

Istruzioni per l'uso

InviMag® Universal Kit/ KF96

INVITEK
diagnostics




InviMag®

Lingua: IT



REF 7450300200
7450300250

 5 x 96 preparazioni



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

Note importanti

Grazie per aver acquistato **InviMag® Universal Kit/ KF96** di Invitek Diagnostics.

Il prodotto serve ad isolare in modalità semi-automatica gli acidi nucleici (DNA genomico, DNA batterico, DNA/RNA virale) da una varietà di campioni clinici, utilizzando la tecnologia delle sfere magnetiche.

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.com

Contatto:

Supporto tecnico:

techsupport@invitek.com

GERMANIA

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

+ 49 (0) 30 9489 2908

PORTOGALLO

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

+351 232 817 817

© 2024 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.....	5
2.1	Il kit contiene.....	5
2.2	Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire.....	6
2.3	Conservazione, aspetto e scadenza	7
2.4	Uso previsto.....	7
2.5	Informazioni sul prodotto e specifiche	8
2.6	Principio e procedura.....	9
3.	Estrazione di acidi nucleici con InviMag® Universal Kit KF/ 96	10
3.1	Prima di avviare un protocollo	10
3.2	Campionamento e conservazione del materiale di partenza.....	11
3.3	Preparazione del materiale di partenza.....	13
3.3.1	Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule	13
3.3.2	Sangue	13
3.3.3	Tamponi.....	13
3.3.4	Campioni di feci (surnatante).....	14
3.3.5	Batteri coltivati	14
3.3.6	Urina	14
3.3.7	Secrezione tracheale, BAL, espettorato	15
3.3.8	Surnatanti di colture cellulari.....	15
3.4	Protocollo breve InviMag® Universal Kit/KF96.....	16
3.5	Preparare e caricare il KingFisher™ Flex	17
4.	Appendice	18
4.1	Protocollo passo passo del KingFisher™ Flex	18
4.2	Risoluzione di problemi	21
4.3	Garanzia	22
4.4	Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura	22
4.5	Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive.....	23
4.6	Informazioni sull'ordine.....	23

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.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 **InviMag® Universal Kit/KF96** a cui si applicano sono elencate di seguito come segue:

Proteinase K



Pericolo

Indicazioni di pericolo

H315 - Provoca irritazione cutanea.

H319 - Provoca grave irritazione oculare.

H334 - Può provocare sintomi di allergia o asma o difficoltà respiratorie se inalato.

H335 - Può irritare le vie respiratorie.

Consigli di prudenza

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P284 - Indossare una protezione per le vie respiratorie.

P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P304+P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

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.

P501 - Smaltire il contenuto/recipiente in un punto di raccolta per rifiuti pericolosi o speciali, in conformità alle normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

Lysis Buffer HLT



Attenzione

Contiene: cloruro di guanidinio

Indicazioni di pericolo

H302 - Nocivo se ingerito.

H315 - Provoca irritazione cutanea.

H319 - Provoca grave irritazione oculare.

Consigli di prudenza

P301+P312 - IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.

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

P362+P364 - Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.

P501 - Smaltire il contenuto/recipiente in un punto di raccolta per rifiuti pericolosi o speciali, in conformità alle normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

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 – 50

2. Informazioni sul prodotto

2.1 Il kit contiene

	InviMag® Universal Kit/KF96 5 x 96 preparazioni	InviMag® Universal Kit/ KF96 w/o plastic 5 x 96 preparazioni
N. catalogo	7450300200	7450300250
Lysozyme Buffer	15 ml/fiacone	15 ml/fiacone
Lysozyme	150 mg/fiala	150 mg/fiala
Lysis Buffer HLT	120 ml/fiacone	120 ml/fiacone
Carrier RNA	10 x 1,2 ml di soluzione di lavoro/fiala	10 x 1,2 ml di soluzione di lavoro/fiala
RNAse Free Water	2 x 15 ml/fiacone	2 x 15 ml/fiacone
Proteinase K	10 x 1,1 ml di soluzione di lavoro/fiala	10 x 1,1 ml di soluzione di lavoro/fiala
SNAP Solution	10,5 ml/fiacone	10,5 ml/fiacone
Binding Solution (riempire con isopropanolo al 99,7%)	Flacone vuoto (volume finale 120 ml)	Flacone vuoto (volume finale 120 ml)
Wash Buffer HLT	360 ml/fiacone (volume finale 600 ml)	360 ml/fiacone (volume finale 600 ml)
Wash Buffer II	180 ml/fiacone (volume finale 600 ml)	180 ml/fiacone (volume finale 600 ml)
Wash Buffer M	150 ml/fiacone (volume finale 600 ml)	150 ml/fiacone (volume finale 600 ml)
Elution Buffer M	60 ml/fiacone	60 ml/fiacone
KF96 Tip Comb for DW magnets	Pettini a 5 punte	-
2.0 ml Deep Well Plate	5 x 4 piastre	-
200 µl Elution Plate	5 x 2 piastre	-
Sealing Foils	10 fogli	10
1.5 ml Receiver Tubes	10 x 50 pezzi	10 x 50 pezzi
Short Protocol	1 volantino	1 volantino

2.2 Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire

Attrezzatura da laboratorio:

- KingFisher™ Flex con 96 Deep-Well Head e materiali di consumo:
KingFisher 96, processore di particelle magnetiche, 100-240 V, 50/60 Hz con 96 Deep-Well Head (disponibile presso ThermoFisher Scientific)

KingFisher 96 tip comb

KingFisher 96 KF plate (200 µl)

Piastra DeepWell 2 ml, KingFisher

- Microcentrifuga
- termoshaker (37 °C - 95 °C)
- cilindro di misurazione (250 ml)
- guanti monouso
- Pipette e puntali per pipette (si consigliano puntali con filtro)
- miscelatore Vortex
- opzionale: Provette di reazione (1,5 ml, 15 ml, 50 ml)

Liquidi e solventi:

- DNase/RNase free water o 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)

* **InviMag® Universal Kit/ KF96** 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 M e Wash Buffer II: dopo aver aggiunto l'etanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

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

Carrier RNA: una volta disciolto in DNase/RNase free water, il Carrier RNA deve essere conservato a -20°C.

Proteinase K: una volta disciolto in DNase/RNase free water, il Proteinase K deve essere conservato a -20°C. Per una conservazione più lunga, conservare a -20 °C, congelare e scongelare una sola volta.

Lysozyme: il lisozima liofilizzato deve essere conservato a 2 - 8 °C. Il lisozima disciolto (si consiglia l'aliquota) deve essere conservato a -20°C.

2.4 Uso previsto

InviMag® Universal Kit/ KF96 è per l'isolamento e la purificazione simultanei semiautomatici del DNA genomico, del DNA batterico e del DNA/RNA virale, utilizzando la tecnologia delle sfere magnetiche.

Il kit può essere usato per una varietà di tipi di campioni umani, come sangue intero venoso fresco o congelato anticoagulato con EDTA o citrato o le rispettive preparazioni di plasma, siero, liquido risciacquato da tamponi, espettorato pretrattato, BAL, secreto tracheale, batteri coltivati, surnatante da sospensione di feci, liquido cerebrospinale, surnatanti di colture cellulari, materiale/tessuto bioptico, urina e altri fluidi corporei privi di cellule.

InviMag® Universal Kit/KF96 è convalidato per l'uso su uno strumento KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific). Garantire la funzione corretta e la configurazione dello strumento secondo le istruzioni del produttore. Un uso improprio dello strumento può comprometterne la resa e arrecare potenziali danni allo strumento.

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
Fino a 200 µl: <ul style="list-style-type: none"> • Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule, urina • Tamponi (asciutti, stabilizzati) • Sangue fresco o congelato (EDTA/citrato stabilizzato, ma <u>non</u> eparina) • Surnatante da sospensioni di feci • Batteri coltivati • Secrezione tracheale, BAL, espettorato • Surnatante di colture cellulari 	A seconda del campione (archiviazione e fonte) Sangue intero: 3-6 µg per un contenuto di leucociti 3 x 10 ⁶ to 1 x 10 ⁷ cells/ml	DNA genomico dal sangue: $A_{260} : A_{280}$ 1,8 – 2,1 Altri tipi di campione: in base al tipo di campione, acidi nucleici target	40-60 min, in base al protocollo (incl. 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 e per i campioni di sangue anche dalla conta leucocitaria.

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 kit è validato per la conta dei leucociti di 3x10⁶ - 1x10⁷ cells/ml. Un numero di cellule eccessivamente elevato può portare a effetti indesiderati sul processo di purificazione. Si raccomanda pertanto di considerare il volume di input del campione come parametro durante l'implementazione del protocollo diagnostico in vitro. Se necessario, i campioni possono essere pre-diluiti con PBS o DNase/RNase free water prima del processo di isolamento e purificazione.

Applicazioni a valle:

Il rendimento e la qualità degli acidi nucleici isolati sono in generale adatti a molte applicazioni di diagnostica molecolare come le tecniche di PCR, NGS, metodi di ibridazione e tipizzazione HLA. Le applicazioni a valle dovrebbero essere eseguite secondo le specifiche dei rispettivi produttori.

2.6 Principio e procedura

Lo strumento KingFisher™ Flex si avvale di barre magnetiche per trasportare sfere paramagnetiche con acidi nucleici legati attraverso le diverse fasi di estrazione: lisi, legame, lavaggio ed eluizione. Il processo di purificazione semiautomatico fornisce un metodo riproducibile per il recupero di acidi nucleici altamente puri.

1. Campioni di lisi

I campioni vengono lisati a temperature elevate. La lisi viene eseguita in presenza di Lysis Buffer HLT, Proteinase K e opzionalmente lisozima per rompere le pareti cellulari batteriche e per digerire le proteine.

L'aggiunta di Carrier RNA è necessaria per il potenziamento e la stabilizzazione del recupero del DNA/RNA virale e per purificare quantità molto piccole di acidi nucleici virali.

2. Legare gli acidi nucleici

Dopo la lisi del campione, lo strumento si fermerà per regolare le condizioni di legame aggiungendo Binding Solution al lisato. Inoltre, viene aggiunta la SNAP Solution, contenente sfere magnetiche rivestite di silice. Gli acidi nucleici si legano specificamente alle sfere magnetiche.

3. Lavare per rimuovere le contaminazioni residue

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

4. Eluire gli acidi nucleici

Gli acidi nucleici vengono rilasciati dalle sfere magnetiche ed eluiti in 100 µl di Elution Buffer M.

3. Estrazione di acidi nucleici con InviMag® Universal Kit KF/ 96

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:

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 HLT: Aggiungere 240 ml di **isopropanolo al 99,7%** al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.

Wash Buffer M: aggiungere 450 ml di **etanolo al 96 -100%** al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.

Wash Buffer II: aggiungere 420 ml di **etanolo al 96 -100%** al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.

Carrier RNA: Risospendere ogni provetta in 1,2 ml di **DNase/RNase free water**. Miscelare per bene finché non sia completamente disciolto.

Proteinase K: Risospendere ogni provetta in 1,1 ml di **DNase/RNase free water**. Miscelare per bene finché non sia completamente disciolto.

Lysozyme: aggiungere l'intera fiala di Lysozyme in polvere al flacone di **Lysozyme Buffer**. Miscelare per bene finché non sia completamente disciolto. Accertarsi di prepararla appena prima dell'estrazione, utilizzare una soluzione appena preparata. Una volta disciolta, preparare le aliquote e conservare a -20 °C fino all'uso successivo.

Master mix

Per una più facile manipolazione, si consiglia di preparare un master mix composto da Lysis Buffer HLT, Proteinase K e, se necessario, Carrier RNA. Quando si prepara il master mix, si consiglia di preparare un volume che superi del 5% il numero totale di reazioni.

Preparare il master mix sempre fresco e poco prima dell'uso.

Isolare DNA genomico, DNA batterico e DNA/RNA virale:

per campione sono necessari 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA.

Isolare il DNA genomico:

per campione sono necessari 220 µl di Lysis Buffer HLT e 20 µl di Proteinase K. L'uso di Carrier RNA non è necessario.

Controllo dell'estrazione

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

Bassi volumi di controllo dell'estrazione (DNA o RNA) devono essere combinati con il Carrier RNA fornito in un'unica miscela. Le fiale con Carrier RNA contengono 1,2 ml di soluzione madre. Aggiungere la rispettiva quantità di acido nucleico di controllo dell'estrazione al Carrier RNA, se è necessario un volume elevato (> 25% del volume totale di Carrier RNA), sostituire la quantità appropriata di DNase/RNase free Water durante la diluizione di Carrier RNA.

In alternativa, è possibile aggiungere controlli di estrazione dopo la lisi, nella fase di legamento.

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. È raccomandato 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.

Sangue: i campioni di sangue (stabilizzati con EDTA o citrato ma non eparinizzati) possono essere conservati a temperatura ambiente per 2-3 ore. Per la conservazione a breve termine (fino a 24 h), i campioni andrebbero conservati a 2-8 °C. Per la conservazione a lungo termine si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -20°C or -80°C.

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 congelati a -20°C o -80°C per la conservazione a lungo termine. La risospensione è descritta 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. Per la conservazione a lungo termine si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -20°C or -80°C.

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.

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. Per la conservazione a lungo termine si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -20°C or -80°C.

3.3 Preparazione del materiale di partenza

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

Dopo aver caricato la Lysis Plate con il rispettivo campione e i reagenti, procedere come descritto in 3.5 "Preparare e caricare il KingFisher™ Flex" per continuare con la procedura di estrazione.

3.3.1 Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Trasferire 200 µl di campione in una cavità della Lysis Plate. Se il volume del campione è inferiore a 200 µl, regolare con 1 x PBS Buffer o DNase/RNase free water per un volume finale di 200 µl.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA (opzionale per la preparazione di DNA genomico) ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

3.3.2 Sangue

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Trasferire 200 µl di campione in una cavità della Lysis Plate.

Per l'estrazione del DNA genomico, aggiungere 220 µl di Lysis Buffer HLT e 20 µl di Proteinase K ad ogni campione oppure 240 µl di Master Mix.

3.3.3 Tamponi

a) Tamponi asciutti

Sciogliere i tamponi in una fiala adatta nel volume più basso possibile di PBS o DNase/RNase free water (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 200 µl della soluzione risciacquata per l'estrazione.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA (opzionale per la preparazione di DNA genomico) ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

In alternativa, i tamponi possono essere risciacquati direttamente in 200 µl di DNase/RNase free water plus Master Mix. Inserire i tamponi in singole cavità della Lysis Plate e incubare per 5-10 minuti a temperatura ambiente, mescolare di tanto in tanto. Accertarsi di evitare contaminazioni incrociate.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

b) Tamponi nel fluido stabilizzante

Utilizzare 200 µl della soluzione stabilizzante per l'estrazione.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA (opzionale per la preparazione di DNA genomico) ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

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

3.3.4 Campioni 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 DNase/RNase free water. Agitare su vortex per 30 secondi, proseguire con una fase di centrifugazione di 1 minuto a 12.000 x g.

Trasferire 200 µl di surnatante in una cavità della Lysis Plate. Evitare particelle solide nel campione.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

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 DNase/RNase free water. Agitare su vortex per 30 secondi, proseguire con una fase di centrifugazione di 30 s a 1.000 x g.

Trasferire 200 µl di surnatante in una cavità della Lysis Plate. Evitare particelle solide nel campione.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

3.3.5 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 200 µl di PBS Buffer e trasferire il campione sulla Lysis Plate.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

3.3.6 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 di batteri in 200 µl di PBS Buffer.

Per alcune applicazioni è possibile utilizzare direttamente 200 µl di urina fresca.

Trasferire il campione alla Lysis Plate e aggiungere 20 µl di Lysozyme.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

3.3.7 Secrezione tracheale, BAL, espettorato

a) Campioni non viscosi o a bassa viscosità

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Trasferire 200 µl di campione in una cavità della Lysis Plate.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA (opzionale per la preparazione di DNA genomico) ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

b) Isolamento di DNA batterico 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 200 µl di PBS o DNase/RNase free water e trasferire il campione sulla Lysis Plate, aggiungere 20 µl di Lysozyme.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

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.

Trasferire 200 µl di campione in una cavità della Lysis Plate.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

3.3.8 Surnatanti di colture cellulari

Trasferire 200 µl di campione in una cavità della Lysis Plate.

Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA ad ogni campione o aggiungere 240 µl di Master Mix.

Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di Lysozyme. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

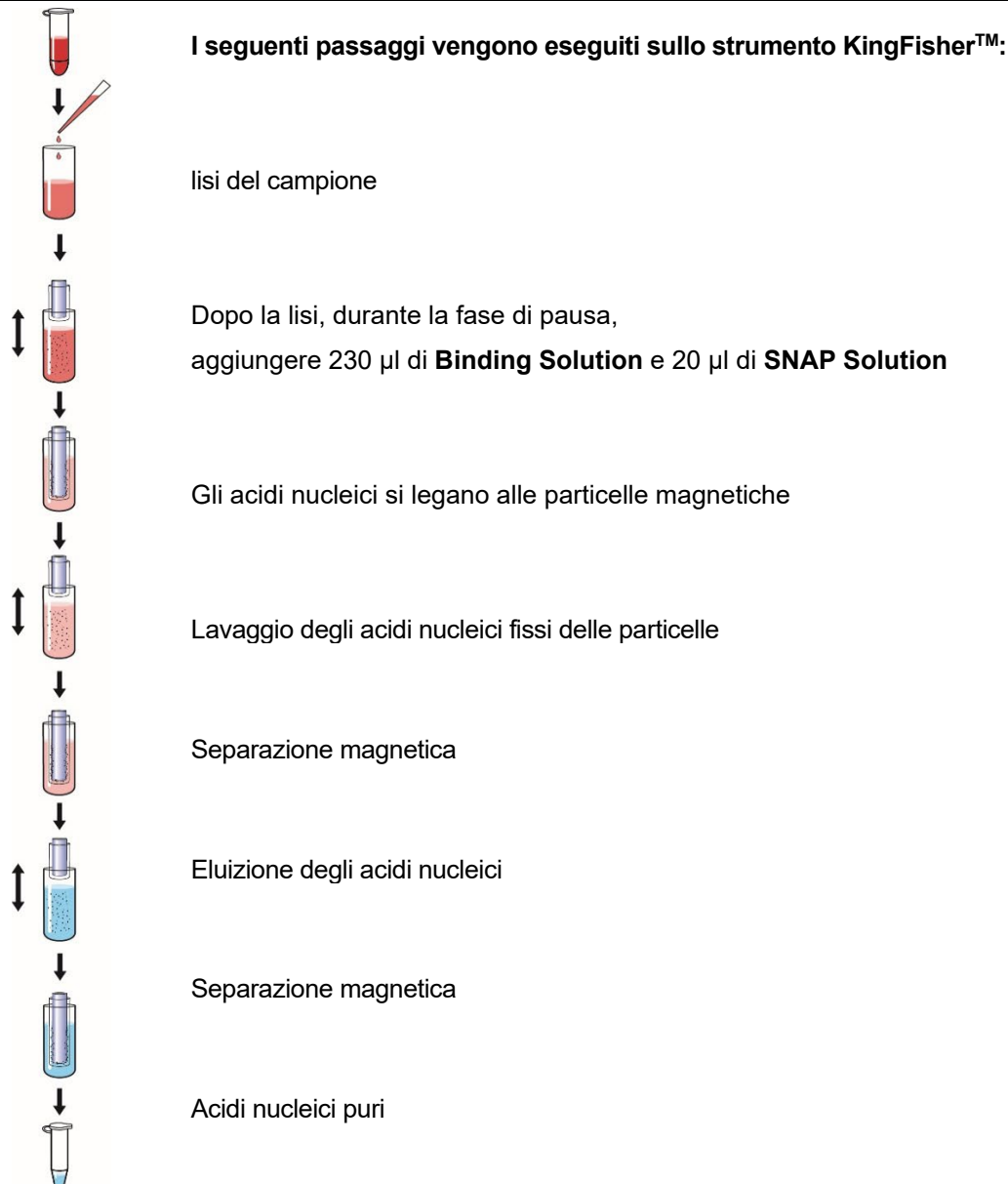
3.4 Protocollo breve InviMag® Universal Kit/KF96

Fare riferimento al capitolo 3.5 " Preparare e caricare il KingFisher™ Flex

Trasferire 200 µl di campione in una cavità della Lysis Plate. Aggiungere 200 µl di **Lysis Buffer HLT**, 20 µl di **Proteinase K** e 20 µl di **Carrier RNA** (opzionale per DNA genomico). Per la preparazione del DNA batterico, è raccomandata l'aggiunta di 20 µl di **Lysozyme**. Il Lysozyme va aggiunto alla Lysis Plate prima di aggiungere campioni o altri reagenti.

Preparare tutte le piastre come descritto:

Lysis Plate:	fare riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.
Washing Plate_1:	aggiungere 900 µl di Wash Buffer HLT ad una Deep Well Plate da 2,0 ml
Washing Plate_2:	aggiungere 900 µl di Wash Buffer M ad una Deep Well Plate da 2,0 ml
Washing Plate_3:	aggiungere 1000 µl di Wash Buffer II ad una Deep Well Plate da 2,0 ml
Elution Plate:	aggiungere 100 µl di Elution Buffer M alla Elution Plate (stesse dimensioni della Tip Plate)
Tip Plate:	Inserire il KF96 Tip Comb per magneti DW su una Tip Plate. Elution Plate e Tip Plate sono identiche. Utilizzare una Elution Plate fornita come Tip Plate



3.5 Preparare e caricare il KingFisher™ Flex

Quando si utilizza il KingFisher™ Flex, accertarsi di aver letto e compreso le istruzioni del produttore.

1. Determinare il numero di reazioni necessarie, controlli inclusi, e preparare tutte le piastre necessarie alla procedura di purificazione, come segue. Etichettare il lato corto di ogni piastra in modo conforme.
Per la manipolazione dei controlli dell'estrazione, far riferimento al capitolo 3.1 "Prima di avviare un protocollo".

Configurazione della piastra KingFisher™ Flex:	
Lysis Plate	Fare riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.
Washing plate_1:	Aggiungere 900 µl di Wash Buffer HLT nelle cavità di una Deep Well Plate
Washing plate_2:	Aggiungere 900 µl di Wash Buffer M nelle cavità di una Deep Well Plate
Washing plate_3:	Aggiungere 1.000 µl di Wash Buffer II nelle cavità di una Deep Well Plate
Elution Plate	Aggiungere 100 µl di Elution Buffer M nelle cavità di una Elution Plate

2. Lysis Plate: preparare la Lysis Plate in base al tipo di campione, come descritto alla sezione "Preparazione del materiale di partenza".
3. Accendere lo strumento KingFisher™ Flex
4. Tip Plate: posizionare il KF96 Tip Comb per magneti DW sulla Elution Plate (Tip Plate).
5. Scegliere un esame per avviare la corsa (tutti gli esami sono scaricabili sul sito web di Invitek Diagnostics).

InviMag_Universal_KF96_V2: protocollo per l'estrazione del DNA genomico e degli acidi nucleici di tutti i tipi di agenti patogeni, compresi gli agenti patogeni difficili da lisare.

InviMag_Universal_KF96_Virus: protocollo per l'estrazione di acidi nucleici da virus da campioni di plasma o tamponi.

6. Caricare le piastre preparate nella posizione specifica nel display dello strumento
7. Avviare la corsa con il comando "START"
8. Dopo i passaggi di lisi, le pause dello strumento e 230 µl di Binding Solution e 20 µl di SNAP Solution vanno aggiunte ad ogni reazione.

***Nota:** Miscelare la SNAP Solution prima di utilizzare il mescolare energicamente su vortex!*

9. Posizionare la piastra sullo strumento (attenzione al corretto orientamento della piastra) e continuare la corsa premendo il pulsante "START". Ora lo strumento continuerà il processo di purificazione senza altre interazioni utente.
10. Dopo l'estrazione: si raccomanda un trasferimento degli acidi nucleici purificati a Receiver Tubes da 1,5 ml (forniti).

Conservare gli acidi nucleici a -20 °C o -80 °C fino all'uso successivo.

4. Appendice

4.1 Protocollo passo passo del KingFisher™ Flex

Protocollo: InviMag_Universal_KF96_V2

Reagent info

Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
-	-	-	-
Lysis Plate		96 DW plate	
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Sample	200	-	Sample
Lysis Buffer HLT	200	-	Reagent
Proteinase K	20	-	Reagent
Carrier-RNA	20	-	Reagent
Lysozyme (if required)	20	-	Reagent
Wash Plate 1		96 DW plate	
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Wash Buffer HLT	900	-	Reagent
Wash Plate 2		96 DW plate	
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Wash Buffer M	900	-	Reagent
Wash Plate 3		96 DW plate	
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Wash Buffer II	1000	-	Reagent
Elution Plate		96 standard plate	
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Elution Buffer M	100	-	Reagent

Dispensed reagents

Lysis Plate		96 DW plate	
Name	Step	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]
Isopropanol	Adjust Binding Condition	230	-
SNAP Solution	Adjust Binding Condition	20	-

Steps data

 Tip1	96 DW tip comb	
 Pick-Up	Tip Plate	
 Lysis Step 1	Lysis Plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads	Yes
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Medium
	Heating temperature [°C]	60
	Preheat	Yes
End of step	Postmix	No
	Collect beads	No
 Lysis Step 2	Lysis Plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads	Yes
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:15:00, Medium
	Heating temperature [°C]	85
	Preheat	Yes
End of step	Postmix	No
	Collect beads	No
 Adjust Binding Condition	Lysis Plate	
	Message	Add Isopropanol + SNAPs
	Dispensing volume [μl]	250
Reagent(s)	Name	Isopropanol
	Volume [μl]	230
	Name	SNAP Solution
	Volume [μl]	20
 Binding Step	Lysis Plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release time, speed	00:00:10, Fast
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Medium
	Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No
	Collect count	5
	Collect time [s]	30
 Washing Step 1	Wash Plate 1	
Beginning of step	Precollect	No
	Release time, speed	00:00:10, Fast
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Fast
	Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No
	Collect count	5
	Collect time [s]	30

	Washing Step 2	Wash Plate 2	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Fast
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:04:00, Fast
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	Washing Step 3	Wash Plate 3	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Fast
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:03:00, Fast
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	Drying Step	Wash Plate 3	
		Dry time	00:05:00
		Tip position	Outside well / tube
	Elution Step	Elution Plate	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:10:00, Medium
		Heating temperature [°C]	65
		Preheat	Yes
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	Bead Removal Step	Wash Plate 3	
		Release time, speed	00:00:30, Fast
	Leave	Tip Plate	

4.2 Risoluzione di problemi

Problema	Causa possibile	Raccomandazione
Quantità ridotta degli acidi nucleici	Lisi cellulare insufficiente	Aumentare il tempo di lisi nel file di esecuzione fornito. Ridurre la quantità di materiale di partenza
	Eluizione incompleta	Aumentare il volume di Elution Buffer M . Rettificare anche il volume modificato nel file di esecuzione fornito.
	Quantità ridotta di SNAP Solution	Miscelare per bene la SNAP Solution prima dell'uso.
	Bassa concentrazione di acido nucleico nel campione	Eluire con un volume inferiore (minimo 50 µl) di Elution Buffer M . Rettificare anche il volume modificato nel file di esecuzione.
	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	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.
	Materiale vecchio	Assicurarsi che il materiale di partenza sia conservato in condizioni adeguate (-20°C/-80°C).
Gli acidi nucleici non funzionano bene nelle applicazioni a valle (ad es. PCR in tempo reale o NGS)	Etanolo residuo durante l'eluizione	Aumentare il tempo di asciugatura per la rimozione dell'etanolo nel file di esecuzione.
	Ripporto 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.
	Nessun risultato PCR per DNA genomico	Grazie ad una procedura di isolamento molto delicata, può accadere che il DNA genomico isolato formi un cluster. Per evitare ciò, la fase di denaturazione PCR primaria a 95 °C deve essere prolungata a 5 min.
Magnetic beads carry-over	Residui di particelle magnetiche nell'estrazione eluita	Centrifugare gli acidi nucleici eluiti a piena velocità per 1 min e trasferire il surnatante in una nuova provetta.

4.3 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.com. Per eventuali domande contattare techsupport@invitek.com.

4.4 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 <i>in vitro</i>

4.5 Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive

Visitare www.invitek.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
- File di esecuzione per KingFisher™ Flex e KingFisher™ 96

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

4.6 Informazioni sull'ordine

Prodotto	Dimensione della	N. catalogo
InviMag® Universal Kit /KF96	5 x 96 preparazioni	7450300200
InviMag® Universal Kit /KF96 w/o plastic (senza plastica)	5 x 96 preparazioni	7450300250

Cronologia delle revisioni

Revisione	Data	Descrizione
IT-v1-2022	2022-05-18	Nuovo documento
IT-v2-2023	2023-04-17	Aggiornare i dati di contatto e il design aziendale per riflettere il rebranding dell'azienda.
IT-v3-2024	2024-02-08	Aggiornamento delle informazioni sui pericoli e sulla sicurezza.



INVITEK diagnostics

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 2 e 6
63460-070 Tondela
Portugal

Phone: +351 232 817 817

GERMANY

Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Germany

Phone: +49 30 9489 2908

info@invitek.com
www.invitek.com