

LightCycler[®] MRSA Advanced Test For Use With The LightCycler[®] 2.0 Instrument

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

LightCycler [®] MRSA Advanced Test	LC MRSA	96 Tests	P/N: 05352894 190
LightCycler [®] Advanced Lysis Kit	LYS ADV	96 Tests	P/N: 05205743 190

POUŽITÍ

Test LightCycler[®] MRSA Advanced je kvalitativní diagnostický test *in vitro* na přímé zjištění přítomnosti nazální kolonizace bakterií *Staphylococcus aureus* (MRSA) rezistentní vůči methicilinu. Test slouží jako pomůcka při prevenci a léčbě infekce MRSA v lékařských zařízeních. Test se provádí na zařízení LightCycler[®] 2.0 se vzorky nazálních výtěrů pacientů s podezřením na kolonizaci. Pro přípravu vzorků se používá extrakce výtěru a mechanická lýza, po níž následuje amplifikace DNA MRSA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a detekce amplifikované DNA pomocí fluorogenních cílově specifických hybridizačních sond.

Test LightCycler[®] MRSA Advanced není určen k diagnóze infekcí MRSA, ani k provádění nebo monitorování léčby infekcí MRSA. Původní kultury jsou nutné pouze k izolaci organismů pro epidemiologické stanovení nebo pro další zjištění citlivosti.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Staphylococcus aureus je oportunní patogen přenášený jako komenzální organizmus na kůži a v nosní dutině u přibližně 30 % běžné populace s potenciálem zapříčinit široké spektrum onemocnění, která mohou být smrtelná do 30 dní po infekci přibližně u 34 % případů^{1,2}. *S. aureus* se dokáže rychle adaptovat na selekční tlak léčby antibiotiky, což vedlo ke vzniku a rozšíření kmenů *S. aureus* (MRSA) rezistentních vůči methicilinu. Gen *mecA* se nachází na rozsáhlém mobilním genetickém elementu, který se nazývá stafylokoková chromozomální kazeta (SCC*mec*) a tento gen je zodpovědný za rezistenci vůči methicilinu a dalším β-laktamovým antibiotikům. Gen *mecA* kóduje variabilní vazebný protein pro penicilin, PBP2a nebo PBP2', který má pro všechna β-laktamová antibiotika velmi nízkou afinitu, což umožňuje vznik normální syntézy peptidoglykanové vrstvy a to dokonce i v přítomnosti těchto antibiotik³. Četné kmeny MRSA vznikly a rozšířily se po celém světě a různé rody *S. aureus*⁴ senzitivních na methicilin získaly SCC*mec*. Do dnešního dne bylo rozlišeno pět typů SCC*mec* (I-V) a bylo popsáno několik variant těchto typů SCC*mec*⁵.

Nozokomiální infekce (HAI) způsobené MRSA získaly ve zdravotnických zařízeních v poslední době na významu kvůli velkému počtu infekcí, úmrtnosti a vysokým nákladům na léčbu⁶⁻⁹. Kromě toho se komunitní MRSA (CA-MRSA) v několika posledních letech rozšířily¹⁰ a způsobily nárůst infekcí v nemocnicích^{11,12} a zdůraznily tak potřebu komplexních programů pro kontrolu infekce. V roce 2008 byla shrnuta doporučení vzešlá z publikovaných pokynů několika státních, odborných a zdravotnických organizací, aby si instituce mohly určit priority při zavádění vlastních snah při prevenci přenosu MRSA¹³. Jakýkoli program prevence přenosu MRSA musí zahrnovat několik hlavních strategií, včetně aktivního sledovacího screeningu, mytí rukou, izolace pacienta a dalších úkonů pro prevenci přenosu. Detekce MRSA pomocí PCR v reálném čase snižuje čas detekce (méně než 2 hodiny času v laboratoři) ve srovnání se standardními testy na kulturách a tak zlepšuje efektivnost strategií kontroly a léčby.

PRINCIPY POSTUPU

Detekce MRSA pomocí testu LightCycler® MRSA Advanced je založena na třech hlavních krocích:

- Příprava vzorků pomocí mechanické lýzy stěn bakteriálních buněk.
- PCR amplifikace cílové DNA a detekce pomocí specifických hybridizačních sond.
- Analýza vrcholů tání a automatická tvorba výsledků.

Příprava vzorku

Pomocí lyzační soupravy LightCycler® Advanced a zařízení MagNA Lyser se provede mechanická lýza vzorků nazálních výtěrů. Vatové smotky výtěrů se odstříhnou do zkumavek určených pro lýzu a zahříváním se inaktivují veškeré bakterie. Následně se zkumavky určené pro lýzu vloží do zařízení MagNA Lyser, kde dojde k mechanické lýze stěn bakteriálních buněk, čímž se připraví hrubý lyzát buněk. Po krátkém odstředění, kdy dojde k separaci skleněných kuliček s vlákny tampónů, se zpracovaný vzorek podrobí PCR analýze pomocí testu LightCycler® MRSA Advanced.

PCR amplifikace

Volba cílové sekvence

Primery a sondy testu LightCycler® MRSA Advanced detekují speciální sekvenci, která indikuje integraci kazety SCCmec v chromozomu *S. aureus*, což je znakem přítomnosti DNA MRSA.

Amplifikace

Zpracované vzorky a amplifikační směs obsahující tzv. hot-start Taq polymerázu se vloží do kapilár LightCycler® (20 µl), ve kterých dojde k PCR amplifikaci. Každá reakce testu LightCycler® MRSA Advanced obsahuje vnitřní kontrolu, která kontroluje inhibici vzorku a monitoruje integritu činidla. Každý test LightCycler® MRSA Advanced obsahuje i enzym AmpErase (uracil-N-glykozyláza). Tento enzym rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin, nikoli však DNA obsahující deoxythymidin. Protože amplikony vytvořené pomocí testu LightCycler® MRSA Advanced obsahují deoxyuridin, potenciální kontaminanty amplikonu jsou eliminovány během prodlouženého zahřívání, které se provádí před začátkem PCR amplifikace.

Cílová sekvence v plazmidu se simultánně amplifikuje v pozitivní kontrole. Úkolem pozitivní kontroly, která se zařazuje do každého cyklu testu, je monitorovat selhání činidla. Každý cyklus obsahuje i negativní kontrolu, která slouží k detekci kontaminace činidla nebo okolního prostředí DNA MRSA.

Specifická detekce produktů PCR hybridizačními sondami

Amplikony MRSA a vnitřní kontroly se detekují fluorescencí pomocí specifického páru hybridizačních sond. Sondy se přichytí ke specifické interní sekvenci v amplifikovaném fragmentu a umístí se ve vzájemné blízkosti. Při excitaci tyto vázané sondy vydávají fluorescenční signál o specifické vlnové délce díky procesu nazývanému přenos fluorescenční rezonanční energie (FRET). Zařízení LightCycler® 2.0 měří emitované světlo. Specifické amplikony MRSA a vnitřní kontroly mohou být rozlišeny díky tomu, že jsou paralelně detekovány ve dvou různých detekčních kanálech.

Po dokončení PCR v reálném čase provede zařízení LightCycler® 2.0 automaticky analýzu vrcholů tání. Jednovláknové amplikony DNA s navázanými hybridizačními sondami jsou podrobeny vzrůstajícím teplotám. Když produkty PCR dosáhnou specifické teploty, jedna ze dvou navázaných hybridizačních sond roztaje, což má za následek ztrátu fluorescenčního signálu. K poklesu fluorescenčního signálu dojde při specifické teplotě a má za následek stanovení vrcholů tání, které slouží k určení a rozlišení specifických amplikonů MRSA a vnitřní kontroly.

Analýza vrcholů tání a automatická tvorba výsledků

Po provedení vizuální identifikace vrcholů tání pomocí kolmic T_M v softwaru LightCycler® se výsledky testu přenesou do určeného interpretačního nástroje (software Micro Analysis) a vytvoří se zpráva.

ČINIDLA

LightCycler® Advanced Lysis Kit
Lyzační souprava LightCycler® Advanced
(P/N: 05205743 190)

LYS ADV

96 testů

LYS

(Lyzační činidlo)

Tris pufr
EDTA
< 15% skleněné kuličky
0,09% azid sodný

96 x 0,6 ml

LightCycler® MRSA Advanced Test
(P/N: 05352894 190)

LC MRSA

96 testů

MRSA RXNMX

(Reakční směs MRSA)

Tris pufr
< 0,1% chlorid hořečnatý
Chlorid draselný
< 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP
0,19% oktylglukosid
0,03% albumin bovinního séra (savčí)
< 0,1% FastStart Taq DNA polymeráza (mikrobiální)
< 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)
(mikrobiální)
0,09% azid sodný

3 x 0,352 ml

MRSA DETMX

(Detekční směs MRSA)

0,05% roztok Brij® 35
Tris pufr
< 0,01% EDTA
< 0,01% MRSA primery
< 0,01% fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro MRSA a MRSA vnitřní kontrolu
0,09% azid sodný
0,001% Poly rA RNA (syntetická)
< 0,001 % neinfekční (mikrobiální) DNA plazmid s obsahem sekvencí vzájemných MRSA primer a specifickou sekvencí pro vazbu sondy

3 x 0,176 ml

MRSA (+) C

(Pozitivní kontrola MRSA)

Tris pufr
< 0,01% EDTA
0,002% Poly rA RNA (syntetická)
0,09% azid sodný
< 0,001 % neinfekční (mikrobiální) DNA plazmid s obsahem MRSA sekvencí

1 x 0,176 ml

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- A. **PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY IN VITRO.** S tímto výrobkem mohou pracovat pouze pracovníci proškolení v technice PCR.
- B. Tento test je určen pouze pro vyšetřování vzorků z nazálních výtěrů.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a prostředek pro ochranu očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Při odebírání alikvotních podílů z lahviček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci. Doporučuje se používat jednorázové pipety a špičky k pipetám.
- F. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahviček téže šarže.
- G. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží souprav.
- H. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- I. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.
- J. Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- K. Manipulace se vzorky a kontrolami se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ v dokumentu CLSI č. M29-A3¹⁵. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chlornanu sodného v deionizované či destilované vodě.

Poznámka: Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25 %. Reděním bělicího roztoku pro domácnost v poměru 1:10 dostaneme 0,5% roztok chlornanu sodného.

- L. **LYS, MRSA RXNMX, MRSA DETMX a MRSA (+) C** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- M. Při práci s jakýmkoliv činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí, rozředte je vodou a dosucha vytřete.
- N. Kontaminaci od pozitivních kontrol a vzorků lze zabránit důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

- A. Po obdržení skladujte lyzační soupravu LightCycler® Advanced (**LYS**) ve svislé poloze při teplotě 15 až 25 °C.
- B. Po obdržení skladujte soupravu pro test LightCycler® MRSA Advanced (**MRSA RXNMX, MRSA DETMX a MRSA (+) C**) při teplotě -15 až -25 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do uplynutí doby použitelnosti, která je na nich uvedena. Po otevření můžete skladovat zbývající **MRSA RXNMX a MRSA DETMX** při teplotě -15 až -25 °C nebo při teplotě 2 až 8 °C až 30 dní. **MRSA RXNMX a MRSA DETMX** lze až 5krát zmrazit a rozmrazit.
- C. Po otevření můžete skladovat zbývající **MRSA (+) C** při teplotě -15 až -25 °C až 30 dní nebo při teplotě 2 až 8 °C rovněž až 30 dní. **MRSA (+) C** lze až 22krát zmrazit a rozmrazit.
- D. **MRSA DETMX** chraňte před světlem.
- E. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **MRSA RXNMX a MRSA DETMX**) lze skladovat ve tmě při teplotě 2 až 8 °C až 30 dní.

- F. Zpracované vzorky jsou stabilní až 30 dní při -15 až -25 °C, 6 dní při 2-8 °C nebo 1 den při 15 a 25 °C.
- G. Amplifikace by měla začít okamžitě po přidání zpracovaných vzorků a kontrol do pracovního roztoku Master Mix. Není-li to možné, můžete naplněné kapiláry skladovat ve tmě max. 3 hodiny při teplotě 2 až 8 °C.

DODÁVANÝ MATERIÁL

- A. **LightCycler® Advanced Lysis Kit**
Lyzační souprava LightCycler® Advanced
(P/N: 05205743 190)

LYS ADV

LYS

(Lyzační činidlo)

- B. **LightCycler® MRSA Advanced Test**
(P/N: 05352894 190)

LC MRSA

MRSA RXNMX

(Reakční směs MRSA)

MRSA DETMX

(Detekční směs MRSA)

MRSA (+) C

(Pozitivní kontrola MRSA)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Zařízení LightCycler® 2.0 (P/N: 03 531 414 201)
- Software LightCycler® 4.1 (P/N: 04 898 915 001) nebo vyšší
- Balíček softwaru LightCycler® MRSA Advanced v1.0 CE (P/N: 05 414 326 190) nebo vyšší
- LC karuselová centrifuga 2.0 [P/N: 03 709 582 001 (230 V) nebo P/N: 03 709 507 001 (110 V)] nebo standardní stolní mikrocentrifuga s rotorem pro 2,0 ml zkumavky, a adaptéry pro LC centrifugu (P/N: 11 909 312 001)
- Zařízení MagNA Lyser [P/N: 03 358 976 001 (230 V) nebo 03 358 968 001 (110 V)]

Činidla a spotřební materiál

- Kompenzační souprava LightCycler® Multicolor (P/N: 04 484 355 001)
- Kapiláry LightCycler® 20 µl (P/N: 04 929 292 001)

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- BD CultureSwab™ Liquid Stuart (BD P/N: 220109), nebo Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart (Copan Italia International P/N: 139C);
- Nebo BD CultureSwab™ plus gel Amies bez aktivního uhlí (BD P/N: 220117), nebo Copan Venturi Transystem™ plus gel Amies bez aktivního uhlí (Copan Italia International P/N: 134C);
- Nebo BD CultureSwab™ plus gel Amies s aktivním uhlím (BD P/N: 220122), nebo Copan Venturi Transystem™ plus gel Amies s aktivním uhlím (Copan Italia International P/N: 136C)
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Gáza nebo nůžky

- Etanol (70%)
- Nastavitelné pipetory*: (objem: 10 µl, 100 µl a 1000 µl) se sterilními špičkami bez DNázy, špičky s aerosolovým bariérovým filtrem nebo s přímým vypuzováním
- Vyhřívací blok nastavený na 95 °C (± 2 °C): VWR (P/N: 12621-088) nebo ekvivalentní blok s 2,0 ml zkumavkami: VWR (P/N: 12985-050)
- Mikrocentrifuga o výkonu 8 000 – 20 000 x g s rotorem vhodným pro 2,0 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem: P/N: model Eppendorf 5417R nebo ekvivalentní
- Sterilní silikonované polypropylenové 1,5 ml zkumavky pro mikrocentrifugu: P/N: obj. č. Eppendorf 0030 108.051 nebo ekvivalentní
- Vířivý mixér: Fisher (P/N: 12-812) nebo ekvivalentní
- Nástroj pro mikrozkušavky: VWR (P/N: 20170-688) nebo ekvivalentní

* Pipetory musí být přesné na 3 % jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky s přímým vypuzováním bez DNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Poznámka: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

A. Odběr vzorků

1. Tampon navlhčete dvěma kapkami (přibližně 50 µl) sterilního fyziologického roztoku nebo použijte suchý.
2. Jemně zaveďte tampon do nosní dírky přibližně 0,5 palce nebo 1,3 cm (v případě použití dvojitého tamponu zaveďte oba vatové smotky najednou) a rotačním pohybem otřete pětkrát nosní sliznici za mírného tlaku na nos z vnější strany (takto napomůžete kontaktu vatového smotku s vnitřní stranou nosu).
3. Stejný tampon zaveďte i do druhé nosní dírky a postup opakujte.
4. Vraťte tampon do transportní zkumavky a řádně ji označte.

B. Přeprava a uchovávání vzorků

Při přepravě vzorků je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy pro přepravu infekčních biologických materiálů¹⁶. Vzorky lze přepravovat při teplotě 2 až 25 °C.

Vzorky je možné před zpracováním skladovat (včetně času nutného pro přepravu) podle podmínek uvedených níže.

- Vzorek odebraný pomocí tamponů Liquid Stuart je stabilní:
 - při teplotě 15 až 25 °C až 4 dny,
 - při teplotě 2 až 8 °C až 5 dní,
 - při teplotě -20 °C až 30 dní.
- Vzorek odebraný pomocí gelových tamponů Amies je stabilní:
 - při teplotě 15 až 25 °C až 4 dny.

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava zařízení

A. Instalace softwaru Micro Analysis (MAS)

Pro instalaci aktualizací ověřte, jsou-li dodatečné informace dodávány s produktem.

1. K řídicí jednotce LightCycler[®] se přihlaste jako správce.
2. Do jednotky CD řídicí jednotky LightCycler[®] vložte CD se softwarem LightCycler[®] MRSA Advanced v1.0 CE (nebo vyšší).
3. Při první instalaci:
 - a. Jestliže není nainstalována aplikace Microsoft Data Access Components 2.8, budete na začátku nastavení MAS vyzváni k její instalaci. Aplikace Microsoft Data Access Components 2.8 musí být nainstalována, jinak MAS nebude správně fungovat.
 - b. Nemáte-li nainstalován Microsoft .NET Framework 2.0 (x86), budete vyzváni k jeho instalaci na začátku nastavení MAS. Aplikace Microsoft .NET Framework 2.0 (x86) musí být nainstalována, jinak MAS nebude správně fungovat.
 - c. Nemáte-li nainstalovanou aplikaci Microsoft Windows Installer 3.1, budete vyzváni k její instalaci na začátku nastavení MAS. Aplikace Microsoft Windows Installer 3.1 musí být nainstalována, jinak MAS nebude správně fungovat.
 - d. Nemáte-li nainstalovanou aplikaci Microsoft Visual Studio 2008 Report Viewer, budete vyzváni k její instalaci na začátku nastavení MAS. Aplikace Microsoft Visual Studio 2008 Report Viewer musí být nainstalována, jinak MAS nebude správně fungovat.
 - e. Nemáte-li nainstalovanou aplikaci Microsoft SQL Server 2005 Express SP2 (x86), budete vyzváni k její instalaci na začátku nastavení MAS. Aplikace Microsoft SQL Server 2005 Express SP2 (x86) musí být nainstalována, jinak MAS nebude správně fungovat.
4. Když budete vyzváni k restartu, potvrďte stiskem **<Yes>**.

Poznámka: Během restartu nevyjímejte CD se softwarem LightCycler[®] MRSA Advanced.

5. Po restartu postupujte podle pokynů instalačního průvodce. Stiskem **<Next>** spustíte instalaci MAS.
6. Zvolte **<Just Me>**, bude-li s řídicí jednotkou LightCycler[®] pracovat pouze jeden uživatel, zvolte **<Everyone>**, bude-li s řídicí jednotkou LightCycler[®] pracovat více než jeden uživatel.
7. Kliknutím na **<Close>** v okně **<Installation Complete>** potvrďte úspěšnost instalace MAS.
8. Pomocí ikony MAS na pracovní ploše počítače spustíte aplikaci.
9. Datová složka pro soubory *.ixo a *.pdf: Při startu MAS se automaticky vytvoří **<C:\Export to MAS>**.

B. Ověření instalace softwaru Micro Analysis (MAS)

1. Překopírujte důkazní soubory (důkazní soubor LightCycler[®] MRSA Advanced v1.0 CE.ix0 a důkazní soubor LightCycler[®] MRSA Advanced v1.0 CE.pdf, nebo vyšší) z CD se softwarem LightCycler[®] MRSA Advanced v1.0 CE (nebo vyšší) do složky **<C:\Export to MAS>**.
2. Jestliže aplikace MAS není ještě spuštěná, poklepejte na ikonu MAS na pracovní ploše a stiskněte **<Load>**.
3. Zvolte důkazní soubor MRSA Advanced v1.0 CE.ix0 (nebo vyšší) ve složce **<C:\Export to MAS>**.
4. Klepněte na **<NO>**, což znamená, že zpráva LightCycler[®] neobsahuje příznak **<User Developed or Modified Test Method>**.

5. Do příslušných polí okna pro nastavení konfigurace MRSA zadejte číslo šarže, datum expirace a informace laboratoře.

Lyžační souprava Advanced	
Lot No	11A00000
Expiration Date	12201812

Test MRSA Advanced	
Lot No	23A00000
Expiration Date	24201812

Personalizované informace	
Lab Info	Roche Lab

6. Zvolte typ zprávy **<MRSA Combined>** a pokračujte kliknutím na **<OK>**. Soubor bude analyzován automaticky a data budou zobrazena.
7. Zprávu vytiskněte.
8. Otevřete a vytiskněte důkazní soubor MRSA Advanced v1.0 CE.pdf (nebo vyšší) (který se nachází ve složce **<C:\Export to MAS>**).
9. Ujistěte se, že vytištěná zpráva MAS a vytištěný soubor PDF uvádějí stejné výsledky. V opačném případě kontaktujte místní kancelář Roche pro technickou pomoc.

C. Odinstalace softwaru Micro Analysis (MAS)

1. K řídicí jednotce LightCycler[®] se přihlaste jako správce.
2. Klikněte na **<Start>** na hlavním panelu řídicí jednotky LightCycler[®].
3. Ve spodním levém rohu pracovní plochy Windows zvolte **<Start>** / **<Control Panel>** / **<Add/Remove Programs>**.
4. Zobrazí se seznam aktuálně instalovaných programů, klikněte na **<MAS>**.
5. Zvolte **<Remove>** a potvrďte tento příkaz kliknutím na **<Yes>**.

Poznámka: CD s MSS nabízí funkci odinstalace a opravy. Tuto funkci odinstalace je možné použít jako alternativu k popsanému postupu. Funkce oprava se používá k obnovení poškozených nebo chybějících souborů softwaru Micro Analysis.

D. Instalace maker LightCycler[®] MRSA Advanced

1. Nainstalujte makra *.lckit LightCycler[®] MRSA Advanced MCC Macro v1.0 (MRSA MCC_04484355001A_1.0.lckit) nebo vyšší a LightCycler[®] MRSA Advanced Macro v1.0 CE (MRSA_05352894190_1.0.lckit) nebo vyšší z CD se softwarem LightCycler[®] MRSA Advanced v 1.0 CE (nebo vyšší).
2. Podívejte se prosím do provozní příručky k zařízení LightCycler[®] 2.0, kapitola „Spouštění makra Roche“.

E. Kompenzační experiment více barev pomocí kompenzační soupravy LightCycler® Multicolor pro použití se zařízením LightCycler® 2.0

Těmito kroky vytvoříte nový nebo nahradíte expirovaný soubor pro kompenzaci barvy.

1. Rozmrazte lahvičky 1, 2, 3 a 5; jemně promíchejte a krátce odstředíte.
2. Připravte trojnásobné ředění lahvičky 2 smícháním:
 - a. 10 µl roztoku obsaženého v lahvičce 2,
 - b. 20 µl pufru ze zkumavky **LYS**; nepřenášejte skleněné kuličky.
3. Napipetujte 10 µl každé složky do samostatné kapiláry LightCycler® (20 µl).
 - a. Kapilára č.1: lahvička 1
 - b. Kapilára č. 2: krok ředění E2
 - c. Kapilára č. 3: lahvička 3
 - d. Kapilára č. 4: lahvička 5

Poznámka: Po dokončení cyklu zlikvidujte roztok v lahvičce 2.

4. Napipetujte 10 µl pufru ze zkumavky **LYS** (nepřenášejte skleněné kuličky) do každé kapiláry, abyste dosáhli celkového objemu 20 µl.
5. Utěsněte každou kapiláru uzávěrem pomocí uzavíracího nástroje.
6. Kapiláry odstředujte v LC karuselové centrifuze 2.0 nebo standardní centrifuze s adaptéry. Zkumavky musí být v karuselu umístěny takto:
 - a. Pozice karuselu 1: CCB (lahvička 1)
 - b. Pozice karuselu 2: CC530 (lahvička 2)
 - c. Pozice karuselu 3: CC610 (lahvička 3)
 - d. Pozice karuselu 4: CC670 (lahvička 5)

Poznámka: V kapilárách nepoužívejte menší objem.

7. Umístěte karusel na vzorky LightCycler® do zařízení LightCycler® 2.0. Jestliže používáte standardní centrifugu, přeneste kapiláry do karuselu na vzorky LightCycler® v pořadí, které je uvedeno v kroku E6.

Poznámka: Neměňte pořadí činidel v karuselu.

8. Spustíte a uložíte Color Compensation Experiment (CCE).
 - a. Podívejte se prosím do provozní příručky „A“ k zařízení LightCycler® 2.0, kapitola „Spouštění makra Roche“, kde najdete pokyny k použití makra MRSA Advanced MCC.

Poznámka: Nepoužívejte pole <assay lot number>. Pokud chcete přidat číslo šarže testu k experimentu, zadejte informaci do odpovídajícího pole v editoru vzorků.

- b. Cyklus uložte pod krátkým jedinečným názvem (např. MRSA_CCE_RRMMDD-xx, R=rok, M=měsíc, D=den, xx=číslo cyklu).
- c. Po dokončení cyklu je automaticky vytvořena zpráva.
- d. Zprávu vytiskněte.

9. Ověření cyklu

Zpráva nebude uvádět, zda byl cyklus MCC úspěšný (validní). Validita cyklu MCC je stanovena pouze po úvodním cyklu MRSA Advanced po cyklu MCC.

- a. Je-li zpráva soupravy pro kompenzaci více barev LightCycler® označena příznakem (např. <User Developed or Modified Test Method>), pak je cyklus neplatný. Cyklus opakujte.
- b. Není-li zpráva soupravy pro kompenzaci více barev LightCycler® označena příznakem, pokračujte dalším krokem.

Poznámka: Je-li negativní kontrola (NC) nebo MRSA (+) C testu LightCycler® MRSA Advanced stále neplatná, může být soubor kompenzace více barev LightCycler® nesprávný. Opakujte cyklus kompenzace více barev nebo kontaktujte místní kancelář Roche pro technickou pomoc.

10. Vytvořte nový objekt kompenzace barvy (CCO).

- a. Aktivujte režim analýzy kompenzace barev a stiskněte tlačítko <save CC object>.
- b. Vytvořte krátký jedinečný název. Aby Micro Analysis Software (MAS) neměl problém s identifikací, je konvence při tvorbě názvu objektu kompenzace barvy následující: MRSA_CCO_RRMMDD-xx (R=rok, M=měsíc, D=den, xx=číslo cyklu).
- c. Test LightCycler® MRSA Advanced používá tento objekt pro další analýzy.

Příprava vzorku a kontroly

A. Příprava vzorku

1. Pro každý vzorek od pacienta označte jednu zkumavku LYS.

Poznámka: Neoznačujte zkumavky na povrch uzávěru.

2. Vyjměte výtěr z transportní zkumavky.
3. Vložte jeden vatový smotek s výtěrem do zkumavky LYS.
4. Podržte výtěr za špejli poblíž okraje zkumavky, zvedněte výtěr několik milimetrů nad dno zkumavky a tlakem špejle na okraj zkumavky špejli zlomte. Popř. můžete k oddělení výtěru v místě okraje zkumavky použít nůžky. Mezi jednotlivými odstříhnutími otřete ostří nůžek hadříkem navlženým v 70% etanolu (nebo mikrozidu).

Poznámka: Aby byla minimalizována kontaminace při oddělování výtěru, používejte gázu. Pro každý výtěr používejte novou gázu.

5. Uzávěr zkumavky LYS pevně uzavřete.

B. Příprava negativní kontroly

Poznámka: Negativní kontroly musí být připraveny ve stejné době jako vzorky.

1. Pro negativní kontrolu označte jednu zkumavku LYS.

Poznámka: Neoznačujte zkumavky na povrch uzávěru.

2. Vložte sterilní tampon do transportní zkumavky. Viz „Další potřebný materiál, který není součástí dodávky“, kde najdete seznam doporučených tamponů.
3. Po dobu alespoň 1 minuty při pokojové teplotě inkubujte.
4. Vyjměte tampon z transportní zkumavky.
5. Vložte jeden vatový smotek s výtěrem do zkumavky LYS.

6. Podržte výtěr za špejli poblíž okraje zkumavky, zvedněte výtěr několik milimetrů nad dno zkumavky a tlakem špejle na okraj zkumavky špejli zlomte. Popř. můžete k oddělení výtěru v místě okraje zkumavky použít nůžky.

Poznámka: Aby byla minimalizována kontaminace při oddělování výtěru, používejte gázu.

Uzávěr zkumavky LYS pevně uzavřete.

C. Zpracování vzorků a kontrol

1. Ve vyhřívacím bloku nastaveném na 95 ± 2 °C zahřívejte vzorky a negativní kontrolu po dobu 2 minut.
2. Lýzujte vzorky a negativní kontrolu v zařízení MagNA Lyser po dobu 70 sekund při rychlosti 5 000 ot/m. Návod k použití najdete v provozní příručce k přístroji MagNA Lyser.
3. Vzorky a negativní kontrolu odstředujte při pokojové teplotě po dobu 1 minuty rychlostí 8 000–20 000 x g.
4. Zpracované vzorky a negativní kontrola jsou stabilní až 1 den při teplotě 15 až 25 °C nebo 6 dní při teplotě 2 až 8 °C nebo až 2 měsíce při teplotě -15 až -25 °C.

Příprava činidel

1. Při pokojové teplotě rozmrazte **MRSA RXNMX** a **MRSA DETMX** a **MRSA (+) C**. Před použitím činidel se ujistěte, že jsou zcela rozmražená.
2. **MRSA RXNMX** a **MRSA DETMX** a **MRSA (+) C** rozvířte po dobu 3-5 sekund a krátce odstředujte, aby bylo možné odebrat materiál ve spodní části zkumavky.
3. Do sterilní silikonované polypropylenové zkumavky pro mikrocentrifugu připravte pracovní Master Mix pro požadovaný počet testovaných vzorků a kontrol. (Jako vodičko použijte tabulku 1.)

Poznámka: Doporučené množství je určeno pro 2 reakce pro negativní kontrolu a pozitivní kontrolu a také další množství, které bere v úvahu mrtvý objem a usnadňuje pipetování ze zkumavky se směsí a pipetování do LC kapilár.

Poznámka: Při otevírání **MRSA RXNMX** a **MRSA DETMX** si v případě potřeby pomozte nástrojem pro mikrozukmavky (VWR P/N 2017-688).

Tabulka 1
Příprava pracovního Master Mixu

Počet vzorků	Objem MRSA RXNMX (μl)	Objem MRSA DETMX (μl)	Celkový objem (μl)*
1	40	20	60
2	50	25	75
3	60	30	90
4	70	35	105
5	80	40	120
6	90	45	135
7	100	50	150
8	110	55	165
9	120	60	180
10	130	65	195
11	150	75	225
12	160	80	240
13	170	85	255
14	180	90	270
15	190	95	285
16	200	100	300
17	210	105	315
18	220	110	330
19	230	115	345
20	240	120	360
21	260	130	390
22	270	135	405
23	280	140	420
24	290	145	435
25	300	150	450
26	310	155	465
27	320	160	480
28	330	165	495
29	340	170	510
30	350	175	525

* Zahnuje objem pro NC, MRSA (+) C a mrtvý objem.

4. Rozviřte pracovní Master Mix po dobu 3-5 sekund a krátce odstředte, aby bylo možné odebrat materiál ve spodní části zkumavky. Pracovní Master Mix lze skladovat ve tmě při teplotě 2 až 8 °C až 30 dní.

Zpracovaný vzorek a příprava kontroly

1. Přeneste požadovaný počet kapilár LightCycler® do karuselu na vzorky, nebo do adaptérů karuselu. Jsou nutné jedna (1) kapilára pro pozitivní kontrolu (pozice 1), 1 kapilára pro zpracovanou negativní kontrolu (pozice 2) a 1 kapilára pro každý zpracovaný vzorek (pozice 3 a vyšší).

Poznámka: Kapiláry LightCycler® uchopte v místě zásobníku.

2. Do zásobníku každé kapiláry napipetujte 15 µl pracovního Master Mixu.
3. 5 µl čistého supernatantu z každého zpracovaného vzorku napipetujte do kapilár č. 3 a vyšších. Po každém vzorku vyměňte špičku pipety.
4. Do kapiláry č. 2 napipetujte 5 µl zpracované negativní kontroly.

Poznámka: Zbývající zpracované vzorky a kontroly mohou být uloženy při teplotě -15 °C až -25 °C až po dobu 2 měsíců. Jestliže používáte zmrazené zpracované vzorky, rozmrazte je při teplotě laboratoře, rozviřte 10 sekund a poté je odstředte při 8 000–20 000 x g při teplotě laboratoře po dobu 1 minuty.

5. Napipetujte 5 µl rozmražené **MRSA (+) C** do kapiláry č. 1.
6. Utěsněte každou kapiláru uzávěrem pomocí uzavíracího nástroje.
7. Kapiláry odstřeďujte v LC karuselové centrifuze 2.0 nebo standardní centrifuze s adaptéry.
8. Umístěte karusel na vzorky LightCycler® do zařízení LightCycler® 2.0.

Poznámka: Jestliže používáte standardní centrifugu, přeneste kapiláry do karuselu na vzorky LightCycler® v pořadí, které je uvedeno v kroku 1.

Poznámka: Amplifikace by měla začít okamžitě po přidání zpracovaných vzorků a kontrol do pracovního roztoku Master Mix. V případě, že to není možné, lze naplněné kapiláry skladovat ve tmě maximálně 3 hodiny při teplotě 2 až 8 °C.

Plnění a provoz zařízení LightCycler® 2.0

1. Přihlaste se k softwaru LightCycler®.
2. Spustěte makro LightCycler® MRSA Advanced v1.0 CE (MRSA_05352894190_1.0.lckit) nebo vyšší (podrobnosti viz provozní příručka „A“ k zařízení LightCycler® 2.0, kapitola „Spouštění makra Roche“).

Poznámka: Nepoužívejte pole <assay lot number>. Pokud chcete přidat číslo šarže testu k cyklu, zadejte informaci do odpovídajícího pole v editoru vzorků.

3. Jedinečným identifikátorem pojmenujte cyklus.
4. Zredukujte přednastavený seznam plnění na takový počet vzorků, který se bude testovat. Je-li nedopatřením vymazáno příliš mnoho kapilár, začněte postup od kroku 2.
5. Nasnímejte štítky vzorků s čárovým kódem nebo ručně zadejte názvy vzorků do pole pro název vzorku nebo ponechte výchozí nastavení. K zadání dat je možné použít pole <Run Note>.

Poznámka: Neměňte výchozí název pozitivních a negativních kontrol.

6. Postupujte podle pokynů na obrazovce a spustěte cyklus testu LightCycler® MRSA Advanced.

VÝSLEDKY

Identifikace vrcholů a automatická analýza výsledků

Poznámka: Pokud cyklus zařízení LightCycler® probíhá, nezačínáte analýzu dat.

- Manuální T_M Calling vyžaduje manuální ovládání ve dvou automaticky aplikovaných modulech T_M Calling.
- Moduly pro absolutní kvantifikaci se v analýze tohoto testu nepoužívají.
- V okně vrcholů tání jsou zobrazeny všechny křivky vybraných grafů.
- V makru MRSA Advanced je předdefinována kolmice T_M pro každý modul analýzy.
- Je možné označit volbu nebo zrušit výběr kolmice T_M bez vzniku příznaku.
- Výchozí hodnoty každého modulu analýzy jsou předdefinovány v makru MRSA Advanced podle následující tabulky a nesmí se zrušit jejich výběr, ani měnit. Pokud je nedopatřením provedena změna, zapište správné hodnoty z tabulky 2.

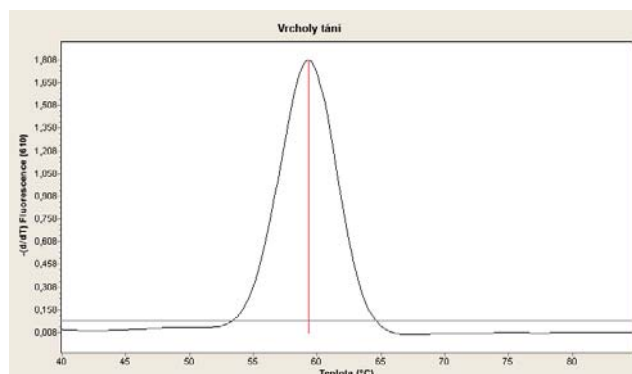
Tabulka 2
Výchozí hodnoty

	CH 610	CH 670
Výchozí hodnota	0,085	0,100

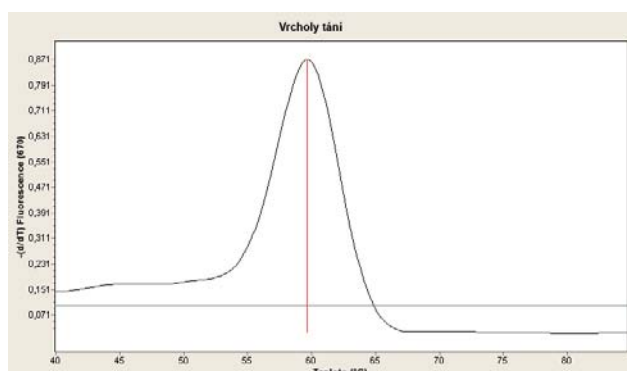
Poznámka: Neměňte následující nastavení: <Channel>, <Color Compensation>, <Program>, <Method>, <Show Shoulders>, <Peak Area> nebo <Peak Width>.

- Vrcholy jsou definovány jako maxima nad výchozími hodnotami. Ramena nejsou vrcholy.
- Příklady typických vrcholů a vrcholu s ramenem (graf 3) pozitivní kontroly (graf 1, kanál 610) a interní kontroly (graf 2, kanál 670).

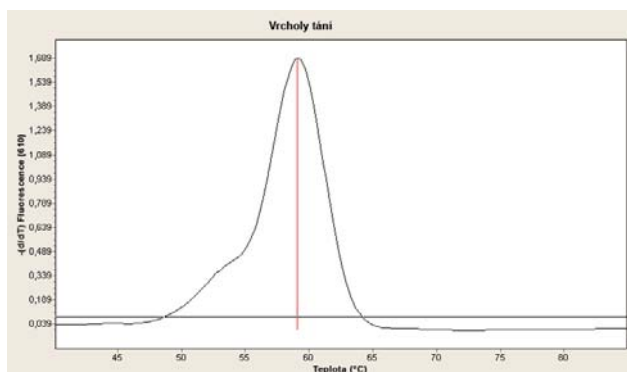
Graf 1



Graf 2



Graf 3



Nastavení kolmic T_M :

1. Po dokončení cyklu zobrazí průvodce experimentem **<Analyses have been created>**.
2. Přesuňte okno Message do dolní části obrazovky, aby bylo možné vidět hodnoty T_M a výchozí hodnoty (neklepejte na **<Finish>**).
3. Kliknutím na modul analýzy T_M Calling 610; zobrazí se přehled všech pozic.
4. Posunutím levé čáry s úchytkou doprava zmenšíte okno s grafem, takže by se měly objevit sloupce „Baseline“, „TM1“, „Height1“.

Poznámka: Je-li zvolena více než jedna pozice, objeví se nastavení první zvolené kapiláry.

Poznámka: Přesunutí kolmic má vliv na všechny aktivované a zvolené kapiláry.

5. Kliknutím na pozici pozitivní kontroly (#PC#) zvolíte pozitivní kontrolu.
6. Jestliže kolmice T_M není umístěna na vrcholu (nad výchozí hodnotou), přesuňte ji na vrchol a zaměřte se na specifikované rozsahy T_M (viz tabulka 3).
7. Jestliže nad výchozí hodnotou nejsou žádné vrcholy, ponechte kolmici T_M ve výchozí pozici. Ujistěte se, že kolmice neoznačují sklony žádných aktuálních vrcholů (např. mimo specifikovaný rozsah T_M).
8. Ujistěte se, že ve sloupcích „TM1“ a „Height1“ jsou zobrazeny hodnoty daného vzorku (jakékoli hodnoty). Jestliže nejsou viditelné žádné hodnoty (je tam prázdné místo), posuňte kolmici T_M na vrchol; ve sloupcích „TM1“ a „Height1“ by se teď měly objevit hodnoty.

Tabulka 3
Specifikované rozsahy T_M

	Nízký T_M (°C)	Vysoký T_M (°C)
MRSA (CH 610)	57,00	62,00
Vnitřní kontrola (CH 670)	57,00	62,00

Poznámka: U vzorků bez vrcholů (např. u negativních kontrol) se automatické nastavení stupnice upraví na nejvyšší hodnotu pozadí. V takovém případě nemusí být vidět předdefinovaná výchozí hodnota. Jestliže chcete, aby byla výchozí hodnota viditelná, zvolte tuto pozici kapiláry spolu s pozitivní kontrolou.

Poznámka: Označené vrcholy mimo specifikovaný rozsah T_M se objeví ve zprávě MAS.

9. U všech zbývajících pozic proveďte detekci vrcholů podle popisu v krocích 5 až 8 výše (kontroly a vzorky).
10. Klikněte na modul analýzy T_M Calling 670.
11. U všech pozic proveďte detekci vrcholů podle popisu v krocích 4 až 8 výše (kontroly a vzorky).

Dokončete T_M Calling:

1. Přesuňte okno průvodce experimentem zpět do středu obrazovky a stiskněte **<Finish>**.
2. Zpráva LightCycler[®] je automaticky vygenerována a musí být vytisknuta.
3. Zkontrolujte zprávu LightCycler[®], neobsahuje-li příznaky a zda je zobrazeno **<run state: complete>**. **Jestliže jsou zobrazeny příznaky nebo chybová hlášení, prostudujte si oddíly „Kontrola kvality“ a „Vyhodnocení výsledků“.**
4. Cyklus je automaticky uložen.

Poznámka: Jestliže po uložení dojde k jakýmkoli změnám v polích s názvy vzorků v softwaru LightCycler[®], obsluha musí zvolením a kliknutím na ikony „Abs Quant 610“ a „Abs Quant 670“ aktualizovat databázi. Vytiskněte znovu zprávu LightCycler[®].

5. Soubor *.ixo exportujte kliknutím na <File> \ <Export> do složky **<C:\Export to MAS>**.

Automatická analýza výsledků pomocí softwaru Micro Analysis (MAS):

1. Poklepejte na ikonu MAS na pracovní ploše počítače a stiskněte **<Start>**.
2. Zvolte cyklus k analýze ze složky **<C:\Export to MAS>** a nahrajte soubor *.ixo.
3. Korektně odpovězte na otázku „Does the LightCycler[®] report contain the flag **<User Developed or Modified Test Method>?**“, tj. podle zprávy LightCycler[®].
4. Nasnímejte nebo manuálně vložte číslo šarže a datum expirace, které najdete na soupravě Advanced Lysis a na testu LightCycler[®] MRSA Advanced.
5. Popř. zadejte osobní informace (např. jméno obsluhy).

Poznámka: Od tohoto okamžiku se budou používat naposledy zadané informace do MAS.

6. Zvolte příslušný formát zprávy (v tabulce, ve skupinách nebo smíšený).
7. Soubor *.ixo bude automaticky analyzován a data budou zobrazena ve zvoleném formátu zprávy.
8. Vytiskněte zprávu MAS a/nebo ji exportujte ve formátu *.pdf.

VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

1. Software LightCycler® vypočítá výsledky na základě změřených fluorescenčních signálů a vnitřních výpočetních algoritmů. Poté software Micro Analysis (MAS) výsledky prezentuje.
2. MAS automaticky provádí cyklus, kontroly a validaci vzorků.

Poznámka: Pro stav cyklu, stav kontrol a stav vzorku (RUN STATUS, CONTROLS STATUS a SAMPLE STATUS) mohou být vygenerovány příznaky a poznámky. Obsluha musí zkontrolovat všechna pole zprávy MAS, zda se v ní nevyskytují příznaky nebo poznámky.

3. V případě platného cyklu jsou výsledky interpretovány takto:

Výsledek CH 610 (MRSA)	Výsledek CH 670 (IC)	Výsledek MRSA	Poznámka	Interpretace
POZITIVNÍ	POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ	DETECTED	-	Vzorek je pozitivní na MRSA DNA. Předpoklad nazální kolonizace MRSA.
NEGATIVNÍ	NEGATIVNÍ	INVALID	IC not detected	Neplatný výsledek. Opakujte PCR postup s čerstvě rozmraženými zpracovanými vzorky nebo s novými vzorky.
NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ	NOT DETECTED	-	Vzorek je negativní na MRSA DNA. Nazální kolonizace MRSA je nepravděpodobná.

MAS může poskytnout další poznámky o pozitivní kontrole, negativní kontrole a o výsledku analýzy vzorku:

Poznámka	Interpretace
Peak(s) outside Target T_M range	Amplikony detekovány mimo specifikovaný rozsah MRSA T_M
Peak(s) outside IC T_M range	Amplikony detekovány mimo specifikovaný rozsah IC T_M

4. MAS může zobrazit následující příznaky:

Příznak	Poznámky	Interpretace	Stav	Nápravné opatření
Invalid macro version	File could not be loaded	Bylo aplikováno nesprávné makro.	Run INVALID	Opakujte experiment. Provedte kontrolu správného makra v softwaru LightCycler® a/nebo MRSA Advanced.
User Developed or Modified Test Method	-	Možné příčiny jsou uvedeny v provozní příručce k zařízení LightCycler® 2.0 (např. úprava výchozího nastavení makra).	Run INVALID	Jestliže se zobrazí další příznaky, podívejte se na nápravu pro daný příznak. Jestliže nejsou zobrazeny žádné další příznaky, opakujte experiment. Jestliže se neustále zobrazuje tento příznak, volejte místní servis Roche.
Lysis Kit expired	-	Použitelnost soupravy LightCycler® Advanced Lysis vypršela.	Run INVALID	Opakujte experiment s neexpirovanými činidly.
MRSA Test expired	-	Použitelnost testu LightCycler® MRSA Advanced vypršela.	Run INVALID	Opakujte experiment s neexpirovanými činidly.
CCO expired on YYMMDD ¹	-	Soubor kompenzace barvy je starší než šest měsíců.	Run INVALID	Provedte nový experiment kompenzace barvy a vytvořte nový objekt kompenzace barvy.
INVALID CCO NAME	-	Objekt kompenzace barvy je nesprávně pojmenován.	Run INVALID	Vytvořte nový objekt kompenzace barvy a dodržujte přitom konvence tvorby názvu.
MULTIPLE CCO USED	-	V modulech analýzy jsou použity různé soubory kompenzace barvy.	Run INVALID	V softwaru LightCycler® otevřete původní soubor *.ixo a zvolte správný soubor kompenzace barvy. Uložte, vytiskněte zprávu LightCycler® a ještě jednou ji exportujte.
NO CCO USED	-	V modulech analýzy chybí jeden nebo více souborů kompenzace barvy.	Run INVALID	V softwaru LightCycler® otevřete původní soubor *.ixo a zvolte správný soubor kompenzace barvy. Uložte, vytiskněte zprávu LightCycler® a ještě jednou ji exportujte.
INVALID LCS VERSION	-	Byla použita nesprávná verze softwaru LightCycler® pro danou proceduru.	Run INVALID	Otevřete software LightCycler® a proveďte kontrolu správného čísla verze.
INVALID BASELINE	-	Výchozí hodnoty byly nedopatřením změněny.	Run INVALID	Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a opravte výchozí hodnoty dle tabulky 2. Uložte, vytiskněte zprávu LightCycler® a ještě jednou ji exportujte.

INVALID NC	<ul style="list-style-type: none"> NC: Target peak(s) detected NC: IC not detected 	<ul style="list-style-type: none"> V rozsahu MRSA T_M negativní kontroly detekován(y) amplikon(y). V negativní kontrole nebyla detekována žádná IC. 	Controls INVALID	Viz oddíl Kontrola kvality.
INVALID PC	PC: PC not detected	Nebyla detekována cílová sekvence MRSA.	Controls INVALID	Viz oddíl Kontrola kvality.
INVALID NC NAME	-	Byl změněn výchozí název negativní kontroly.	Controls INVALID	Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zadejte #NC#. Uložte, vytiskněte zprávu LightCycler® a ještě jednou ji exportujte.
INVALID PC NAME	-	Byl změněn výchozí název pozitivní kontroly.	Controls INVALID	Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zadejte #PC#. Uložte, vytiskněte zprávu LightCycler® a ještě jednou ji exportujte.

¹ MAS vypíše varování 30 dní před expirací čidla.

KONTROLA KVALITY

1. Každá reakce LightCycler® MRSA Advanced obsahuje interní kontrolu (IC). IC kontroluje inhibici vzorku a monitoruje integritu čidla.

a. Vnitřní kontrola (IC)

Vnitřní kontrola musí být detekována jako pozitivní u všech MRSA negativních vzorků a také u negativní kontroly (NC). Jestliže je IC negativní u negativního vzorku, analýza vzorku není platná a PCR postup s čerstvě rozmraženým zpracovaným vzorkem se musí opakovat. Jestliže je IC negativní u NC, je neplatný celý cyklus a musí se opakovat se zmraženými nebo novými vzorky. Jestliže je opakovaný cyklus se zmraženými vzorky stále neplatný, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche. Výsledek IC se u MRSA pozitivních vzorků a u platné pozitivní kontroly ignoruje, protože amplifikace MRSA může s touto kontrolou konkurovat.

2. S každým cyklem se musí analyzovat alespoň 1 pozitivní kontrola a 1 negativní kontrola. Úkolem pozitivní kontroly je monitorovat selhání čidla. Negativní kontrola se používá k detekci čidla nebo k detekci kontaminace prostředí MRSA DNA. Amplifikační čidla obsahují enzym, který zabraňuje kontaminaci amplikony MRSA. Software LightCycler® automaticky přiřazuje pozice obou kontrol v zařízení.

a. Negativní kontrola (NC)

NC musí být negativní a její vnitřní kontrola musí být pozitivní. Jestliže NC nesplňuje tato kritéria, je neplatný celý cyklus a musí se opakovat se zmraženými nebo novými vzorky. Jestliže je opakovaný cyklus stále neplatný, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche.

b. Pozitivní kontrola (PC)

PC musí být pozitivní (s vnitřní kontrolou pozitivní, nebo negativní). Jestliže PC nesplňuje toto kritérium, je neplatný celý cyklus a musí se opakovat se zmraženými nebo novými vzorky. Jestliže je opakovaný cyklus stále neplatný, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche.

3. Software Micro Analysis (MAS) může vytvářet příznaky a poznámky. Obsluha musí zkontrolovat, zda výtisky neobsahují příznaky a poznámky a zda byl cyklus platný.

Kontrola	Výsledek CH 610 (MRSA)	Výsledek CH 670 (IC)	Interpretace
Negativní kontrola	NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ	Cyklus platný, není zapotřebí žádná činnost
	POZITIVNÍ	POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ	Cyklus je neplatný, analyzujte nové vzorky
	NEGATIVNÍ	NEGATIVNÍ	Cyklus je neplatný, opakujte cyklus se zmraženými nebo novými vzorky. Jestliže je opakovaný cyklus se zmraženými vzorky stále neplatný, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche.
Pozitivní kontrola	POZITIVNÍ	POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ	Cyklus je platný, není zapotřebí žádná činnost
	NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ	Cyklus je neplatný, opakujte cyklus se zmraženými nebo novými vzorky. Jestliže je opakovaný cyklus se zmraženými vzorky stále neplatný, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche.

4. Externí pozitivní kontrola (EPC)

Pozitivní kontrolu MicroBioLogics® KWIK-STIK™ MRSA (P/N: 0158MRSA) lze používat pro výcvik, test dovednosti při provádění analýzy a pro externí kontrolu kvality testu LightCycler® MRSA Advanced. V této pozitivní kontrole se používá kmen MRSA, typy RE2. Kmeny MRSA, typy RE3 a RE7, je možné, když jsou k dispozici, používat jako přídatné externí pozitivní kontroly a monitorovat tak primery testu a sondy, které nejsou v tomto testu přímo kontrolovány. Externí kontroly se musí používat v souladu s celostátními a místními předpisy akreditačních organizací, podle potřeby. Při přípravě tamponu postupujte podle kroků uvedených v příbalovém letáku KWIK-STIK™, ale ne vkládejte tampon do kultivačního média. Po saturaci tamponu hydratovaným materiálem postupujte podle pokynů uvedených v příbalovém letáku pro test LightCycler® MRSA Advanced pro přípravu vzorků a testování výtěru.

Poznámka: *Do dnešního dne bylo rozlišeno pět typů SCCmec (I–V) a bylo popsáno několik variant těchto typů SCCmec⁵. Test LightCycler® MRSA Advanced je založen na vlastním detekčním systému, který dokáže detekovat kmeny MRSA s různými molekulárními sekvencemi v blízkosti pravé krajní (RE) junkce kazety SCCmec s genem orfX. Různé typy RE, které test LightCycler® MRSA Advanced detekuje, se označují jako RE2, RE3 a RE7 (vlastní pojmenování).*

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

1. Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. I když vzácně, mutace v oblastech bakteriálního genomu pokryté primery testu LightCycler® MRSA Advanced a/nebo sondou testu, mohou vést k selhání detekce bakterie. Vzácné formy kmenů MSSA, které nesou genetickou variantu kazety SCCmec, mohou při analýze testem LightCycler® MRSA Advanced vést k pozitivním výsledkům.
2. Díky samotným rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před změnou technologie na jinou provedli korelační metodické studie ve vlastní laboratoři a stanovili rozdíly mezi technologiemi.
3. Tento test je validován pouze pro vyšetřování lidských nazálních vzorků.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
5. Přítomnost enzymu AmpErase v reakční směsi LightCycler® MRSA Advanced snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od MRSA (+) C a klinických vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.
6. S tímto výrobkem mohou pracovat pouze proškolení pracovníci.
7. Tento produkt se smí používat pouze se zařízením LightCycler® 2.0.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Interferující látky

Látky, které mohou interferovat s detekcí MRSA při analýze pomocí testu LightCycler® MRSA Advanced a potenciálně vytvářet neplatné výsledky, zahrnují krev, nadměrné množství gelu s aktivním uhlím, které se může přenést z transportní zkumavky do zkumavky určené pro lýzu.

U následujících exogenních látek (viz tabulka 4), což jsou složky léků proti ucpaní nosu a látky používané k dosažení úlevy při suché nosní sliznici a/nebo jejímu podráždění, se pomocí testu LightCycler® MRSA Advanced prokázalo, že neinterferují s detekcí MRSA.

Tabulka 4
Exogenní látky testované na interferenci testem LightCycler® MRSA Advanced

Obchodní název	Účinná látka
InfectoPyoderm®	Mupirocin 20 mg/g (antibiotikum)
Turixin®	Mupirocin calcium 21,5 mg/g (antibiotikum)
Nosní mast Bepanthen®	Dexpanthenol 50 mg/g (pro vitamin B5)
12h nosní sprej Accumed	Oxymetazolin hydrochlorid 0,05% (nazální dekongestivum)
Otriven®	Xylometazoline 0,1 % (nazální dekongestivum)

HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

A. Analytická senzitivita

Analytická citlivost testu LightCycler® MRSA Advanced byla stanovena pomocí 3 kmenů MRSA, které představují tři typy RE, na které je tento test zacílen (pravá krajní junkce SCCmec s orfX (RE), typy 2, 3 a 7). Kultury těchto kmenů byly kvantifikovány, naředěny na hodnoty pokrývající rozsah od 100 do 400 kolonie tvořících jednotek (CFU) na jeden výtěr a absorbované do tamponů, které byly nejdříve ponořeny do různých transportních médií. Všechna ředění poblíž hodnoty LOD byla testována v replikátech o alespoň 60 vzorcích. Detekční limit získaný pro každý testovaný typ kmene a typ tamponu představuje nejnižší počet CFU/výtěrů, u kterých bude pozitivní výsledek získán s alespoň 95% intervalem spolehlivosti.

Tabulka 5
Mez detekce (LOD) pro každý typ MRSA RE testovaný na různých typech výtěrů

Typy výtěrů ¹	Typy MRSA		
	RE2	RE3	RE7
Transportní medium Liquid Stuart	240 CFU/výtěr	140 CFU/výtěr	240 CFU/výtěr
Gel Amies bez transportního media s aktivním uhlím	180 CFU/výtěr	224 CFU/výtěr	240 CFU/výtěr
Gel Amies s transportním médiem s aktivním uhlím	240 CFU/výtěr	224 CFU/výtěr	240 CFU/výtěr

¹ Viz „Další potřebný materiál, který není součástí dodávky“, kde najdete seznam doporučených tamponů a jejich čísla částí.

B. Analytická specifita

Inkluzivita

Pomocí programu podporovaného NIAID/NIH Contract No. HHSN272200700055C bylo získáno 10 izolátů epidemiologických klonů MRSA (uvedených v tabulce 6) díky Network on Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus (NARSA).

Všechny izoláty byly testem LightCycler® MRSA Advanced vyhodnoceny pozitivně.

Tabulka 6
Izoláty MRSA představující epidemiologické klony získané díky programu Network on Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus (NARSA)

ID kmene NARSA	Alias kmene	Druhy	Popis
NRS382	USA100; 626	<i>Staphylococcus aureus</i>	V USA dominující nozokomiální infekce PFT známá také jako klon New York/Japonsko.
NRS383	USA200; 96758	<i>Staphylococcus aureus</i>	Druhá nejčastější nozokomiální infekce PFT v USA; klon EMRSA16
NRS482	USA300; FPR 3757	<i>Staphylococcus aureus</i>	USA 300, sekvence celého genomu
NRS123	USA400; MW2; C1999000459; 99065	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vícenásobně citlivá komunitní MRSA infekce známá tím, že nese geny leukocidinu Panton-Valentine a další virulentní geny odlišné od nozokomiálních kmenů MRSA.
NRS385	USA500; 95938	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nozokomiální MRSA
NRS22	USA600; HIP07930; 99758	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nozokomiální MRSA
NRS386	USA700; 1078	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kmen je spojován s komunitní i nozokomiální infekcí.
NRS387	USA800; 1045	<i>Staphylococcus aureus</i>	Znám také jako pediatrický klon.
NRS483	USA1000; AIS 2006061	<i>Staphylococcus aureus</i>	USA 1000
NRS484	USA1100; HIP 12899	<i>Staphylococcus aureus</i>	USA 1100

Exkluzivita

Specifická testu LightCycler® MRSA Advanced byla vyhodnocena testem zkřížené reaktivity na patogenní mikroorganismy a na kontaminanty potenciálně přítomné v normální nazální mikroflóře. Testované druhy se skládaly z 6 virálních, 45 bakteriálních a 2 plísňových druhů. Mikroorganismy byly testovány jako kultury v koncentracích 1 000 CFU/reakci nebo jako genomické DNA preparáty v koncentracích 1 000 až 10 000 kopií/reakci. Dále byla testována lidská DNA v koncentraci 5 ng/reakci. Všechny testované druhy a lidská DNA byly v testu LightCycler® MRSA Advanced na MRSA negativní.

Tabulka 7
Druhy testované na zkříženou reaktivitu testem LightCycler® MRSA Advanced

Druhy	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus parainfluenza</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Chřipka typu A
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Chřipka typu B
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ozeanae</i>
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Microbacterium testaceum</i>
<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Micrococcus lutae</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	Parainfluenza 1
<i>Bacteroides fragilis</i>	Parainfluenza 3
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Bordetella bronchioseptica</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Rhodococcus equi</i> ⁵
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Respirační syncyriální virus
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus viridans</i>
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Veillonella atypica</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Lidská DNA

Dále bylo z různých evropských klinických center získáno 117 izolátů stafylokoků negativních na koagulázu rezistentní vůči methicilinu, 104 izolátů stafylokoků negativních na koagulázu senzitivní na methicilin a 100 izolátů *Staphylococcus aureus* senzitivních na methicilin a ty byly testovány v koncentracích 10e4 až 10e5 CFU/reakci. U žádného z těchto izolátů nebyla testem zjištěna pozitivita: specifická byla 100%.

LITERATURA

1. Kuehnert MJ, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. JID 2006; **193**:172-9.
2. Wyllie DH, et al. Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997-2003: cohort study. BMJ. 2006; **333 (7562)**:281.
3. Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. : J Bacteriol. 2001 Nov; **183(22)**:6525-31.
4. Deurenberg RH, Vink C, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007; **13**:222-235.
5. Deurenberg RH, et al., The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007; **13**: 222–235.
6. Cosgrove SE, et al. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. CID 2003;36, 53-59.
7. Engemann JJ, et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. Clin Infect Dis. 2003; **36(5)**:592-598.
8. Abramson MA, et al. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what costs? Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; **20(6)**:408-411.
9. Muto CA, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and Enterococcus. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; **24(5)**:362-386.
10. Association for Professionals in Infection Control & Epidemiology, Inc (APIC). National prevalence study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in U.S. healthcare facilities. Executive summary. June 25, 2007.
11. Klevens RM, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; **298(15)**:1763-1771.
12. Witte W. Nosocomial and community MRSA infections. EH ONLINE. <http://www.european-hospital.com/topics/article/4288.html>. Accessed November 7, 2008.
13. Calfee DP, et al. Strategies to prevent transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute care hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; **29(suppl 1)**:S62–S80.
14. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA:CLSI, 2005.
16. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704pp.



Souprava LightCycler® Advanced Lysis a
test LightCycler® MRSA Advanced vyrobila společnost:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
Člen Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.
Av. de la Generalitat, s/n
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguará, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

ROCHE, LIGHTCYCLER, FASTSTART, MAGNA LYSER, MRSA ADVANCED, LC a AMPERASE
jsou obchodní známky Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER je servisní známka společnosti Roche.

KWIK-STIK™ obchodní značka MicroBioLogics, Inc.

BD CultureSwab™ je obchodní známka společnosti Becton, Dickinson and Company.

Copan Transystem™ je obchodní známka společnosti Copan Diagnostics, Inc.

Brij je obchodní známka Croda International, PLC.

InfectoPyoderm® je obchodní známka společnosti Infectopharm GmbH.

Turixin je obchodní známka GlaxoSmithKline.

Bepanthen® je obchodní známka Bayer Healthcare.

Otriven® je obchodní známka společnosti Novartis.

Kyaninová barviva v tomto produktu podléhají patentovým právům GE Healthcare BioSciences Corp.
a Carnegie Mellon University a jsou licencovány společností Roche pouze za účelem výzkumu a jako
součást diagnostických souprav *in-vitro*. Jakékoli užití jiné než za účelem výzkumu a jako součást
diagnostických souprav *in-vitro* vyžaduje sublicence od GE Healthcare BioSciences Corp.,
Piscataway, New Jersey, USA a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvánie, USA.

Copyright 2009, Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

2/2009

(05446082001-01ENGL)

Doc Rev. 1.0

05548900001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

