl de PBS ou água livre de DNase/RNase e proceder à extração da amostra.

c) Isolamento de ADN/ARN viral de amostras viscosas

Transferir 150 µl da amostra para um *Safe Lock Tube* 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 200 µl de amostra para extração.

3.3.8 Biópsias de tecidos

Transferir 1 - 10 mg de amostra de biópsia para um 2,0 ml *Safe Lock Tube* e adicionar 200 µl de água livre de DNase/RNase ou PBS, 200 µl de *Lysis Buffer HLT*, 20 µl de *Carrier RNA* (opcional, para amostras com baixo teor de ADN/ARN) e 20 µl de *proteinase K* a cada amostra.

Para a disrupção de tecidos difíceis de lisar, como cartilagem, rins e músculo cardíaco: recomenda-se o uso de *Zirconia Beads* (disponíveis separadamente).

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

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

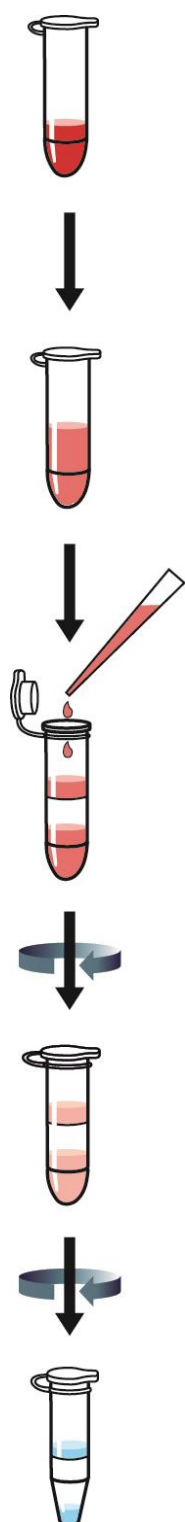
Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 x g e transferir o sobrenadante para um novo tubo.

Continuar com o protocolo de extração na etapa 2, adicionando a *Binding Solution*.

3.3.9 Sobrenadantes de culturas celulares

Utilizar 200 µl de amostra para extração.

3.4 Protocolo curto InviSorb® Spin Universal Kit



Lise das amostras

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

1.a) Purificação de ácidos nucleicos bacterianos

Misturar 200 µl de amostra* com 20 µl de Lysozyme num 2.0 ml Safe-Lock tube

Incubar 10 min a 37°C

Adicionar 20 µl de **Carrier RNA**, 200 µl de **Lysis Buffer HLT** e 20 µl de **Proteinase K**

Incubar 15 min a 65°C, agitando

1.b) Purificação simultânea de ácidos nucleicos bacterianos e virais

Misturar 200 µl de amostra* com 20 µl de Lysozyme num 2.0 ml Safe-Lock tube

Incubar 10 min à temperatura ambiente

Adicionar 20 µl de **Carrier RNA**, 200 µl de **Lysis Buffer HLT** e 20 µl de **Proteinase K**

Incubar 10 min a 65°C, agitando

Incubar 10 min a 95°C, agitando

1.c) Purificação de ácidos nucleicos virais

Misturar 200 µl de amostra* com 200 µl de **Lysis Buffer HLT**, 20 µl de **Carrier RNA** e 20 µl de **Proteinase K** num 2.0 ml Safe-Lock tube

Incubar 10 min a 65°C, agitando

Incubar 10 min a 95°C, agitando

1.d) Purificação do ADN genómico

Misturar 200 µl de amostra* com 220 µl de **Lysis Buffer HLT** e 20 µl de **Proteinase K** num 2.0 ml Safe-Lock tube

Incubar 10 min a 65°C, agitando

Incubar 10 minutos a 95°C, agitando (saltar para amostras de sangue)

*Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, ajustar com PBS ou água livre de DNase/RNase

Ligação dos ácidos nucleicos

2. Adicionar 260 µl de **Binding Solution** e misturar pipetando para cima e para baixo ou agitando em vórtice.

Incubar 5 min à temperatura ambiente

Transferir a amostra para o RTA Spin Filter Set

Centrifugar 1 min a 11.000 x g

Descarte o RTA Receiver Tube com o filtrado e coloque o RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube.

Lavagem para remoção de contaminações residuais

3. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer HLT**, centrifugar 1 min a 11.000 x g
Descarte o RTA Receiver Tube com o filtrado e coloque o filtro de centrifugação RTA num novo tubo recetor RTA

4. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer**, centrifugar 1 min a 11.000 x g
Descarte o filtrado e volte a colocar o RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.

5. Repetir esta etapa de lavagem uma vez

6. Centrifugar 5 min. à velocidade máxima para remover o etanol residual
Deitar fora o RTA Receiver Tube com o filtrado

Eluição dos ácidos nucleicos

7. Colocar o filtro rotativo num tubo recetor de 1,5 ml

Adicionar 50-200 µl de **Elution Buffer M** (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
Deitar fora o RTA Spin Filter e armazenar os ácidos nucleicos eluído em gelo

3.5 Protocolo: Isolamento simultâneo de ácidos nucleicos (ADN e ARN) de amostras líquidas

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

1.a) Lise de amostras para purificação de ácidos nucleicos bacterianos

Misturar 200 µl da amostra ou do sedimento bacteriano ressuspenso com 20 µl de Lysozime num tubo Safe Lock Tube de 2 ml.

Incubar durante 10 minutos a 37°C

Adicionar 20 µl de **Carrier RNA**. Misturar por agitação em vórtex.

Adicionar 200 µl de **Lysis Buffer HLT** e 20 µl de **proteinase K**.

Em alternativa, adicionar 240 µl de Master Mix a cada amostra.

Misturar bem durante 10 segundos, agitando no vórtex, e incubar durante 10-15 minutos a 65°C, agitando continuamente.

Opcional para bactérias difíceis de lisar, como as *micobactérias*: incubar durante 10 min a 95°C

1.b) Lise de amostras para purificação simultânea de ácidos nucleicos bacterianos e virais

Misturar 200 µl da amostra com 20 µl de Lysozime num tubo Safe Lock Tube de 2 ml.

Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Adicionar 20 µl de **Carrier RNA**. Misturar por agitação em vórtice.

Adicionar 200 µl de **Lysis Buffer HLT** e 20 µl de **proteinase K**.

Em alternativa, adicionar µl de Master Mix a cada amostra.

Misturar bem durante 10 segundos, agitando no vórtex, e incubar durante 10 minutos a 65°C, agitando continuamente.

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

1.c) Lise de amostras para purificação de ácidos nucleicos virais

Misturar 200 µl da amostra com 200 µl de **Lysis Buffer HLT**, 20 µl de **Carrier RNA** e 20 µl de **Proteinase K** num tubo Safe Lock de 2 ml.

Em alternativa, adicionar 240 µl de Master Mix a cada amostra.

Misturar bem durante 10 segundos, agitando no vórtex, e incubar durante 10-15 minutos a 65°C, agitando continuamente.

Incubar durante 10 minutos a 95°C

1.d) Lise da amostra para purificação do ADN genómico

Misturar 200 µl da amostra com 220 µl de **Lysis Buffer HLT** e 20 µl de **proteinase K** num tubo Safe Lock de 2 ml.

Em alternativa, adicionar 240 µl de Master Mix a cada amostra.

Misturar bem durante 10 segundos, agitando no vórtex, e incubar durante 10-15 minutos a 65°C, agitando continuamente.

Incubar durante 10 minutos a 95°C (saltar para o isolamento do ADN genómico de amostras de sangue diluídas)

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

2. Adicionar 260 µl de **Binding Solution** e misturar completamente por pipetagem para cima e para baixo ou por agitação em vórtex.
Incubar a amostra à temperatura ambiente durante 5 minutos.
Pegar num conjunto de Spin Filter Set. Transferir a mistura para o RTA Spin Filter.
Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Descarte o RTA Receiver Tube com o filtrado e coloque o RTA Spin Filter num novo tubo recetor RTA.
3. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer HLT** ao RTA Spin Filter e centrifugar 1 min a 11.000 x g.
Descarte o RTA Receiver Tube com o filtrado e coloque o RTA Spin Filter num novo tubo recetor RTA.
4. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer** ao RTA Spin Filter e centrifugar 1 min. a 11.000 x g.
Descarte o filtrado e coloque o filtro RTA Spin no RTA Receiver Tube usado.
5. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer** ao RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min. a 11.000 x g.
Descarte o filtrado e coloque o RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube usado.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 11.000 x g para eliminar completamente o etanol.
Deitar fora o RTA Receiver Tube com o filtrado.
7. Colocar o RTA Spin Filter num tubo de eluição de 1,5 ml.
Adicionar 50 - 200 µl do **Elution Buffer M** pré-aquecido (65°C) diretamente na superfície do RTA Spin Filter.
Incubar à temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto.
Descarte o RTA Spin Filter.
Fechar o 1,5 ml Receiver Tube e armazenar a amostra a uma temperatura entre -20 °C e -80 °C.

4. Apêndice

4.1 Resolução de problemas

Problema	Causa possível	Recomendação
Baixa quantidade de ácidos nucleicos	Lise celular insuficiente	Aumentar o tempo de lise com o Lysis Buffer HLT 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 M pré-aquecido para 5-10 min Eluir duas vezes com 100 µl de Elution Buffer M Utilizar um volume mais elevado de Elution Buffer M
	Baixa concentração de ácidos nucleicos na amostra	Eluir os ácidos nucleicos com um volume menor de Elution Buffer M , não utilizar volumes inferiores a 30 µl
	Armazenamento incorreto do material inicial	Assegurar que o material inicial é corretamente armazenado. Evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento do material de amostra.
	Os tampões de lavagem foram preparados incorretamente	Assegurar que a quantidade correcta de etanol/isopropanol é adicionada aos tampões de lavagem e que todas as soluções são armazenadas firmemente fechadas.
	Volume/concentração de proteinase K demasiado baixo	Certifique-se de que a Proteinase K liofilizada é ressuspendida com o volume adequado de água antes da utilização
Ácidos nucleicos degradados	Armazenamento incorreto do material inicial	Assegurar que a amostra é colhida e armazenada corretamente, Para mais informações, consulte a secção FAQ na nossa página web
	Material antigo	Assegurar que o material inicial é armazenado em condições adequadas (-20°C/80°C-).
Os ácidos nucleicos não têm um bom desempenho em aplicações a jusante	Transferência de etanol durante a eluição	Aumentar o tempo da etapa de secagem para remover o etanol.
	Transferência de sal durante a eluição	Verificar se existem precipitados de sal nos Wash Buffer . Se forem visíveis quaisquer precipitados, dissolvê-los aquecendo cuidadosamente até 30°C Assegurar que os Wash Buffer estão à temperatura ambiente antes da utilização.
Resíduos coloridos no RTA Spin Filter após a lavagem	Lise celular insuficiente	Ver acima
	Lavagem ineficaz	Lavar novamente com Wash Buffer
	Os tampões de lavagem foram 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 detetados. 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 *in vitro*



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)
- Apoio 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
InviSorb® Spin Universal Kit	50 preparações	1050100200
InviSorb® Spin Universal Kit	250 preparações	1050100300

Histórico de revisões

Revisão	Data	Descrição
DE 811.01	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