

LightCycler[®] SeptiFast Test M^{GRADE}

Pro použití se zařízením LightCycler[®] 2.0
(sériové číslo 1415001 a vyšší)

Pro diagnostické použití *in vitro*.

PRO POUŽITÍ S:

| | | |
|---|-----------|-----------------------------|
| LightCycler [®] SeptiFast Kit M ^{GRADE} | 54 Tests | REF : 04 469 046 001 |
| SeptiFast Lys Kit M ^{GRADE} | 100 Tests | REF : 04 404 432 001 |
| SeptiFast Prep Kit M ^{GRADE} | 10 Tests | REF : 04 404 459 001 |
| SeptiFast Software Set v2.0 | | REF : 05 164 443 001 |

ÚČEL POUŽITÍ

Test LightCycler[®] SeptiFast M^{GRADE} je amplifikační test *in vitro* nukleové kyseliny sloužící k detekci a identifikaci bakteriální a houbové DNA z mikroorganismů uvedených v hlavním seznamu SeptiFast Test Master List (SML) v lidské K-EDTA krvi s použitím zařízení LightCycler[®] 2.0. Test je používán spolu s klinickým obrazem, zavedenými mikrobiologickými testy a/nebo dalšími laboratorními ukazateli jako pomůcka při léčbě pacientů s podezřením na sepsi a další bakteriální/houbové infekce krevního oběhu.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Sepse způsobená přítomností bakterií a/nebo hub v krevním oběhu je považována za jednu z hlavních příčin mortality a morbiditu u hospitalizovaných pacientů. Cílená antibiotická terapie a okamžitě započatá s léčbou jsou kritickými faktory při snižování morbiditu a mortality spojené se sepsí.

Část pacientů na jednotkách intenzivní péče léčených na počátku neadekvátními antibiotiky je značná a pohybuje se v rozmezí 11% až 46% (1,2,3). Identifikace bakteriálních/houbových patogenů a jejich citlivosti k antibiotikům z hemokultury trvá v nemocnicích zpravidla nejméně 48 hodin (1).

Rychlá detekce patogenů s použitím molekulárních diagnostických metod může usnadnit rychlou diagnózu a léčbu bakteriémie a fungémie a časnější nasazení cílené antibiotické terapie. Zároveň také snižuje nevhodné nadužívání širokospektrých antibiotik (4, 5).

Test LightCycler SeptiFast M^{GRADE} je vyroben k detekci mikroorganismů, které způsobují přibližně 90% všech systémových krevních infekcí (1, 6). Tento test na rozdíl od mikrobiologických metod, které detekují jen živé mikroorganismy, detekuje živé a neživé mikroorganismy a také volnou mikrobiální DNA. Cílové druhy jsou uvedeny v hlavním seznamu SeptiFast Test Master List (SML) v tabulce 1. Tyto druhy jsou pozitivně detekovány pomocí testu LightCycler[®] SeptiFast M^{GRADE} v průběhu vnitřních studií a/nebo klinických pokusů. Mezi těmito druhy jsou i ty, které jsou nejčastěji léčeny neadekvátně: *Enterococcus spp.*, *E.coli*, *Candida spp.*, *Klebsiella spp.* (6). Navíc pro některé cílové druhy z SML je časná identifikace důležitá, protože léčba jimi způsobených infekcí je nejobtížnější: *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Pseudomonas spp.* (6). Je možné detekovat více než jeden druh v jednom vzorku.

Výsledek PCR v reálném čase je doplňujícím prostředkem k urychlení časného klinického rozhodnutí.

Tabulka 1: Hlavní seznam SeptiFast Test Master List (SML)

| Gram negativní | Gram pozitivní | Houby |
|---|---|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i> | Koaguláza negativní stafylokok ¹ | <i>Candida tropicalis</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Candida parapsilosis</i> |
| <i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i> | <i>Streptococcus spp.</i> ² | <i>Candida glabrata</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Candida krusei</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ³ | | |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | | |

¹ Koaguláza negativní *stafylokoky* (druhy, které reprezentují skupinu koaguláza negativních stafylokoků, jsou uvedeny v tabulce číslo 8).

² Druhy reprezentující skupinu *Streptococcus spp.* jsou uvedeny v tabulce číslo 8.

³ Druhy často nazývané *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb komplex) nejsou detekovány (8).

PRINCIPY POSTUPU

Test LightCycler[®] SeptiFast M^{BRAC} je založen na 3 hlavních procesech:

- Příprava vzorku mechanickou lýzou a čištěním DNA.
- Amplifikace cílové DNA pomocí PCR v reálném čase 3 souběžnými reakcemi (gram-pozitivní bakterie, gram-negativní bakterie, houby) a detekce specifickými hybridními sondami.
- Analýza vrcholů tání a automatická tvorba výsledků.

Příprava vzorku

Mechanická lýza vzorků je prováděna pomocí soupravy SeptiFast Lys Kit M^{BRAC} a přístroje MagNALyser. S použitím soupravy SeptiFast Prep Kit M^{BRAC} je lysát inkubovaný za zvýšené teploty spolu s proteázou a chaotropním pufrům, které uvolňují nukleovou kyselinu a chrání uvolněnou DNA od DNAáz obsažených v krvi. Definovaný objem vnitřní kontroly (IC) je aplikován do každého vzorku spolu s lytickým činidlem. Vnitřní kontrola se skládá z dvouřetězcové DNA, kde základní vazebná místa jsou identická s těmi na cílové sekvenci. Vnitřní kontrola obsahuje unikátní sondu HybPr[®]be vázící sekvence, která umožní rozlišit amplifikovanou vnitřní kontrolu od ampikonu specifického pro cíl. Po přidání vazebného pufru je směs přenesena do odstředivky s vloženým skleněným vláknovým filtrem. Lidská genomová a bakteriální/houbová cílová DNA se naváže na povrch skleněného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné částice, jsou odstraněny dvěma vymývacími procesy. Po ukončení čistících pochodů jsou adsorbované nukleové kyseliny vymývány za zvýšené teploty. Vymyté nukleové kyseliny jsou předmětem PCR analýzy.

Amplifikace a detekce pomocí PCR v reálném čase

Volba cílové sekvence

Vnitřní přepsaná oddělovací sekvence (ITS) byla vybrána jako cílová oblast pro rozlišení bakteriálních a houbových druhů. Nabízí vyšší analytickou senzitivitu než jednoduché kopirované genů, protože existuje několik operonů v bakteriálních a houbových genomech. Dále je ITS druhově specifičtější než ribozomální RNA a proto je nevhodnější pro rozlišení druhů. Je lokalizována mezi 18S a 23S ribozomálních DNA sekvencí u všech gram-pozitivních a gram-negativních bakterií a mezi 18S a 5,8S ribozomálních DNA sekvencí u všech hub.

Amplifikace

Před amplifikací pomocí PCR je riziko kontaminace ampikonu sníženo použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosyláza). Tento enzym rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin, nikoli však DNA obsahující deoxythymidin. Zpracované vzorky jsou přidány do amplifikační směsi obsahující Taq polymerázu „s horkým startem“ v kapilárách LightCycler[®] (100 µl) M^{BRAC}, v nichž probíhá PCR amplifikace. Každý cíl specifického druhu je amplifikován generickými nebo specifickými primery. Směs cílů je současně amplifikována v činidlových kontrolách (RC).

Detekce produktů PCR v reálném čase pomocí sond HybPr[®]be

Ampikon je detekován fluorescencí pomocí specifického páru sond HybPr[®]be. Tyto fluorescenčně značené sondy HybPr[®]be hybridizují s vnitřní sekvencí amplifikovaného fragmentu během anelační fáze amplifikačního cyklu. Emitovaná fluorescence je měřena pomocí zařízení LightCycler[®] 2.0 v jednom ze čtyř různých detekčních kanálů.

Po dokončení amplifikace je provedena analýza křivky tání. Teplota tání T_M je závislá na délce, sekvenci a stupni shody mezi sondou a cílovou DNA. Sonden jsou navrženy k rozlišení těch druhů podle jejich T_M , které jsou detekovány v jednom kanálu.

Automatická identifikace druhů a kontrol


Teploty tání (T_M) vzorků a kontrol jsou analyzovány určeným identifikačním softwarem (SeptiFast Identification Software) a je generována zpráva. Nízké koncentrace koaguláza negativních *stafylokoků* (CoNS) a *streptokoků*, které odráží kontaminaci v průběhu práce, nejsou ve výsledku zobrazeny.

Je-li výsledek pro *Staphylococcus aureus* pozitivní, může být zvaženo následné testování *mecA* rezistence. Pro detailní informace se prosím podívejte do příbalového letáku soupravy LightCycler[®] SeptiFast *mecA* Kit M^{BRAC} (P/N: 04 488 814 001).

ČINIDLA

| | | |
|--|----------------------------|------------------|
| SeptiFast Lys Kit M^{BRAC} | P/N: 04 404 432 001 | 100 testů |
| LM (lytická matrice) skleněné/keramické kuličky | | 100 x |

| | | |
|--|--|-----------------|
| SeptiFast Prep Kit M^{BRAC} | P/N: 04 404 459 001 | 10 testů |
| [1] LB (lytický pufr) < 50% guanidin thiokyanát Pufr Tris-HCl 20% Triton X-100 | <input checked="" type="checkbox"/> Zdraví škodlivý | 20 x 1500 µl |
| [2] PK (proteináza K) 2% proteináza K Glycerol | <input checked="" type="checkbox"/> Zdraví škodlivý | 2 x 850 µl |
| [3] BB (vazebný pufr) < 50% guanidin thiokyanát Pufr Tris-HCl 20% Triton X-100 | <input checked="" type="checkbox"/> Zdraví škodlivý | 10 x 1000 µl |
| [4] IRB (inhibiči odstraňující pufr) < 50% guanidin HCl Pufr Tris-HCl < 40% ethanol | <input checked="" type="checkbox"/> Zdraví škodlivý | 10 x 1800 µl |

| SeptiFast Prep Kit M <small>BRAND</small> | P/N: 04 404 459 001 | 10 testů |
|--|---|-----------------|
| [5] WB (promývací pufr) < 0,2% chlorid sodný Pufr Tris-HCl < 80% ethanol |  Vysoce hořlavé | 10 x 1600 µl |
| [6] EB (eluční pufr) Pufr Tris-HCl | | 10 x 400 µl |
| BET (zkumavky na odběr krve) | | 1 x 50 |
| FC (filtrační sloupce) | | 2 x 5 |

| LightCycler® SeptiFast Kit M <small>BRAND</small> | P/N: 04 469 046 001 | 54 testů |
|--|----------------------------|-----------------|
| [1a] RM 1a (reakční směs 1a) 3 U/µl FastStart Taq polymeráza < 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) | | 3 x 27 µl |
| [1b] RM 1b (reakční směs 1b) < 1% Brj < 0,1% roztok hořčiku < 0,1% dNTP Pufr Tris-HCl | | 3 x 620 µl |
| [2] DM G+ (detekční směs gram-pozitivní) < 0,001% primer, sondy pro G+ < 1% Brj Pufr Tris-HCl | | 3 x 126 µl |
| [3] DM G- (detekční směs gram-negativní) < 0,001% primer, sondy pro G- < 1% Brj Pufr Tris-HCl | | 3 x 126 µl |
| [4] DM F (detekční směs pro houby) < 0,001% primer, sondy pro F < 1% Brj Pufr Tris-HCl | | 3 x 126 µl |
| [5] RC G+ (čínidlová kontrola gram-pozitivní) < 0,001% kontrolní DNA templát pro G+ EDTA Pufr Tris-HCl | | 1 x 330 µl |
| [6] RC G- (čínidlová kontrola gram-negativní) < 0,001% kontrolní DNA templát pro G- EDTA Pufr Tris-HCl | | 1 x 330 µl |
| [7] RC F (čínidlová kontrola pro houby) < 0,001% kontrolní DNA templát pro F EDTA Pufr Tris-HCl | | 1 x 330 µl |
| [8] IC (vnitřní kontrola) < 0,001% DNA v procesní kontrole templátu pro G+, G-, F EDTA Pufr Tris-HCl | | 5 x 100 µl |
| [9] NC (negativní kontrola) < 35% polyethylen glykol 10000 Pufr Tris-HCl | | 10 x 1600 µl |

| SeptiFast Software Set v2.0 | P/N: 05 164 443 001 | 1 x |
|---|----------------------------|------------|
| SeptiFast Identifikační Software v2.0 SeptiFast Macro v2.0 SeptiFast <i>mecA</i> Macro v1.0 SeptiFast MCC Macro v1.0 SeptiFast Proof Files v2.0 | | |

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pro diagnostické použití *in vitro*.
- Tento test je určen pouze pro použití s lidskou krví odebranou do K-EDTA.
- Nepipetovat ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejíst, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a činidly ze soupravy noste ochranné rukavice bez prášku na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek pro ochranu očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjete ruce.
- Nemíchejte dohromady činidla z různých sérií.
- Nemíchejte činidla z různých souprav (nepatří pro činidla určené pro přípravu Master Mix).
- Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- Po uplynutí doby použitelnosti již soupravu nepoužívejte.
- Pravidla bezpečnosti při práci (MSDS) zašle na vyzádaní váš místní zástupce společnosti Roche.
- Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními za použití bezpečných laboratorních postupů, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (8) a dokumentu CLSI M29-A (9). Důkladně vyčistěte a dezinfikujte všechny pracovní povrchy a rukavice pomocí DNA dekontaminačního činidla (např. LTK-008™). Ujistěte se, že jsou rukavice odolné vůči DNA dekontaminačnímu činidlu.
- Při práci s jakýmkoliv činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto činidla nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postříženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí nebo rozspou, rozřeďte je vodou a dosucha vyfěte.
- Zabraňte kontaktu lytického pufru (LB) a vazného pufru (BB) s pokožkou, očima a sliznicemi. Pokud dojde ke styku, okamžitě postříženou oblast omyjte velkým množstvím vody nebo může dojít k popáleninám. Rozlité činidla nejprve rozřeďte vodou a poté vyfěte do soucha. Zabraňte kontaktu LB a BB s roztokem hypochloridu (bělidlo). Tato směs může vytvářet vysoce toxický plyn.
- Pracovní proces musí v laboratorii probíhat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačního (amplifikace/detekce). Preamplifikační činnosti zahrnují přípravu činidel a přípravu vzorku. Materiály a vybavení se musejí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je nutné nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k manipulaci se vzorky a kontrolami, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů cílové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
- Přítomnost enzymu AmpErase v hlavní směsi snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od pozitivních kontrol a vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.

Specifická varování a bezpečnostní upozornění pro použití testu LightCycler® SeptiFast M^{BRAC}

DNA z cizlových organismů LightCycler® SeptiFast M^{BRAC} jsou přítomné v okolním prostředí. Aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům způsobeným detekcí takové DNA z okolního prostředí (DNA kontaminace), je nezbytné stanovit pracovní tok bez kontaminující DNA. Zvláště opatření může být zdrojem DNA kontaminace, protože lidská pokožka a horní cesty dýchací jsou osídlené různými mikroorganismy, které jsou také cílem testu LightCycler® SeptiFast M^{BRAC} [např. *streptokoky* a koaguláza negativní *stafylokoky* (CoNS)]. Následující zásady jsou doporučené k prevenci kontaminace DNA.

Činidla a spotřební materiál pro test LightCycler® SeptiFast M^{BRAC}

- Činidla a spotřební materiál testu LightCycler® SeptiFast M^{BRAC} jsou vyvinuty tak, aby minimalizovaly kontaminaci DNA.
- M^{BRAC} produkty jsou navrženy pro vysoce citlivou detekci nukleové kyseliny bakterií a hub. Byly vyvinuty patentované výrobní procesy určené pro eliminaci DNA kontaminace, která by mohla interferovat s takovými testy.
- Vyhýbejte se zbytečnému otírání a zavírání lahvíček s činidly.

Oděv a rukavice

- Používejte rukavice bez prášku během celého pracovního postupu.
- Zabraňte expozici kůže, nose rukavice přes rukávy laboratorního pláště.
- Vyměňte rukavice okamžitě v případě kontaminace nebo je ošetřete DNA dekontaminačním činidlem (například LTK-008™; rukavice musí být proti tomuto činidlu odolné).
- Nedotýkejte se dlaně a prstové části rukavic při jejich natahování.

Dodržujte laminární proudění

- Po přípravě každého vzorku očistěte povrchy pracovního prostoru v laminárním proudění pomocí DNA dekontaminačního činidla.

POZN.: Ujistěte se, že vybavení je odolné vůči DNA dekontaminačnímu činidlu.

- Čistěte všechny povrchy uvnitř laminárního proudění v pravidelných časových intervalech (stěny, prostory pod spodní deskou, podlahovou desku).
- Ujistěte se, že je laminární proudění bez DNA v případě, že je využíváno více uživateli.
- Zapněte UV světlo a proud vzduchu minimálně 30 minut před začátkem práce.
- Během práce UV světlo vypněte.

Pěče o PCR pracovní stanici

- Očistěte povrchy pracovního prostoru PCR pracovní stanice pomocí DNA dekontaminačního činidla po každém nastavení PCR.
- Čistěte všechny povrchy uvnitř PCR pracovní stanice v pravidelných časových intervalech.
- Zapněte UV světlo minimálně 30 minut před začátkem práce. Ujistěte se, že je při práci UV světlo vypnuto.

POZN.: Vyměňte UV lampu laminárního proudění a PCR pracovní stanice v souladu s pokyny výrobce.

Ošetření zařízení a spotřebního zboží

- Ponechte specifický spotřební materiál a zařízení používané při testu LightCycler® SeptiFast M^{BRAC} v prostoru s laminárním prouděním, je-li to možné.
- Před začátkem práce proveďte minimálně 30 minutové ozáření všech předmětů pomocí UV záření.
- Používejte pouze spotřební materiál neobsahující DNA (viz sekce „Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky“). Používejte je pouze jednou.
- Pro zavření kapilár používejte uzavírací nástroje (pokyny pro manipulaci naleznete v provozní příručce pro zařízení LightCycler® 2.0).
- V případě prasknutí kapiláry se podívejte do provozní příručky k zařízení LightCycler® 2.0 (kapitola „Udržba“).

Bezpečnostní opatření během pipetování

- Lahvičky s čidly, krabičky s pipetovacími špičkami a kapilárami otevřete pouze v boxu s laminárním prouděním.
- Nepoužívejte tytéž pipetovací špičky a kapiláry mimo laminární proudění.
- Nedotýkejte se okraje a závitů otevřených lahvičky. Lahvičky se při pipetování dotýkejte pod jejím okrajem.
- Nedotýkejte se okraje otevřených kapilár.
- Uspořádejte si všechny předměty použité během postupu pod laminárním prouděním v logickém pořadí (zabraňte pipetování na přeskáčku).
- Pokud dojde k úniku, dokončete stávající pracovní krok a pak pracovní prostor okamžitě ošetřete DNA dekontaminačním čidlem (např. LTK-008™).

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

SeptiFast Lys Kit M^{BRAD}

- Skladujte při teplotě 15 až 25 °C.
- Lahvičky otevřete pouze jednou. Pufr znovu nepoužívejte.
- Nepoužívejte po uplynutí data expirace.

SeptiFast Prep Kit M^{BRAD}

- Skladujte při teplotě 15 až 25 °C (nezmrazujte ani neskladujte v lednici).
- Otevřete PK (lahvička 2) maximálně 3-krát.
- Otevřete další lahvičky jen jednou a znehodnot'te všechna nepoužitá činidla.
- Nepoužívejte činidla z různých sérií během jednoho extrakčního procesu.
- Nepoužívejte po uplynutí data expirace.

LightCycler® SeptiFast Kit M^{BRAD}

- Skladujte při teplotě -15 až -25 °C.
- Uchovávejte v temnu.
- Skladujte hlavní směs Master Mix (směsi z [1a], [1b] a [2] nebo [3] nebo [4]) při teplotě 2 až 8 °C maximálně 3 dny.
- Po použití skladujte RC při teplotě 2 až 8 °C po dobu maximálně 10 dnů nebo ihned zmrazte při teplotě -15 až -25 °C po každém použití.
- Otevřete RC maximálně 6-krát.
- Otevřete další lahvičky jen jednou a znehodnot'te všechna nepoužitá činidla.
- Nepoužívejte činidla z různých sérií během jednoho PCR cyklu.
- Nepoužívejte po uplynutí data expirace.

DODÁVANÉ MATERIÁLY

| | | |
|--|---------------------|-----------|
| SeptiFast Lys Kit M ^{BRAD} | P/N: 04 404 432 001 | 100 testů |
| SeptiFast Prep Kit M ^{BRAD} | P/N: 04 404 459 001 | 10 testů |
| LightCycler® SeptiFast Kit M ^{BRAD} | P/N: 04 469 046 001 | 54 testů |
| SeptiFast Software Set v2.0 (jednou) | P/N: 05 164 443 001 | |

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, JEŽ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

je možné zakoupit u společnosti Roche

| | |
|--|----------------|
| Zařízení LightCycler® 2.0 a software 4.1 | 03 531 414 001 |
| Kapiláry LightCycler® M ^{BRAD} (100 µl) | 03 612 066 001 |
| LC karuselová centrifuga 2.0 | 03 709 582 001 |
| Zařízení MagNALyser (230 V) | 03 358 976 001 |
| Kompenzační souprava LightCycler® Multicolor | 04 484 355 001 |
| Chladicí blok SeptiFast | 04 555 864 001 |

Může být zakoupen od jiných firem

| | |
|--|---|
| Centrifuga s vychylujícím rotorem pro 15 ml zkumavky s minimálním přetřesením 4200 G (např. Eppendorf) <ul style="list-style-type: none">• 1 x centrifuga 5810• 2x adaptér (1 pár) s díly pro 15 ml zkumavky s konickým dnem.• 1 x vychylující rotor min. 4200 G | VWR International 521-0076 521-0061 521-0044 |
| Centrifuga (např. Eppendorf) <ul style="list-style-type: none">• 1x MiniSpin® | VWR International 521-0012 |
| 2 tepelné mixéry (např. Eppendorf) <ul style="list-style-type: none">• 2x tepelný mixér Comfort včetně• 1x tepelný blok na 24 x 2,0 ml zkumavky a• 1x tepelný blok na 8 x 15 ml zkumavky | VWR International 460-1112 460-1116 460-1120 |
| Válcový mixér pro zkumavky/lahvičky (např. Stuart Scientific) <ul style="list-style-type: none">• 1x válcový mixér• 1x spirála | VWR International 445-5210 444-1372 |

| | |
|---|---|
| Zkumavky a špičky bez DNA (např. M ^{BRAD} spotřební materiál, greiner bio-one) <ul style="list-style-type: none"> • 5 ml filtrové špičky M^{BRAD} • 1 ml filtrové špičky M^{BRAD} • 100 µl filtrové špičky M^{BRAD} • 20 µl filtrové špičky M^{BRAD} • 1 ml sériové pipety M^{BRAD} • 1,5 ml zkumavky M^{BRAD} | greiner bio-one 940525MG 750289MG 772289MG 774289MG 700371MG 616202MG |
| Zkumavky se šroubovacím uzávěrem 1,5 ml, sterilní | Sarstedt 72.692.105 nebo ekvivalentní |
| DNA dekontaminační činidlo (např. biodelta GmbH) <ul style="list-style-type: none"> • souprava LTK-008™ | biodelta GmbH 200-000 |
| Pipeta 1-5 ml (např. Thermo Life Sciences) <ul style="list-style-type: none"> • 1x Finnpette 1-5 ml | VWR International 613-2520 |
| Pipeta 10-1000 µl (např. Eppendorf) <ul style="list-style-type: none"> • 2x reference 100-1000 µl • 2x reference 10-100 µl • 1x reference 2-20 µl (pro <i>mecA</i> pouze zkušební) | VWR International 613-3650 613-3649 613-3647 |
| Box s laminárním prouděním (např. Cleanair) <ul style="list-style-type: none"> • Skříňka BioSafety EF 4E | VWR International 135-0055 |
| PCR pracovní stanice (např. Safety Cabinet Solutions Ltd.) <ul style="list-style-type: none"> • DNA PCR skříňka Biocap Passive | VWR International 135-6576 |
| Materiály pozitivní kontroly <ul style="list-style-type: none"> • Dodávané jinými společnostmi nebo připravené v laboratoři uživatele (viz „Návrh na přípravu pozitivních kontrolních materiálů“). | |

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

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

Odběr vzorku

Test LightCycler[®] SeptiFast M^{BRAD} je užíván pouze pro vzorky s K-EDTA krví. Krev se odebírá do sterilních zkumavek za použití K-EDTA jako antikoagulacia.

Přeprava a uchovávání vzorků

Při přepravě plné krve je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o přepravě etiologických agens (10). Plná krev musí být přepravována/uchovávána při teplotě -15 až -25 °C nebo při teplotě 2 až 8 °C po dobu maximálně 3 dnů nebo při teplotě 15 až 25 °C po dobu 4 hodin.

Stabilita eluátů

Připravené vzorky použijte ihned po purifikaci DNA. Uchovejte jednu alikvotní část k přípravě dodatečného *mecA* testu, bude-li to nutné (více detailů je uvedeno v soupravě LightCycler[®] SeptiFast *mecA* Kit M^{BRAD}). Eluáty je možné uchovávat při teplotě -15 až -25 °C maximálně 30 dnů nebo při 2 až 8 °C po dobu maximálně 8 dnů nebo při teplotě 15 až 25 °C po dobu 4 hodin.

NÁVOD K POUŽITÍ

Nastavení zařízení LightCycler[®] 2.0 a pracovní stanice PCR

Kompenzace barvy

Přehled: Objekty kompenzace barvy (CCO) jsou vytvářeny na zařízení LightCycler[®] 2.0 pomocí soupravy pro kompenzaci více barev (Multicolor Compensation Set). Před použitím musí být kvalifikovány objekty CCO.

Příprava Vícebarevného kompenzačního experimentu

- Použít soupravu LightCycler[®] Multicolor Compensation Set (P/N: 04 484 355 001).
 - Použít eluční pufr (EB, lahvička 6 ze soupravy SeptiFast Prep Kit M^{BRAD}) (P/N: 04 404 459 001).
- POZN.: Celkem je zapotřebí 70 µl elučního pufru. Lze použít zbylý eluční pufr (EB, lahvička 6 ze soupravy SeptiFast Prep Kit M^{BRAD}). Zbylý eluční pufr musí být skladován při teplotě -15 až -25 °C a je použitelný po dobu až 6 měsíců.**

1. Vezměte jednu lahvičku elučního pufru (EB, lahvička 6 ze soupravy SeptiFast Prep Kit M^{BRAD}).
2. Rozmrazte všechny lahvičky kromě lahvičky 1 (CCB) soupravy LightCycler[®] Multicolor Compensation (MCC) Set, jemně promíchejte a krátce odstředte.
3. Umístěte šest kapilár LightCycler[®] (20 µl) do pozic 1 až 6 karuselu na vzorky LightCycler[®].
4. Připravte roztok CC530 1:6 (lahvička 2, souprava LightCycler[®] MCC) s elučním pufrům (EB, lahvička 6 ze soupravy SeptiFast Prep Kit):
 - Napiplňte 50 µl elučního pufru (lahvička 6, souprava SeptiFast Prep Kit M^{BRAD}) do sterlní zkumavky se šroubovacím uzávěrem o objemu 1,5 ml a přidejte 10 µl CC530 (lahvička 2). Jemně promíchejte a krátce odstředte.
5. Napiplňte 20 µl každé součásti do samostatných kapilár v následujícím pořadí:
 - Poloha rotoru 1: eluční pufr (lahvička 6, SeptiFast Prep Kit M^{BRAD})
 - Poloha rotoru 2: CC530 (ředěný, lahvička 2)
 - Poloha rotoru 3: CC610 (lahvička 3)
 - Poloha rotoru 4: CC640 (lahvička 4)
 - Poloha rotoru 5: CC670 (lahvička 5)
 - Poloha rotoru 6: CC705 (lahvička 6)

POZN.: Nezmenšujte objem. Neměňte pořadí kapilár v karuselu na vzorky LightCycler[®].

6. Kapiláry zazátkujte. Odstředte pomocí LC karuselové centrifugy 2.0 a přemístěte karusel na vzorky LightCycler® do zařízení LightCycler® 2.0.

Zapněte a uložte cyklus kompenzace barvy (CCR)

Pro instalaci a použití makra *SeptiFast* MCC_Macro_v1.0 nebo vyšší se prosím podívejte do příručky pro obsluhu A k zařízení LightCycler® 2.0, kapitola "Spouštění makra Roche".

POZN.: Nepoužívejte pole <assay lot number> v průvodci makrem. Alternativně můžete vložit informace o číslu šarže (lot number) do příslušného pole editoru vzorku.

1. Uložte cyklus (např. s následujícím názvem: *SeptiFast_CCR_RRMMDD-xx*, RR = rok, MM = měsíc, DD = den, xx = číslo cyklu).
2. Po dokončení cyklu je automaticky vytvořena zpráva.
3. Vytiskněte zprávu a uchovejte její výtisk.

Ověření cyklu:

- Je-li zpráva soupravy LightCycler® Multicolor Compensation Set označena záložkou <User Developed or Modified Test Method>, je cyklus MCC neplatný. Cyklus opakujte.

Vytváření CC objektu (CCO)

1. Aktivujte modul analýzy kompenzace barev a stiskněte tlačítko <save CC object>.
2. Aby software *SeptiFast* Identification Software (SIS) neměl problémy s identifikací, je konvence při tvorbě názvu objektu kompenzace barvy (CCO) následující: *SeptiFast_CCO_RRMMDD-xx* (RR = rok, MM = měsíc, DD = den, xx = číslo cyklu, např. *SeptiFast_CCO_050313-01*).

POZN.: Objekt CC musí být kvalifikován před použitím se soupravou LightCycler® *SeptiFast* Kit M^{BRAC} nebo LightCycler® *SeptiFast* mecaN Test M^{BRAC}.

Proveďte experiment testu LightCycler® *SeptiFast* pro kvalifikaci CCO

Kvalifikace nového objektu CCO vyžaduje provedení cyklu testu LightCycler® *SeptiFast* s jednou kontrolou RC a jednou NC splňující kritéria pro přijetí uvedená v "Kontrolním seznamu kvalifikace CCO - část 1". Doporučuje se provést samostatný experiment testu LightCycler® *SeptiFast* zahrnující kontroly RC a 5 NC tak, aby jedna NC mohla být vybrána pro kvalifikaci CCO.

POZN.: Jestliže je již k dispozici platný cyklus testu LightCycler® *SeptiFast* Test, který splňuje kritéria SIS za zařízení LightCycler® 2.0, je zde možnost pokračovat dle části "Vyberte platný cyklus testu LightCycler® *SeptiFast* Test pro kvalifikaci CCO".

- Použijte lyzační soupravu *SeptiFast* Lys Kit M^{BRAC} (P/N: 04 404 432 001).
 - Použijte soupravu *SeptiFast* Prep Kit M^{BRAC} (P/N: 04 404 459 001).
 - Použijte soupravu LightCycler® *SeptiFast* Kit M^{BRAC} (P/N: 04 469 046 001).
 - Použijte šablonu "Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 1" (poskytnutý v této kapitole).
1. Proveďte experiment testu LightCycler® *SeptiFast* Test s provedením celého pracovního postupu (včetně přípravy vzorků a PCR). Experiment zahrnuje kontroly RC a NC pro 3 testy. Doporučuje se použít 4 další negativní kontroly (NC) jako vzorky 1 až 4.

POZN.: Pro detailní popis přípravy vzorků a kontrol, přípravy PCR a plnění a ovládání zařízení LightCycler® 2.0, se prosím podívejte do příslušných částí v tomto příbalovém letáku.

POZN.: Uložte cyklus s názvem umožňujícím jednoznačnou identifikaci (např. *SeptiFast_CCR_RRMMDD-xx*, RR = rok, MM = měsíc, DD = den, xx = číslo cyklu).

2. Proveďte analýzu cyklu dle popisu uvedeného v části "Detekce vrcholu a automatická identifikace druhů" zakončenou vytisknutím zprávy identifikačního software *SeptiFast* (SIS).
3. Vyplňte "Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 1" pro vyhodnocení výsledků pro FLAGS a COMMENTS v RUN FLAGS nebo ASSAY FLAGS a výsledcích v rámečku Specimen pro 4 vzorky-negativní kontroly uvedené ve zprávě SIS. Tento kontrolní seznam musí být použit pro dokumentaci.
4. Přejděte zpět k cyklu testu LightCycler® *SeptiFast* a vyhodnotte parametry Abs Quant modules [G(+) 610 and 640] podle "Kontrolního seznamu CCO - části 1". Tento kontrolní seznam musí být použit pro dokumentaci. Začnete s modulem Abs Quant G(+) 610. Postupujte dle pokynů níže také pro modul Abs Quant G(+) 640.
 - Nalistujte modul analýzy [Abs Quant G(+) 610 Module] a klikněte na něj.
 - Zvětšíte okno analýzy kliknutím na lištu pro manipulaci.
 - Zkontrolujte počet kopií (CP).
 - Zadejte A (Ano) nebo N (Ne) do sloupce "CP nebo CP in []" v závislosti na výsledku.
 - Dokončete svou dokumentaci vytisknutím obrazovky výsledků analýzy softwaru LightCycler® (vyberte <print window> z nabídky File). Vytisknutou kopii výsledků si musíte uschovat. Potvrďte tento krok pomocí zatřítka v "Kontrolním seznamu kvalifikace CCO - část 1" ve sloupci "Print Window ✓".
5. Zkontrolujte, zda jsou splněna kritéria pro přijetí dle "Kontrolního seznamu CCO - část 1".

6. Zvolte jednu z negativních kontrol (NC) bez CP a pokračujte kapitolou "Kvalifikace objektu CC (CCO)".

POZN.: Cyklus testu LightCycler® *SeptiFast* Test, který splňuje všechna kritéria pro přijetí, je možné použít jako soubor LightCycler® *SeptiFast*ix pro všechny další kvalifikace CCO. Cyklus testu LightCycler® *SeptiFast* Test, který nespĺňuje veškerá kritéria pro přijetí, nesmí být použit pro kvalifikaci CCO. V takovém případě zopakujte experiment testu LightCycler® *SeptiFast* Test s úplnými novými negativními kontrolami (NC).

Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 1 (Kontrola cyklu testu LightCycler® SeptiFast Test a výběr jedné NC)

Pro účely dokumentace se doporučuje zkopírovat tento kontrolní seznam.

Operator's Name / Date: _____

LightCycler® SeptiFast Test run (*.ixo-file): _____

Viz část "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast Test pro kvalifikaci CCO" krok 2 a 3:

- Analyzujte cyklus testu LightCycler® SeptiFast Test.
- Exportujte cyklus testu LightCycler® SeptiFast Test do SIS.
- Vyhodnoťte výsledky pro FLAGS nebo COMMENTS ve sloupcích Run Flags a Assay Flags zprávy SIS.

| Run Flags (A/N) | Assay Flags (A/N) |
|--------------------|----------------------|
| | |

Kritéria pro přijetí 1: "Ne (N)" ve sloupci Run Flags a Assay Flags.

POZN.: V případě, že se ve sloupci Run Flags nebo Assay Flags vyskytne "ANO (A)", zopakujte pracovní postup testu LightCycler® SeptiFast Test s úplně novými NC.

- Vyhodnoťte výsledky v rámečku Specimen zprávy SIS pro 4 vzorky-NC (platí pouze pro vyhrazený cyklus testu LightCycler® SeptiFast Test se 4 vzorky-NC).

Kritéria pro přijetí 2: "∅ : no analyte detected" ve sloupci s výsledky pro vzorky-NC.

POZN.: Vzorky-NC s detekovaným analytem nesmí být použity pro další analýzu.

| |
|--------------------------|
| Print SIS Report ↓ |
| |

- Vytiskněte si zprávu SIS pro účely dokumentace.

Viz část "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast Test pro kvalifikaci CCO" krok 4 až 6:

- Přejděte zpět k cyklu testu LightCycler® SeptiFast Test pro analýzu obou modulů Abs Quant [G(+) 610 a 640].

| Vzorek | CP nebo CP in [] (A/N) | |
|--|----------------------------|-----------------------|
| | Abs Quant G(+) 610 | Abs Quant G(+) 640 |
| #NC# | | |
| Platí pouze pro vyhrazený cyklus testu LightCycler® SeptiFast s 4 vzorky-NC: | | |
| Vzorek 1-NC | | |
| Vzorek 2-NC | | |
| Vzorek 3-NC | | |
| Vzorek 4-NC | | |

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| Print Window 610 ↓ | Print Window 640 ↓ |
| | |

Kritéria pro přijetí 3: "Ne (N)" ve sloupci "CP nebo CP in []" pro oba moduly Abs Quant G(+) 610 a Abs Quant G(+) 640 u alespoň jedné NC.

POZN.: Pokud žádná NC nespĺňuje tato kritéria pro přijetí, zopakujte pracovní postup testu LightCycler® SeptiFast Test s úplně novými negativními kontrolami (NC).

Kritéria pro přijetí 1, 2 a 3 splněna:

| ANO | NE |
|--|--|
| | |
| Cyklus může být použit pro kvalifikaci CCO | Cyklus nemůže být použit pro kvalifikaci CCO |

NC zvolená pro kvalifikaci (název vzorku): _____

Vyberte platný cyklus testu LightCycler® SeptiFast pro kvalifikaci CCO

Nebo viz část "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast pro kvalifikaci CCO". Platí pouze pokud je již k dispozici platný cyklus testu LightCycler® SeptiFast, který splňuje kritéria platnosti popsaná v části "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast pro kvalifikaci CCO" na zařazení LightCycler® 2.0.

- Použijte šablonu "Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 1" (poskytnutý v části "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast Test pro kvalifikaci CCO").
1. Vyberte dříve provedený platný cyklus testu LightCycler® SeptiFast. Tento cyklus by měl být potvrzen jako platný v příslušné zprávě SIS.
 2. Použijte nový CCO u platného cyklu testu LightCycler® SeptiFast:
 - Otevřete vybraný platný soubor testu LightCycler® SeptiFast Test. Otevřete modul cyklu.
 - Vyberte nový objekt CCO z nabídky <Color Compensation (On)> následujícím postupem (viz obrázek 1):
 - Klikněte na <Color Compensation (On)>.
 - Klikněte na <Select Color Compensation...>.

Obr. 1: Použití CCO



- Otevře se dialogové okno (<Select Object>). Najděte a vyberte nový objekt CCO. Klikněte na <OK>. Otevře se další dialogové okno (<Color Compensation Channels>). Neaktivujte žádný z kanálů. Klikněte na <OK>.
 - Pokračujte stejným způsobem pro všech 12 T_M vyvolávacích (Calling) modulů (3 testy, 4 kanály) a 2 moduly absolutní kvantifikace (Absolute Quantification).
3. Proveďte analýzu cyklu LightCycler® SeptiFast podle popisu uvedeného v části "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast pro kvalifikaci CCO", v krocích 2 a 3.
 4. Vyhodnoťte oba moduly Abs Quant (G(+) 610 a 640) dle popisu v části "Proveďte experiment testu LightCycler® SeptiFast pro kvalifikaci CCO", kroky 4 až 6.
 5. Uložte cyklus s nově použitým objektem CCO. Otevře se dialogové okno (<Change Log>). Zadejte důvod pro změny (např. nově použitý CCO).

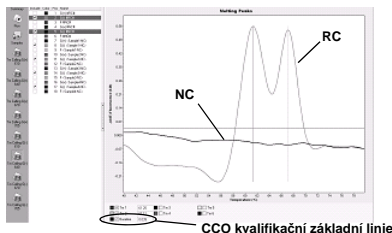
Kvalifikace objektu CC (CCO)

1. Otevřete vyhrazený soubor testu LightCycler® SeptiFast.
2. Kvalifikujte CCO použitím vybrané NC (viz "Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 1").
3. Vyhodnoťte všechny T_M vyvolávací (Calling) moduly podle "Kontrolního seznamu kvalifikace CCO - část 2". Tento kontrolní seznam musí být použit pro dokumentaci. Postupujte dle pokynů níže pro všechny vyvolávací moduly T_M (Calling modules) a cílové rozsahy T_M (Target Ranges). Začněte vyvolávacím modulem T_M G(+) 640:
 - Klikněte na modul analýzy [např. TM Calling G(+) 640].
 - Aktivujte zvolenou NC spolu s #RC# pro získání přehledu. (Automatické nastavení stupnice se upraví dle nejvyššího vrcholu.)
 - Upravte základní linii pomocí příslušných hodnot "CCO kvalifikační základní linie" uvedených v "Kontrolním seznamu kvalifikace CCO - část 2" ve sloupci "CCO kvalifikační základní linie" (viz obr. 2).

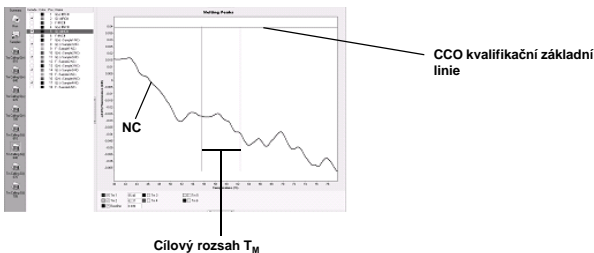
POZN.: Každý cílový rozsah T_M vyžaduje nové a rozdílné nastavení základní linie pro kontrolu NC.

- Aktivujte pouze vybrané NC (viz obr. 3). Automatické nastavení stupnice se upraví dle fluorescence pozadí NC. Základní linie nemusí být nadále viditelná.

Obrázek 2: Křivky tání pro RC a NC (Přehled)



Obrázek 3: Obrazovka výsledků analýzy softwaru LightCycler® pro NC



- Vyberte dva sloupce T_M pro označení dolních a horních hodnot pro cílový rozsah T_M . Viz "Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 2", sloupec "Cílový rozsah T_M " pro úpravu hodnot v oknech sloupce T_M .
 - Zkontrolujte maximální výšku fluorescence vybrané NC v rámci "Cílového rozsahu T_M ".
 - Zadejte A (Ano) nebo N (Ne) do sloupce "Maximální výška fluorescence pod CCO-kvalifikační základní liní" v závislosti na výsledku.
 - Dokončete svou dokumentaci vytisknutím obrazovky výsledků analýzy softwaru LightCycler® (vyberte <print window> z nabídky File). Vytisknutou kopii výsledků si musíte uschovat. Potvrďte tento krok pomocí zatřítka v "Kontrolním seznamu kvalifikace CCO - část 2" ve sloupci "Print Window √".
4. Opakujte krok 3 dokud všechny cílové rozsahy T_M u všech vyvolávacích modulů T_M uvedených v "Kontrolním seznamu kvalifikace CCO - část 2" nejsou analyzovány a zdokumentovány vyplněním kontrolních seznamů a vytištěním zprávy.
 5. Zkontrolujte, zda jsou splněna kritéria pro přijetí dle "Kontrolního seznamu CCO - část 2".

CCO, který splňuje kritéria pro přijetí, je platný a může být použit po dobu šesti měsíců.

Nový cyklus kompenzace barvy a kvalifikace musí být proveden každých 6 měsíců.

Řešení potíží

Pokud kritéria pro přijetí uvedená v "Kontrolním seznamu kvalifikace CCO - část 2" nejsou splněna, CCO není platný a nelze jej použít. Experiment MCC musí být zopakován a musí být provedena nová kvalifikace CCO pro nový objekt CCO. Jestliže se kvalifikace CCO nezdaří u třetího CCO, kontaktujte své místní zástupce firmy Roche.

Kontrolní seznam kvalifikace CCO - část 2

Pro účely dokumentace se doporučuje zkopírovat tento kontrolní seznam.

| Operator's Name / Date: _____ | | | | | | | | | |
|--|---|------------------------------------|---------------------|--|-------------------|-----|----|--|---|
| Cyklus testu LightCycler® SeptiFast Test (soubor *.ixo) použitý pro kvalifikaci CCO: _____ | | | | | | | | | |
| NC zvolená pro kvalifikaci (název vzorku): _____ | | | | | | | | | |
| CCO (soubor *.ixo): _____ | | | | | | | | | |
| Viz část "Kvalifikace objektu CC (CCO)", kroky 1 až 4: • Kvalifikujte CCO s použitím vybrané NC. | | | | | | | | | |
| Vývolávací modul T_M (Calling Module) | Vzorek | CCO kvalifikační základní linie | Cílový rozsah T_M | Maximální výška fluorescence pod CCO-kvalifikační základní linií (A/N) | Print Window ↓ | | | | |
| T_M Calling G(+) 640 | NC | 0,029 | 49,03 – 56,04 | | | | | | |
| | NC | 0,037 | 59,07 – 63,07 | | | | | | |
| T_M Calling G(+) 670 | NC | 0,061 | 49,32 – 53,42 | | | | | | |
| T_M Calling G(+) 705 | NC | 0,031 | 60,33 – 64,33 | | | | | | |
| T_M Calling G(-) 640 | NC | 0,039 | 55,48 – 62,37 | | | | | | |
| | NC | 0,004 | 63,81 – 68,06 | | | | | | |
| T_M Calling G(-) 670 | NC | 0,256 | 48,88 – 53,38 | | | | | | |
| | NC | 0,223 | 55,50 – 60,00 | | | | | | |
| T_M Calling F 670 | NC | 0,107 | 49,51 – 53,51 | | | | | | |
| <p>Kritéria pro přijetí: "ANO (A)" ve sloupci "Maximální výška fluorescence pod CCO-kvalifikační základní linií" u všech vývolávacích modulů T_M (Calling Modules) a CCO-kvalifikačních základních linií u vybrané NC.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: center;">ANO</th> <th style="text-align: center;">NE</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">CCO je platný a lze jej použít po dobu šesti měsíců.</td> <td style="text-align: center;">CCO nesmí být použit. Viz část Řešení potíží.</td> </tr> </table> | | | | | | ANO | NE | CCO je platný a lze jej použít po dobu šesti měsíců. | CCO nesmí být použit. Viz část Řešení potíží. |
| ANO | NE | | | | | | | | |
| CCO je platný a lze jej použít po dobu šesti měsíců. | CCO nesmí být použit. Viz část Řešení potíží. | | | | | | | | |

Instalace softwaru SeptiFast Identification Software v2.0 (SIS):

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

1. Přihlaste se do systému LightCycler® jako administrátor.
2. Vložte CD se softwarem soupravy SeptiFast do mechaniky CD v datové stanici LightCycler®.

POZN.: Jestliže se nastavení programu nespustí automaticky, spusťte instalaci SIS ručně kliknutím na soubor setup.exe, který se nachází na CD SeptiFast Software Set.

3. Při první instalaci: Nemáte-li nainstalován Microsoft NET 1.1, budete vyzváni provést instalaci na začátku nastavení SIS. Microsoft NET 1.1 musí být instalován, jinak SIS nebude pracovat správně.
4. Stiskněte <OK> k započetí instalace SIS, poté pokračujte dle průvodce instalací.
5. Zvolte <just me>, bude-li s datovou stanicí LightCycler® pracovat pouze jeden uživatel, zvolte <everyone>, bude-li s datovou stanicí LightCycler® pracovat více než jeden uživatel.
6. Potvrďte okno <Setup succeeded> tlačítkem <OK> (SIS může být poté spuštěn na počítači přes jeho ikonu).
7. Datová složka pro soubory *.ixo: <C:\Export to SIS> je proveden automaticky.

Test správnosti instalace SIS (test s LightCycler® SeptiFast M^{BRACI} a LightCycler® SeptiFast mecA Kit M^{BRACI}):

1. Všechny důkazní soubory jsou automaticky kopírovány z SeptiFast Software Set CD do složky <C:\Export to SIS>.
2. Klikněte dvakrát na ikonu SIS na ploše a stiskněte <Start>.
3. Zvolte důkazní soubor z <C:\Export to SIS> (SeptiFast Proof v2.0.ix0 nebo z SeptiFast mecA Proof v2.0).
4. Zvolte „NO“ pro rozhodnutí, zda zpráva LightCycler® obsahuje příznak <User Developed or Modified Test Method>.
5. Soubor bude analyzován automaticky a data budou zobrazena.
6. Zprávu vytiskněte.
7. Otevřete a vytiskněte související pdf soubory (SeptiFast Proof v2.0.pdf nebo SeptiFast mecA Proof v2.0.pdf).
8. Tištěná zpráva a tištěný proof.pdf si musí navzájem odpovídat. Pokud ne, kontaktujte prosím svého mistřího zástupce společnosti Roche.
9. Postup 3-8 opakujte s druhým důkazním souborem.

Odinstalování SIS:

1. Přihlaste se do systému LightCycler® jako administrátor.
2. Klikněte na <Start> na úkolové liště datové stanice LightCycler®.
3. Zvolte <Settings - Control Panel - Add/Remove Programs>.
4. Zobrazí se seznam aktuálně instalovaných programů, klikněte na <SIS>.
5. Zvolte <Remove> a potvrďte tento příkaz pomocí <Yes>.

Instalace maker pro SeptiFast:

1. Instalace maker z CD SeptiFast Software Set v2.0.
2. Pro instalaci makra použijte prosím provozní příručku pro zařízení LightCycler® 2.0 („pro in vitro diagnostické použití“).

Připravte box s laminárním prouděním a PCR pracovní stanici

1. Důkladně vyčistěte a dekontaminujte box s laminárním prouděním a PCR pracovní stanici (např. pomocí LTK-008™).
2. Zapněte na dobu nejméně 30 minut: UV světlo a proud vzduchu v boxu s laminárním prouděním, UV světlo v PCR pracovní stanici.
3. Během práce UV světlo vypněte.
4. Otevřete soupravu LightCycler® SeptiFast Kit M^{BRACI} a vyjměte:
 - 1 lahvičku s vnitřní kontrolou a 1 lahvičku s negativní kontrolou a nechte je roztát při teplotě 2 až 8 °C ve stojanu na přípravu vzorků (není součástí dodávky).
 - 1 lahvičku RM 1a, RM 1b, DM G+, DM G-, DM F, RC G+, RC G-, RC F a nechte je roztát v SeptiFast chladicí skříni při teplotě 2 až 8 °C během přípravy vzorků.
5. Zapněte: Tepelný mixér 1 (pro 15 ml zkumavky) a nastavte na teplotu 56 °C, tepelný mixér 2 (pro 2,0 ml zkumavky) a nastavte na teplotu 70 °C.
6. Umístěte dostatečné množství lahviček s EB (1 lahvička na jeden vzorek/NC) do tepelného mixéru 2 (70 °C).
7. Umístěte zkumavky s krví nebo lahvičky se vzorky do lahvového válce a michejte po dobu 30 minut. Zpracujte okamžitě.

Příprava vzorků a kontrol

POZN.: Proveďte všechny pracovní postupy v boxu s laminárním prouděním.

Návrh na přípravu materiálu pozitivní kontroly

- Jakmile je započat postup přípravy vzorku, je třeba všechny kroky dokončit.
- Materiál pozitivní kontroly je možné zakoupit u jiných společností.
- Je-li příprava prováděna v laboratoři uživatele, je třeba vybrat dobře charakterizované klinické izoláty podle místní prevalence a klinického významu. Tyto izolované kolonie mají být resuspendovány a jehlou aplikovány do negativní krve až do koncentrace cca 300 CFU/ml.
- Pro pozitivní kontrolu ATCC materiálu 33592 může být použit methicilin resistantní *S. aureus*, který umožňuje užití eluátu jako pozitivní kontroly pro LightCycler® SeptiFast Test M^{BRACI} a také LightCycler® SeptiFast mecA Kit M^{BRACI} (P/N: 04 488 814 001).
- Kmen byl kultivován po dobu 18-24 hodin při teplotě 28 až 37 °C na krevním agaru (5% ovčí krev) a resuspendována v pufru do 0,5 McFarland (~1,5 x 10⁸ CFU/ml). Tato suspenze je jehlou přenesena do negativní krve s konečnou koncentrací 300 CFU/ml.

Protokol před lýzou s pomocí soupravy SeptiFast Lys Kit M^{BRAC}

POZN.: Pozorně si přečtěte provozní příručku k přístroji MagnALyser.

1. Použijte 1 vhodné označené lahvičky s LM pro každý vzorek nebo negativní kontrolu.
2. Otevřete lahvičku a přeneste 1500 µl vzorku krve nebo negativní kontroly.
3. Zkumavku pevně uzavřete.

POZN.: Neoznačujte zkumavky na povrch uzavěru.

4. Předyžijte vzorky v přístroji MagnALyser po dobu 70 sekund při 7000 ot./min.
5. Ponechte lahvičky stát mimo zařízení po dobu 10 minut. **Necentrifugujte!**

Příprava vzorku pomocí soupravy SeptiFast Prep Kit M^{BRAC}

POZN.: Všechny činidla by měly být číré roztoky. Došlo-li k vytvoření sedimentu, zahřejte roztok (maximálně do 37 °C). Jemně třepejte, dokud se sediment nerozpustí.

1. Přidejte 150 µl PK do BET 1.
2. Přidejte 1 ml předlýzovaného vzorku nebo NC do BET 1. Vyvarujte se pipetování pevné lytické matric nebo pěny.
3. Uzavřete a krátce rozvířte.
4. Přidejte 10 µl vnitřní kontroly (IC). Používejte novou špičku pipety pro každý vzorek nebo negativní kontrolu (NC).
5. Přidejte obsah 2 lahviček LB, uzavřete a ihned dokonale rozvířte.
6. Inkubujte po dobu 15 minut při teplotě 56 °C za jemného míchání (např. 500 ot./min. pomocí tepelného mixéru Eppendorf).

POZN.: Veškerá tekutina v BET 1 musí být překryta inkubačním prostředkem.

7. Přidejte obsah 1 lahvičky BB, uzavřete a rozvířte.
8. Umístěte FC na BET 2. Nedotýkejte se vnitřní strany nebo výstupu FC.
9. Pipetujte polovinu vzorku připravené směsi z BET 1 na filtr FC (přibližně 2,7 ml).
10. Uzavřete a umístěte do odstředivky sestavy BET 2-FC na 1 minutu při 1900 G.
11. Pipetujte zbytek vzorku připravené směsi z BET 1 na filtr FC (přibližně 2,7 ml). Používejte novou špičku pipety pro každý vzorek nebo negativní kontrolu (NC).
12. Uzavřete a umístěte do odstředivky sestavy BET 2-FC na 3 minuty při 1900 G.
13. Umístěte FC na BET 3. Znehodnoťte BET 2 promytím.
14. Přidejte obsah jedné lahvičky IRB na filtr FC v BET 3.
15. Uzavřete a umístěte do odstředivky sestavy BET 3-FC na 2 minuty při 4200 G.
16. Přidejte obsah jedné lahvičky WB na filtr FC v BET 3.
17. Uzavřete a umístěte do odstředivky sestavy BET 3-FC na 10 minut při 4200 G.
18. Umístěte FC na BET 4. Znehodnoťte BET 3 promytím.
19. Umístěte BET 4 do odstředivky na 1 minutu při 4200 G.
20. Umístěte FC na BET 5. Znehodnoťte BET 4.
21. Pipetujte 300 µl předehřáté EB (70 °C) na střed FC.
22. Uzavřete a inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
23. Centrifugujte zkumavky 2 minuty při 4200 G.
24. Znehodnoťte FC. Přeneste eluát do 1,5 ml lahviček (např. sérovou pipetou od greiner bio-one). Zabraňte styku se stěnami zkumavky.

Příprava činidla pomocí soupravy LightCycler® SeptiFast Kit M^{BRAC}

POZN.: Doporučujeme provádět všechny manipulační postupy v PCR pracovní stanici odděleně od místa přípravy vzorku.

1. Odstraňte SeptiFast chladič blok s lahvičkami s činidlem z lednice, dekontaminujte DNA dekontaminačním činidlem (např. LTK-008™) a přeneste do PCR pracovní stanice.
2. Krátce rozvířte rozpuštěná činidla (mimo RM 1a) a odstředte všechna činidla (došlo-li k vytvoření sedimentu, zahřejte roztok na 37 °C po dobu 5 minut a jemně promíchejte do té doby, než se sediment rozpustí).
3. Umístěte lahvičky s rozpuštěnými činidly a vymyjte lahvičky na označených místech v SeptiFast chladičím bloku.
4. Otevřete lahvičky RM 1b, RM 1a, DM G+, DM G- a DM F.
5. Pipetujte 600 µl RM 1b do RM 1a, jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Pipetujte 200 µl reakční směsi z 1a do každé lahvičky DM G+, DM G- a DM F, aby se vytvořil Master Mix MM G(+), MM G(-) a MM F; jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

Příprava PCR reakcí

1. Umístěte požadovaný počet kapilár do SeptiFast chladičím bloku, 3 kapiláry pro RC (na pozici 1, 2, 3), 3 kapiláry pro eluát NC (na pozici 4, 5, 6), 3 kapiláry pro každý eluát vzorku (na pozici 7 a vyšší).
2. Pipetujte 50 µl MM G(+) do každé kapiláry horní řady.
3. Pipetujte 50 µl MM G(-) do každé kapiláry prostřední řady.
4. Pipetujte 50 µl MM F do každé kapiláry dolní řady.
5. Otevřete první lahvičku s eluátem. Začněte s lahvičkou na pravé straně chladičím bloku SeptiFast.
6. Pipetujte 50 µl vymytého vzorku do každé z výše uvedených tří kapilár obsahujících MM G(+), MM G(-) a MM F.

POZN.: Vyměňte špičku pro každém pipetování.

7. Uzavřete tři kapiláry zavíracím nástrojem (součástí zařízení LightCycler® 2.0; pro způsob použití odkazujeme na provozní příručku k zařízení LightCycler® 2.0).
8. Pokračujte se zbývajícími vymytými vzorky, jak bylo popsáno v krocích 5-7. Pipetujte eluát NC jako poslední do kapilár na pozicích 4, 5 a 6.
9. Otevřete RC G+.
10. Pipetujte 50 µl do kapiláry na pozici 1.
11. Uzavřete kapiláru a poté uzavřete RC G+.
12. Pipetujte RC G- a RC F do kapiláry na pozici 2 a 3, jak bylo popsáno v krocích 9-11.
13. Přesuňte všechny kapiláry podle jejich čísel do LightCycler® karusel na vzorky.
14. Centrifugujte LightCycler® karusel na vzorky pomocí LC karuselové centrifugy 2.0.
15. Umístěte LightCycler® karusel na vzorky do zařízení LightCycler® 2.0.

- Označené vrcholy mimo specifikovaný rozsah T_M se objeví ve zprávě SIS.

Tabulka 2: T_M rozmezí pro platné vrcholy

| | CH 610 | | CH 640 | | CH 670 | | CH 705 | |
|------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | Nízké T_M [°C] | Vysoké T_M [°C] | Nízké T_M [°C] | Vysoké T_M [°C] | Nízké T_M [°C] | Vysoké T_M [°C] | Nízké T_M [°C] | Vysoké T_M [°C] |
| G(+) | 48 | 53 | 49 | 64 | 49 | 59 | 45 | 65 |
| G(-) | 52 | 66 | 55 | 69 | 48 | 65 | 57 | 62 |
| F | 56 | 61 | 44 | 58 | 49 | 62 | 51 | 62 |

- Hodnoty pro základní úroveň jsou předem definovány dle následující tabulky a **nesmí být měněny**. (Jsou-li nechtěně změněny, zadejte hodnoty znovu dle seznamu, jinak bude cyklus označen příznakem.)

Tabulka 3: Základní hodnoty

| | CH 610 | CH 640 | CH 670 | CH 705 |
|------|--------|--------|--------|--------|
| G(+) | 0,159 | 0,027 | 0,061 | 0,027 |
| G(-) | 0,234 | 0,001 | 0,236 | 0,065 |
| F | 0,196 | 0,033 | 0,111 | 0,059 |

Nastavení kolmice T_M

- Po dokončení cyklu zobrazí průvodce experimentem **<Analyses have been created>**.
- Posuňte okno dolů (nestiskněte **<Finish>**).
- Ujistěte se, že jsou viditelné hodnoty T_M a výchozí úroveň.
- Klikněte na modul analýzy [např. T_M vyvolání G(+) 610].
- Aktivujte všechny pozice testu, abyste získali přehled [např., G(+)].
- Klikněte pouze na pozici G(+)-#RC#.
- Upravte kolmice T_M na vrcholy nad základní linií, zaměřte se pouze na platné rozmezí T_M (viz tabulka 2: T_M rozmezí pro platné vrcholy). Není-li nad základní linií žádný vrchol, kolmice T_M musí být smazána (zrušte zaškrtnutí v odpovídajícím rámečku). Na konci vyvolání T_M pro specifickou kapiláru pouze maxima vrcholů musí být označena kolmicemi T_M (ploché linie, sklony nebo ramena nesmí být označena kromě zde označených organizmů). V některých případech u nízkých koncentrací *E. faecium* (G+, CH 705, T_M 51,8 - 55,9) a *C. albicans* (F, CH 640, T_M 53,4 - 57,5) se mohou vyskytnout ramena odpovídajících IC vrcholů (G+, CH 705, T_M 45,5 - 49,6; F, CH 640, T_M 44,8 - 48,0). Označte tato ramena pomocí T_M kolmic v T_M 53,9 (G+, CH 705) a T_M 55,5 (F, CH 640).
- Aktivujte další pozici [např. G(+)-#NC#] spolu s G(+)-#RC# pro získání přehledu. (Automatické nastavení stupnice se upraví na nejvyšší vrchol).
- Aktivujte pouze vybranou pozici [např. G(+)-#NC#]. (Automatické nastavení stupnice se upraví na základní vrcholy pro NC. Základní linie nemusí být nadále viditelná.)
- Pokračujte s detekcí vrcholů jak uvedeno v krocích 5-7.
- Po ukončení analýzy jednoho testu [např. T_M vyvolání G(+) 610] pokračujte s následným testem, jak je popsáno v krocích 4-10.

Dokončete T_M vyvolání

- Přesuňte průvodce experimentem do středu monitoru a stiskněte **<Finish>**.
- Zpráva je automaticky vygenerována a musí být vytisknuta.
- Cyklus je automaticky uložen.

POZN.: Jestliže dojde k jakékoli změně specifických dat pacienta v oblasti v <závorkách> softwaru LightCycler®, uživatel musí zvolením a klepnutím na ikony „Abs Quant G(+) 610“ a „Abs Quant G(+) 640“ aktualizovat databázi.

- Exportujte soubor *.ixo do <C:\Export to SIS>.
- Zkontrolujte zprávu, neobsahuje-li příznaky a zda je zobrazeno **<run state: complete>**.
- Jestliže ve zprávě softwaru LightCycler® (LCS) jsou uvedeny příznaky nebo jiná hlášení, je cyklus neplatný a všechny vzorky se musí znovu testovat.

Automatická identifikace vrcholů pomocí identifikačního softwaru SeptiFast (SIS)

- Klikněte dvakrát na ikonu SIS na ploše a stiskněte **<Start>**.
- Zvolte cyklus ze složky <C:\Export to SIS> a nahrajte soubor *.ixo.
- Zvolte „Yes“, nebo „No“ podle toho, zda zpráva LightCycler® obsahuje příznak **<User Developed or Modified Test Method>**.
- Soubor *.ixo bude automaticky analyzován a data budou zobrazena ve zprávě.
- Zprávu SIS vytiskněte.

VÝSLEDKY

Validace cyklu

Ověření cyklu je provedeno automaticky pomocí identifikačního softwaru SeptiFast v2.0 (SIS). Neplatné cykly jsou zobrazeny a jsou označeny **X**.

V případě neplatnosti je nutné opakovat celý cyklus (všechny 3 testy). Systémové chyby, které mohou způsobit neplatnost cyklu, jsou uvedeny v části Řešení potíží v tomto dokumentu.

Validace testu

Příznaky, které mohou vzniknout ve spojitosti s platností tří různých testů, a jejich vysvětlení, jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Příznaky testu a validace vzorku

| | Poznámky | Interpretace |
|---------------|---|---|
| ASSAY FLAG | NC: IC not detected | V negativní kontrole nebyly detekovány cíl ani vnitřní kontrola |
| ASSAY FLAG | NC: < CH ..., TM ..., PH ..., CP ¹ ...>, < druhy > | V negativní kontrole byl detekován druh |
| ASSAY FLAG | NC: more amplicons detected | Další příznak, jestliže byly detekovány více než 3 amplikony v negativní kontrole |
| ASSAY FLAG | RC: No amplicon: <druhy> | Nebyly detekovány žádné, ani více ampliconů v RC |
| ASSAY FLAG | RC: more amplicons not detected | Další příznak, jestliže nebyly detekovány více než 3 amplikony v RC |
| SPECIMEN FLAG | IC not detected | Nebyl detekován ani cíl ani IC. |

¹ CP je zobrazen pouze pro G(+) Channel 610, 640.

Interpretace výsledků

PŘÍZNAKY a POZNÁMKY mohou být generovány identifikačním softwarem SeptiFast v2.0 (SIS) jako RUN FLAGS, ASSAY FLAGS a FLAGS v rámečku SPECIMEN (viz níže). Obsluha musí provést kontrolu výtisku(ů) cyklu ohledně FLAGS nebo COMMENTS ve všech rámečcích.

Obrázek 5: Rámeček Specimen

| Specimen | Assay | Data | Result | Flags | Comment |
|-------------------------------|-------|---------------------------------|---------|-------|---------|
| Vzorek SeptiFast ¹ | G(+) | <CH ..., TM ..., PH ..., CP...> | <druhy> | | |
| | G(-) | | ⊖ | | |
| | F | | ⊖ | | |

¹Hodnoty CP jsou zobrazeny pouze pro G(+) Channel 610, 640.

Další informace je možné získat v polích COMMENT v RUN FLAGS a ASSAY FLAGS.

Výsledky vzorku

Názvy <druhy> v poli RESULT znamenají, že vzorek byl testován jako pozitivní na příslušné mikroorganismy. Vypočítaná data relevantních vrcholů jsou zobrazena v políčku DATA včetně kanálu (CH), bodu tání (T_M), výšky vrcholu (P_H) a bodu křížení (CP¹).

Symbol ⊖ v políčku RESULT znamená, že nebyl detekován žádný analyt v rámci definovaných kritérií pro dané druhy.

Interpretace hodnot CP pro G(+) Channels 610 nebo 640

Výsledky zobrazené v modulech analýzy pro absolutní kvantifikaci softwaru LightCycler[®] je nutné verifikovat vůči výsledkům zobrazeným ve zprávě SIS.

1. Klikněte na ikonu Abs Quant 610.
2. Ujistěte se, že sloupec s výsledky CP je viditelný, popř. posuňte okna s grafy na pravou stranu obrazovky.
3. Zvolte pozici individuální kapiláry, pro kterou je zobrazena hodnota CP. Vizualně zkontrolujte amplifikační růstovou křivku a ujistěte se, že si růst a hodnota CP odpovídají.
4. Pomocí níže vysvětleného „pravidla hraniční hodnoty CP“ porovnejte zobrazený výsledek vzorku s daným výsledkem vzorku ve zprávě SIS. Ujistěte se, že oba výsledky souhlasí. V opačném případě kontaktujte místní zastoupení Roche.
5. Opakujte výše uvedené kroky 2 až 4 pro všechny pozice kapilár se zobrazenou hodnotou CP.
6. Klikněte na ikonu Abs Quant 640.
7. Opakujte výše uvedené kroky 2 až 5 pro všechny pozice kapilár se zobrazenou hodnotou CP.

Pravidlo hraniční hodnoty CP

Několik organismů ze seznamu SeptiFast Master List (SML) se nachází na těle jako běžná flóra a lze je přenést do testu SeptiFast pomocí krevního náběru. Hraniční hodnota CP je funkce softwaru, která snižuje míru pozitivní detekce určitých komenzálních organismů na základě předpokladu, že to jsou kontaminanty a ne agens způsobující skutečné infekce. Pravidlo hraniční hodnoty CP platí pouze pro CoNS a *Streptococcus spp.* a bylo nastaveno na 20 cyklů. Hodnota CP < 20 označuje pozitivní výsledek, zatímco hodnota CP > 20 se pokládá za kontaminaci a je ve zprávě SIS zobrazena jako negativní výsledek.

Testování mecA

Je-li výsledek pro *Staphylococcus aureus* pozitivní, může být zváženo následné testování *mecA* rezistence. Pro detailní informace se prosím podívejte do příbalového letáku k LightCycler[®] SeptiFast *mecA* Kit M^{ensu} (P/N: 04 488 814 001).

KONTROLA KVALITY

Jedna negativní kontrola (NC) a každá ze 3 čídníkových kontrol (RC) musí být zahrnuty v každém ze 3 paralelních analýz [G(+), G(-), F] pro každý cyklus testu. NC a RC musí být umístěny do definovaných pozic, jak je popsáno v části Příprava PCR reakce.

Doporučuje se provádět cyklus vlastního pozitivního materiálu jako pozitivní kontrolu celého pracovního postupu (jak je uvedeno v části o nedodávaných materiálech). SIS stanovuje výsledek IC, NC a RC. Jestliže kontroly nespĺňují definované specifikace, všechny výsledky vzorků jsou označeny příznakem do příslušného políčka SPECIMEN. Ve výtisku cyklu zkontrolujte pole SPECIMEN, zda obsahuje příznaky a poznámky, abyste se ujistili, že výsledky jsou platné.

Negativní kontrola (NC)

V každém testu platného cyklu musí být NC negativní a interní kontrola musí být pozitivní. Pokud NC nevyhovuje těmto kritériím, všechny výsledky testů vzorku v daném testu budou označeny příznakem. Výsledky v takovém testu jsou neplatné a nesmí se vykázat. Výsledky jiných platných testů ve stejném platném cyklu jsou platné a mohou se vykázat. Nicméně je nutné opakovat celý cyklus, protože pokud se bude opakovat jen jeden nebo dva testy ze tří, software LightCycler® nebude správně fungovat.

Čídníkové kontroly (RC)

V každém testu platného cyklu každá RC musí být pozitivní na cíle ampliconů dané RC. Pokud RC nevyhovuje těmto kritériím, všechny výsledky testů vzorku v daném testu budou označeny příznakem. Výsledky v takovém testu jsou neplatné a nesmí se vykázat. Výsledky jiných platných testů ve stejném platném cyklu jsou platné a mohou se vykázat. Nicméně je nutné opakovat celý cyklus, protože pokud se bude opakovat jen jeden nebo dva testy ze tří, software LightCycler® nebude správně fungovat.

Pozitivní kontrola

Externí pozitivní kontrola musí být pozitivní. Nespĺňují-li vlastní pozitivní materiály nebo externí pozitivní kontroly toto kritérium, je celý cyklus neplatný a musí se opakovat. SIS nezobrazí žádný příznak.

Vnitřní kontrola (IC)

Vnitřní kontrola musí být detekována jako pozitivní u všech negativních vzorků a také u negativní kontroly. Pokud IC nevyhovuje tomuto kritériu, výsledek vzorku je neplatný a bude označen příznakem.

V případě neplatných kontrol opakujte celý proces (příprava vzorku a kontroly, amplifikace a detekce u všech 3 testů). Jsou-li kontroly trvale neplatné, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche pro technickou pomoc.

ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

Tabulka 5: Systémová hlášení zobrazovaná v částech určených pro příznaky na výtisku SIS

| Systémová hlášení (zobrazené v části indikátorů výtisku SIS) | Možná příčina | Nápravné opatření |
|--|--|--|
| User Developed or Modified Test Method | Cyklus je neplatný; možné příčiny jsou popsány v provozní příručce k zařízení LightCycler® 2.0. Přednastavení makra (např. základní úrovně, protokol cyklu, atd.) mohly být změněny. | Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte základní hodnoty dle tabulky 3. Uložte a znovu exportujte. |
| CCC File Name: Multiple CCC used! | Dva nebo více různých souborů kompenzace barvy jsou aktivních v jenom nebo více modulech analýzy. | Vyberte správnou kompenzaci barvy a proveďte výpočet znovu. |
| Color Compensation has expired on DD-Month-YY | Objekt barevné kompenzace je starší než šest měsíců. | Vytvořte a kvalifikujte nový objekt kompenzace barvy (CCO). |
| Invalid Macro | Bylo aplikováno nesprávné makro. | Proveďte kontrolu správného makra v softwaru LightCycler® nebo SeptiFast v2.0. |
| Invalid Baseline | Základní hodnoty byly nedopatřením změněny. | Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte základní hodnoty dle tabulky 3. Uložte a znovu exportujte. |
| Invalid Control Tube | Jedna nebo více kontrol byly nesprávně pojmenovány. | Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte zadání jména kontroly v editoru vzorku. Změňte přednastavená jména, uložte a znovu exportujte. |
| Missing Sample Tube | Jedna nebo více kapilár se vzorkem byly nesprávně pojmenovány nebo chybí. | Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte zadání jména vzorku v editoru vzorku. Změňte přednastavená jména, uložte a znovu exportujte. |
| Invalid LightCycler® SW Version | Byla aplikována nesprávná verze softwaru LightCycler® pro danou proceduru. | Otevřete software LightCycler® a proveďte kontrolu správného čísla verze. |
| No Manual T _M Calling | Nebylo provedeno žádné manuální vyvolání T _M (u žádného vzorku ani u žádného modulu analýzy). Makro bylo ukončeno bez analýzy. | Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a proveďte manuální vyvolání T _M . Uložte a znovu exportujte. |
| + additional run flags | Bylo detekováno více než 5 příznaků cyklu. | Pokuste se vyřešit specificky popsané příznaky, proveďte novou analýzu cyklu pomocí SIS. |
| Invalid CCC File Name | Dva nebo více různých souborů kompenzace barvy jsou aktivní v jenom nebo více modulech analýzy. | Vyberte správný soubor kompenzace barvy a proveďte výpočet znovu. |

Chybí-li jeden nebo více vzorků v SIS zprávě, zjistíte zda: 1) Některé ze tří testových kapilár se vzorkem jsou pojmenovány nesprávně, např. testové specifické předpony (G+, G-, F) byly omylem smazány nebo 2) jedna nebo více kapilár se vzorkem byly nesprávně pojmenovány nebo chybí. Pro opravu otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte zadání jména vzorku v editoru vzorku. Změňte přednastavená jména, uložte a znovu exportujte.

OMEZENÍ METODY

- Tento test je validován pouze pro používání s lidskou krví odebranou do K-EDTA jako antikoagulační. Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky nesprávné, falešně negativní nebo falešně pozitivní.
- K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
- Použití tohoto produktu by mělo být omezeno na personál speciálně vyškolený pro pracovní postup LightCycler® SeptiFast Test M^{TRAC}.
- Výkonnost testu LightCycler® SeptiFast M^{TRAC} je stanovena pro krev obsahující 1000 – 30 000 bílých krvinek/ μ l.
- Současná taxonomie mikroorganismů spoléhá hlavně na fenotypovou klasifikaci (biochemické a fyziologické vlastnosti) a nemusí být stejná jako genetický nálezn.
- I když jsou primery a sondy navrženy proti vysoce konzervovaným oblastem vnitřní přepsané oddělovací (ITS) oblasti, cílové specifická teplota tání (T_M) sond HybProbe může být ovlivněna náhodnou variabilitou sekvence nacházející se v mikrobiálních druzích.
- V některých případech, kdy bude ve vzorku více organismů ze SML, nebudou vyhodnoceny všechny druhy.

KLINICKÉ HODNOCENÍ

Výsledky klinických studií

Diagnostická senzitivita a specifita nebyly zhodnoceny, protože nebyly nalezeny vhodné hodnotící metody.

Celkem 358 vzorků od 177 pacientů se sepsí bylo analyzováno pomocí BC nebo PCR. Vzorky s druhy, které nejsou součástí SML, byly vyřazeny.

Tabulka 6: Počet druhů nalezených v EDTA krevním vzorku během klinické studie

| | Pouze BC | Pouze PCR | Obě metody |
|---------------------------------------|-----------|------------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 17 | 7 |
| CoNS | 14 | --- | 4 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | --- | 1 | --- |
| <i>Streptococcus spp.</i> | --- | 3 | 1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | --- | 11 | 2 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 23 | 4 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 | --- | 1 |
| <i>Enterobacter aerogenes/cloacae</i> | --- | 8 | --- |
| <i>Escherichia coli</i> | --- | 8 | 6 |
| <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i> | --- | 15 | 3 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | --- | --- | --- |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | --- | 8 | --- |
| <i>Serratia marcescens</i> | --- | --- | --- |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | --- | 2 | --- |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | --- | --- | --- |
| <i>Candida albicans</i> | --- | 8 | 6 |
| <i>Candida glabrata</i> | --- | --- | 1 |
| <i>Candida krusei</i> | --- | --- | --- |
| <i>Candida parapsilosis</i> | --- | --- | --- |
| <i>Candida tropicalis</i> | --- | --- | --- |
| Všechny mikroorganismy | 17 | 104 | 35 |

HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

Interferující látky

Následující látky neinterferují s detekcí bakteriální a houbové DNA pomocí tohoto testu.

Tabulka 7: Interferující látky

| č. | Obchodní název | Účinná látka | Výrobce | 1 x C _{max} | 3 x C _{max} | jednotky |
|----|----------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------|
| 1 | Piperacilin® | Piperacilin | Hexal | 4,0 | 12,0 | mg/ml |
| 2 | Fortum® | Ceftazidim | GlaxoSmithKline | 0,50 | 1,5 | mg/ml |
| 3 | Zienam® | Imipenem/Cilastatin | MSD Sharp & Dohme | 0,27 | 0,67 | mg/ml |
| 4 | Tazobac® | Piperacilin/Tazobactam | Wyeth Pharma | 0,75 | 2,3 | mg/ml |
| 5 | Ciprobay® | Ciprofloxacín | Bayer | 33,3 | 100,0 | µg/ml |
| 6 | Vancomycin® | Vancomycin | Lilly | 83,0 | 250,0 | µg/ml |
| 7 | Refobacin® | Gentamicin | Merck | 80,0 | 240,0 | µg/ml |
| 8 | Zyvoxid® | Linezolid | Pfizer | 0,10 | 0,30 | mg/ml |
| 9 | Sobelin® | Clindamycin | Pfizer | 0,30 | 0,90 | mg/ml |
| 10 | InfectoClont® | Metronidazol | Infectopharm | 83,3 | 250,0 | µg/ml |
| 11 | Diflucan® | Fluconazole | Pfizer | 0,13 | 0,39 | mg/ml |
| 12 | Candidas® | Caspofungin | MSD Sharp & Dohme | 8,3 | 25,0 | µg/ml |
| 13 | Amphotericin B® | Amphotericin B | Bristol-Myers Squibb | 20,0 | 60,0 | µg/ml |
| 14 | Novalgín® | Metamizol | Aventis Pharma | 0,83 | 2,5 | mg/ml |
| 15 | Dexahexal® | Dexamethason | Hexal | 1,3 | 4,0 | µg/ml |
| 16 | ARA-cell® | Cytarabin | cellpharm | 63,3 | 190,0 | µg/ml |
| 17 | Arterenol® | Norepinephrin (Noradrenalin) | Aventis Pharma | 4,8 | 14,4 | µg/ml |
| 18 | Aquo-Trinitrosan® | Glycerolnitrát | Merck | 1,3 | 4,0 | µg/ml |
| 19 | Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® | Heparin | ratiopharm | 0,83 | 2,5 | I.U./ml |

Analytická senzitivita

Analytická senzitivita testu LightCycler® SeptiFast M^{EMCC} byla zkoumána pomocí analýzy poměrného výskytu u každého analytu v sérii ředění 100, 30 a 3 CFU/ml v EDTA krvi od zdravých dárců (viz tabulka 8). Minimální senzitivita 30 CFU/ml byla získána pro všechny druhy mimo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus mitis* (100 CFU/ml).

Tabulka 8: Druhy testované analýzou poměrného výskytu

| Cíl | Počet pozitivních/počet testovaných | | | Cíl | Počet pozitivních/počet testovaných | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|---|-------------------------------------|-------|-------|
| | Koncentrace [CFU/ml] | | | | Koncentrace [CFU/ml] | | |
| | 100 | 30 | 3 | | 100 | 30 | 3 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 8/8 | 12/12 | 11/20 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 8/8 | 12/12 | 17/20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 8/8 | 12/12 | 20/20 | <i>Proteus mirabilis</i> | 8/8 | 12/12 | 16/20 |
| <i>Candida albicans</i> | 8/8 | 12/12 | 12/20 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 8/8 | 12/12 | 5/20 |
| <i>Candida glabrata</i> | 8/8 | 12/12 | 10/20 | <i>Serratia marcescens</i> | 8/8 | 12/12 | 19/20 |
| <i>Candida krusei</i> | 8/8 | 12/12 | 8/20 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 8/8 | 12/12 | 8/20 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 8/8 | 12/12 | 7/20 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ¹ | 8/8 | 1/12 | 0/20 |
| <i>Candida tropicalis</i> | 8/8 | 12/12 | 9/20 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> ¹ | 8/8 | 0/12 | 0/20 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 8/8 | 12/12 | 16/20 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 8/8 | 12/12 | 18/20 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 8/8 | 12/12 | 12/20 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 8/8 | 7/12 | 1/20 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 8/8 | 12/12 | 15/20 | <i>Streptococcus agalactiae</i> ² | 8/8 | 7/12 | 0/20 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 8/8 | 12/12 | 17/20 | <i>Streptococcus pyogenes</i> ² | 8/8 | 9/12 | 4/20 |
| <i>Escherichia coli</i> | 8/8 | 12/12 | 20/20 | <i>Streptococcus mitis</i> ² | 8/8 | 9/12 | 0/20 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 8/8 | 12/12 | 14/20 | | | | |

¹ Druhy reprezentující skupinu CoNS z SML v tabulce 1.

² Druhy reprezentující skupinu *Streptococcus spp.* z SML v tabulce 1.

Analytická specificita

Inkluzivita

K průkazu uniformity a homogenity cílové ITS oblasti byly shromážděny klinické izoláty pocházející z několika geografických regionů Evropy (jižní, střední, severní), Japonska a USA. Celkem 1709 izolátů bylo charakterizováno mikrobiologickými metodami a testováno pomocí LightCycler[®] SeptiFast Test M^{®/a} [viz tabulka 1 hlavní seznam SeptiFast Test Master List (SML)]. Soubor z USA a Japonska neobsahuje *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei* a *Staphylococcus haemolyticus*. Ve skupinách *Streptococcus spp.* a koaguláza negativní stafylokoky (CoNS), druhy s pozitivním výsledkem LightCycler[®] SeptiFast Test M^{®/a} jsou zobrazeny v tabulce 9. Soubor z Japonska nezahrnuje *Aspergillus fumigatus* a *Candida krusei*.

Tabulka 9: Druhy reprezentující skupiny *Streptococcus spp.* a koaguláza negativní stafylokoky (CoNS), byly pozitivně testovány pomocí testu LightCycler[®] SeptiFast M^{®/a}.

| <i>Streptococcus spp.</i> | Koaguláza negativní stafylokoky (CoNS) |
|----------------------------------|---|
| <i>S. agalactiae</i> | <i>S. hominis subsp. novobiosepticus</i> |
| <i>S. anginosus</i> | <i>S. pasteurii</i> |
| <i>S. bovis</i> | <i>S. warneri</i> |
| <i>S. constellatus</i> | <i>S. cohnii subsp. urealyticum</i> |
| <i>S. cristatus</i> | <i>S. hominis subsp. hominis</i> |
| <i>S. gordonii</i> | <i>S. lugdunensis</i> |
| <i>S. intermedius</i> | <i>S. cohnii subsp. cohnii</i> |
| <i>S. milleri</i> | <i>S. capitis subsp. urealyticus</i> |
| <i>S. mitis</i> | <i>S. capitis subsp. capitis</i> |
| <i>S. mutans</i> | <i>S. caprae</i> |
| <i>S. oralis</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
| <i>S. parasanguinis</i> | <i>S. saprophyticus subsp. saprophyticus</i> |
| <i>S. pneumoniae</i> | <i>S. xylosum</i> |
| <i>S. pyogenes</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| <i>S. salivarius</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| <i>S. sanguinis</i> | |
| <i>S. thermophilus</i> | |
| <i>S. vestibularis</i> | |
| <i>S. viridans</i> | |

Rozdílné výsledky byly nalezeny u méně než 1,2% všech výsledků.

- 6 z 143 druhů *Enterobacter* (aerogenes/cloacae) byly identické s *Klebsiella* (pneumoniae/oxytoca) v jejich ITS oblastech a byly označeny jako *Klebsiella* (pneumoniae/oxytoca).
- *Citrobacter freundii* a *Salmonella enterica* mohou být identické s *Klebsiella* (pneumoniae/oxytoca) a *E. coli* v jejich ITS oblastech a budou označeny jako *Klebsiella* (pneumoniae/oxytoca) a *E. coli*.
- 14 ze 160 druhů *Streptococcus viridans* byly označeny jako identické s *Streptococcus pneumoniae* v jejich ITS oblastech a byly označeny jako *S. pneumoniae*.
- Ve vzácných případech nemusela být *Klebsiella* (pneumoniae/oxytoca) označena, jestliže mutace její cílové sekvence způsobila posun bodu tání.

Tabulka 10: Všechny druhy byly negativní v každém testu

| | | |
|---|--|----------------------------------|
| <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> | <i>Corynebacterium jeikeium</i> | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Cryptococcus neoformans</i> | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>Gemella haemolysans</i> | <i>Pantoea agglomerans</i> |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>Peptostreptococcus magnus</i> |
| <i>Bartonella henselae</i> | <i>Histoplasma capsulatum</i> | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| <i>Bordetella pertussis</i> | <i>Legionella pneumophila</i> | <i>Prevotella denticola</i> |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | <i>Morganella morganii</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| <i>Cardiobacterium hominis</i> | <i>Mycobacterium fortuitum</i> | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | |

POZNÁMKA PRO KUPUJÍCÍHO

Koupí tohoto produktu získává kupující právo produkt používat k amplifikaci a detekci sekvencí nukleové kyseliny za účelem diagnostiky *in vitro* u člověka. Žádný obecný patent ani jiná licence jakéhokoliv typu mimo toto konkrétní právo použití se tímto neudílí.

LITERATURA

1. Kollef M., et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections, Chest 1999, 115: 462-474.
2. Garnacho-Montero J, et al. Impact of inadequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the ICU with Sepsis, Crit Care Med. 2003, 31(12): 2742-51.
3. Byl B, et al. Impact of Infectious Disease Specialists and Microbiological Data on the Appropriateness of Antimicrobial Therapy for Bacteremia, Clin Infect Dis 1999; 29: 60-66.
4. Suttrop N. "Changing populations and future trends in the management of serious infections" from: AIM website (www.infectionacademy.org).
5. Peterson LR, et al. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing?, J Antimicrob Chemother 2004, 53: 902-5.
6. Harbarth, S., et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis, Am J Med. 2003, 115: 529-535.
7. Houang, E.T.S., et al. Significance of Genomic DNA Group Delineation in Comparative Studies of Antimicrobial Susceptibility of Acinetobacter spp. Antimicrob Agents Chemother, Apr. 2003, p. 1472-1475.
8. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
9. Clinical Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. CLSI Document M29-A Villanova, PA:CLSI, 1997.
10. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.

| Informace o revizi dokumentu | |
|------------------------------|---|
| Doc Rev. 6.0 04/2011 | <p>Pokyny pro interpretaci výsledků CoNS a organizmů <i>Streptococci spp.</i> byly přidány do části VÝSLEDKY a její obsah byl přeorganizován.</p> <p>V části KONTROLA KVALITY bylo vyjasněno vykazování výsledků platných testů spolu s neplatnými testy ve stejném cyklu.</p> <p>Byla vyjasněna část PRINCIPY POSTUPU.</p> <p>Byla vyjasněna část DETEKCE VRCHOLU A AUTOMATICKÁ IDENTIFIKACE DRUHŮ.</p> <p>Máte-li jakékoli otázky, kontaktujte svého místního zástupce společnosti Roche.</p> |



Vyrobeno v Německu pro:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA



Distributed by

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 (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

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



Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo, +49 621 7590

ROCHE, LIGHTCYCLER, MGRADE, MAGNALYSER, FASTSTART, HYBPROBE, SEPTIFAST a AMPERASE jsou obchodní známky společnosti Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER je servisní známka společnosti Roche.

Amphotericin B[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Bristol-Myers Squibb.
Aquo-Trinitrosan[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Merck & Co., Inc.
ARA-cel[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Cell pharma GmbH.
Artereno[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Aventis Pharma Ltd.
Candidas[®] je registrovaná obchodní známka společnosti MSD Sharp & Dohme GmbH.
Ciprobay[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Bayer AG.
Dexahexal[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Hexal AG.
Diflucan[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Pfizer Inc.
Fortum[®] je registrovaná obchodní známka společnosti GlaxoSmithKline.
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm[®] je registrovaná obchodní známka společnosti ratiopharm International.
InfectoClont[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Infectopharm GmbH.
LTK-008[™] je registrovaná obchodní známka společnosti biodelta, ZTB GmbH.
MiniSpin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Eppendorf.
Novalgin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Aventis Pharma Ltd.
Piperacillin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Hexal AG.
Refobacin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Merck & Co., Inc.
Sobelin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Pfizer Inc.
Tazobac[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Wyeth Pharmaceuticals AG.
Vancomycin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Lilly Pharma Holding GmbH.
Zienam[®] je registrovaná obchodní známka společnosti MSD Sharp & Dohme GmbH.
Zyvoxid[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Pfizer Inc.

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

© 2011, Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.
4/2011
Doc Rev. 6.0

(04623886001-06ENGL)
04822609001-06