

# LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast *mecA* Test M<sup>GRADE</sup>

## Pro použití se zařízením LightCycler<sup>®</sup> 2.0

(sériové číslo 1415001 a vyšší)

Pro diagnostické použití *in vitro*.

### PRO POUŽITÍ S:

LightCycler <sup>®</sup> SeptiFast <i>mecA</i> Kit M <sup>GRADE</sup>	2 x 15 Tests	<b>REF</b> : 04 488 814 001
LightCycler <sup>®</sup> SeptiFast Kit M <sup>GRADE</sup>	54 Tests	<b>REF</b> : 04 469 046 001
SeptiFast Lys Kit M <sup>GRADE</sup>	100 Tests	<b>REF</b> : 04 404 432 001
SeptiFast Prep Kit M <sup>GRADE</sup>	10 Tests	<b>REF</b> : 04 404 459 001
SeptiFast Software Set v2.0		<b>REF</b> : 05 164 443 001

### ÚČEL POUŽITÍ

LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast *mecA* Test M<sup>GRADE</sup> je *in vitro* test pro amplifikaci nukleové kyseliny určený pro detekci a identifikaci *mecA* DNA v lidské K-EDTA-krevi použitím zařízení LightCycler<sup>®</sup> 2.0. Používá se jako pomůcka pro detekci meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*. Test je používán spolu s klinickým obrazem, mikrobiologickými testy anebo dalšími laboratorními ukazateli jako pomůcka při léčbě pacientů s podezřením na systémovou krevní infekci způsobenou MRSA.

Test je používán u pacientů, u nichž byl výsledek testu LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> pozitivní na *Staphylococcus aureus*.

### SOUHRN A VÝKLAD TESTU

*Staphylococcus aureus* je jedním z nejčastěji izolovaných patogenů při systémové krevní infekci (1). Incidence meticilin rezistentních nozokomiálních kmenů se trvale zvyšuje v mnoha regionech (2) a nové komunitní kmeny (3) jsou vznikajícím nebezpečím. Meticilinová rezistence je spojena s významně vyšší mortalitou ve srovnání s bakteriemi způsobenou kmeny citlivými na meticilin *Staphylococcus aureus* (4,5) (MSSA). Bylo zjištěno, že meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) neúměrně přispívá neadekvátní empirické léčbě, například na jednotkách intenzivní péče (6,7) a způsobuje další významné zvýšení nákladů (8).

Lepší rozhodování ohledně časné volby antibiotik je rozhodující (9). LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast *mecA* Test M<sup>GRADE</sup> poskytuje další nástroj na pomoc při rozhodování o volbě antibiotika. LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast *mecA* Test M<sup>GRADE</sup> může usnadnit časnou diagnózu a výběr vhodné antibiotické terapie.

Metoda založená na nukleové kyselině detekuje *mecA* gen, který zprostředkovává vysoký stupeň rezistence na meticilin.

### PRINCIPY POSTUPU

Test je používán pro detekci *mecA* DNA u pacientů, kteří byli pozitivní v testu LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> na přítomnost *Staphylococcus aureus*. Příprava vzorku je popsána v příbalovém letáku k LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup>. Pro test LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast *mecA* Test M<sup>GRADE</sup> se používá alikvotní množství eluátu z LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup>.

Pracovní postup testu LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> se skládá z přípravy vzorku mechanickou lýzou a purifikací DNA. Následně je cílová DNA amplifikována pomocí PCR v reálném čase ve 3 paralelních reakcích (grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie a huby) a následně detekována specifickými HybPr<sup>®</sup> sondami. Identifikace vzorků a kontrol je prováděna automaticky pomocí softwaru.

Pro detailní informace se prosím podívejte do příbalového letáku k LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> (P/N: 04 469 046 001).

### Volba cílové sekvence

Sekvence 314 bp v genu *mecA* (10) byla vybrána jako cílová oblast pro amplifikaci, detekci a identifikaci. Genový produkt genu *mecA* je protein PBP2a (nebo PBP2'), který je dalším vazebným proteinem pro penicilin nalezený u člověka a nehumánních meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus* tzn. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. cohni* nebo *S. sciuri*. Gen *mecA* zprostředkovává vysoký stupeň rezistence u kmenů exprimujících *mecA*.

Geny *mecA* z různých druhů *Staphylococcus* jsou velmi dobře konzervovány. Proto není možné geny *mecA* z různých druhů odlišit pomocí sekvence.

### Amplifikace a detekce pomocí PCR v reálném čase

#### Amplifikace

Před amplifikací pomocí PCR je riziko kontaminace ampikonu sníženo použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosyláza). Tento enzym rozpozná a katalyzuje rozklad fetěžců DNA obsahujících deoxyuridin, nikoli však DNA obsahující deoxythymidin. Zpracované vzorky jsou přidány do amplifikační směsi obsahující Taq polymerázu „s horkým startem“ v kapilárách LightCycler<sup>®</sup> (100 µl) M<sup>GRADE</sup>, v nichž probíhá PCR amplifikace. Cíl a reagenční kontrola (RC) jsou amplifikovány pomocí specifických primerů.

#### Detekce produktů PCR v reálném čase pomocí sond HybPr<sup>®</sup>

Ampikon je detekován fluorescenčně pomocí specifického páru sond HybPr<sup>®</sup>. Fluorescenčně značené sondy HybPr<sup>®</sup> hybridizují s vnitřní sekvencí amplifikovaného fragmentu během hybridizační fáze amplifikačního cyklu. Emitovaná fluorescence je měřena pomocí zařízení LightCycler<sup>®</sup> 2.0 v jednom ze čtyř 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.

Roche

## Automatická identifikace mecA a kontrol

Teploty tání ( $T_M$ ) vzorků a kontrol jsou analyzovány určeným identifikačním softwarem (SeptiFast Identification Software v2.0) a je vytvářena zpráva.

## REAGENCIE

LightCycler® SeptiFast mecA Kit M <sup>BRACO</sup>	P/N: 04 488 814 001	2 x 15 testů
<b>[1a] RM 1a</b> (reakční směs 1a) 5,5 U/μl FastStart Taq polymeráza		2 x 58 μl
<b>[1b] RM 1b</b> (reakční směs 1b) Pufr Tris-HCl < 1% Brij < 0,1% roztok hořčiku < 0,001% dNTP		2 x 164 μl
<b>[2] DM</b> (detekční směs) < 0,001% primer, sondy Pufr Tris-HCl < 1% Brij		2 x 193 μl
<b>[3] RC</b> (Reagenční kontrola) < 0,001% templát kontrolní DNA Pufr Tris-HCl < 0,001% RNA nosiče		2 x 275 μl
<b>[4] IC</b> (vnitřní kontrola) < 0,001% DNA v kontrole procesu < 0,001% RNA nosiče Pufr Tris-HCl		2 x 39 μl
<b>[5] DE</b> (dekontaminační enzym) < 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) Pufr Tris-HCl		2 x 20 μl
<b>[6] BU</b> (pufr) < 0,5% roztok hořčiku		2 x 1000 μl
<b>[7] DI</b> (ředidlo) Voda čistoty pro PCR		2 x 1000 μl

## 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 nejist, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a reagenциemi ze soupravy noste ochranné rukavice bez prášku na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek pro ochranu očí. Po práci se vzorky a zkušebními reagenциemi si důkladně umyjte ruce.
- Nesměšujte dohromady reagenциe z různých šarží.
- Nesměšujte dohromady reagenциe z různých souprav.
- Nespotřebované reagenциe, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- Po vypršení data expirace již soupravu nepoužívejte.
- Pravidla bezpečnosti při práci (MSDS) zašle na vyžádání 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* (11) a dokumentu CLSI M29-A (12). Důkladně vyčistěte a dezinfikujte všechny pracovní povrchy a rukavice pomocí DNA dekontaminačního činidla (např. LTK-008™). Ujistěte se, že jsou rukavice rezistentní vůči DNA dekontaminačnímu činidlu.
- Při práci s jakýmkoli reagenциemi používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto reagenциe nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Jinak může dojít k vytvoření popálenin. Jestliže se některá reagenциe rozlije nebo rozspíše, rozřeďte ji vodou a dosucha vytřete.
- Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Preamplifikační aktivity zahrnují přípravu reagenциí 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 třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu reagenциe 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.
- Díky přítomnosti enzymu AmpErase v Master Mix se 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 LightCycler® SeptiFast mecA Test M<sup>BRAC</sup>

Bakteriální DNA je přítomna 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. Zejména obsluha může být zdrojem DNA kontaminace, protože lidská kůže a horní cesty dýchací obsahují mikroorganismy, které mohou obsahovat cílový gen testu LightCycler® SeptiFast mecA Test M<sup>BRAC</sup> [e.g., metililin rezistentní *Staphylococcus aureus* nebo metililin rezistentní koagulaza negativní kmeny *Staphylococcus*]. Aby se předešlo DNA kontaminaci, jsou doporučeny následující principy.

#### *Reagencie a spotřební materiál pro LightCycler® SeptiFast mecA Kit M<sup>BRAC</sup>*

- Činidla a spotřební materiál pro LightCycler® SeptiFast mecA Kit M<sup>BRAC</sup> jsou vyvinuty tak, aby minimalizovaly kontaminaci DNA.
- M<sup>BRAC</sup> 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 lahviček s reagenty.

#### *Oděv a rukavice*

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

#### *Péče o PCR pracovní stanici*

- Očistěte povrchy pracovního prostoru PCR pracovní stanice pomocí DNA dekontaminačního činidla po každém nastavení PCR.
- **POZN.: Ujistěte se, že vybavení je odolné vůči DNA dekontaminačnímu činidlu.**
- Čistěte všechny povrchy uvnitř PCR pracovní stanice v pravidelných časových intervalech (stěny, prostory pod spodní deskou, podlahovou desku).
- Ujistěte se, že je PCR pracovní stanice bez DNA v případě, že je využívána více uživateli.
- Zapněte UV světlo na minimálně 30 minut před začátkem práce.
- Během práce UV světlo vypněte.
- **POZN.: Vyměňte UV lampu pracovní stanice PCR v souladu s pokyny výrobce.**

#### *Ošetření zařízení a spotřebního zboží.*

- Ponechteje specifické spotřební zboží a zařízení používané pro LightCycler® SeptiFast mecA Test M<sup>BRAC</sup> v pracovní stanici PCR, je-li to možné.
- Před začátkem práce proveďte minimálně 30 minutové ozáření všech předmětů pomocí UV záření.
- Používejte pouze jednorázový materiál bez DNA (nahlédněte prosím do příbalového letáku k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>). 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 "Údržba").

#### *Bezpečnostní opatření během pipetování*

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

#### **POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI**

- Skladujte při teplotě -15 až -25°C.
- Uchovávejte v temnu.
- Master Mix (pro přípravu Master Mix, viz část Příprava reagentů) uchovávejte při teplotě 2 až 8°C po dobu maximálně 72 hodin.
- Uchovávejte otevřené lahvičky po dobu maximálně 6 měsíců po prvním otevření. Nepoužívejte po uplynutí data expirace.
- Zmrázujte a rozmrazujte otevřené lahvičky maximálně 4-krát po prvním otevření.
- Nepoužívejte po uplynutí data expirace.

#### **DODÁVANÉ MATERIÁLY**

SeptiFast Lys Kit M <sup>BRAC</sup>	P/N: 04 404 432 001	100 testů
SeptiFast Prep Kit M <sup>BRAC</sup>	P/N: 04 404 459 001	10 testů
LightCycler® SeptiFast Kit M <sup>BRAC</sup>	P/N: 04 469 046 001	54 testů
SeptiFast Software Set v2.0 nebo vyšší (dodáno jedenkrát)	P/N: 05 164 443 001	
LightCycler® SeptiFast mecA Kit M <sup>BRAC</sup>	P/N: 04 488 814 001	2 x 15 testů

## POTŘEBNÉ MATERIÁLY, JEŽ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Viz příbalový leták k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>.

## ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

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

### Odběr vzorků

Odběr vzorku je popsán v příbalovém letáku k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>.

### Přeprava a uchování vzorků

Přeprava a uchování vzorku je popsána v příbalovém letáku k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>.

### Uchování eluátu

Eluát je možné uchovávat maximálně 4 hodiny při teplotě 15 až 25°C, 8 dnů při teplotě 2 až 8°C nebo při teplotě -15 až -25°C po dobu maximálně 30 dnů.

## NÁVOD K POUŽITÍ

### Před začátkem přípravy reagence

#### *Kompensace barvy*

Použití soupravy LightCycler® Multicolor Compensation Set (P/N: 04 484 355 001) je podmínkou. Podrobnosti najdete v příbalovém letáku k LightCycler® SeptiFast Kit (P/N: 04 469 046 001).

#### *Instalace SeptiFast Identification Software (SIS) a makra SeptiFast mecA*

SeptiFast Identification Software (SIS) a makro SeptiFast mecA (jméno souboru: SeptiFast mecA\_1.0\_04488814001 nebo vyšší verze) musí být nainstalován před začátkem testu. Pro detaily prosím nahleďte do příbalového letáku k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>.

#### *Příprava kontroly*

- Materiál pozitivní kontroly je možné zakoupit u jiných společností.
- Pro LightCycler® SeptiFast mecA Test M<sup>BRAC</sup> a LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup> je možné použít jako materiál pozitivní kontroly materiál ATCC 33592, metiloin zrcovětelný *S. aureus*. Příprava je popsána v příbalovém letáku k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>.
- Pozitivní kontrola by měla být zpracována v celém pracovním postupu jako každý jiný vzorek.

### Příprava reagence pomocí LightCycler® SeptiFast mecA Kit M<sup>BRAC</sup>

1. Důkladně vyčistěte a dekontaminujte box s laminárním prouděním a PCR pracovní stanici (např. pomocí LTK-008™).
2. Zapněte UV záření a proud vzduchu v boxu s laminárním prouděním a UV zářič pracovní stanice PCR na dobu minimálně 30 minut.
3. Během práce UV světlo vypněte.
4. Rozmrazujte komponenty LightCycler® SeptiFast mecA Kit M<sup>BRAC</sup> při pokojové teplotě po dobu přibližně 20 minut a chraňte je před světlem. Krátce promíchejte a podrobte rychlé pulzní rotaci.
5. V závislosti na celkovém počtu vzorků k analýze a dvou dalších reakcí pro negativní kontrolu a reagenční kontrolu umístěte kapiláry LightCycler® do předem vychlazených adaptérů centrifugy.
6. Připravte Master Mix vynáobením množství ve sloupci "Volume" počtem reakcí, které se mají provést (eluáty vzorků, eluát negativní kontroly a eluát reagenční kontroly) plus jedna další reakce, aby byl dostatečný objem pro pipetování. Postupujte jak je dále uvedeno pro standardní reakci s objemem 100 µl.

Krok	Akce																		
1	<p>Příprava Master Mix: Do reakční zkumavky o objemu 1,5 ml o teplotě 2 až 8°C přidejte následující složky v pořadí uvedeném níže:</p> <table border="1"><thead><tr><th>Složka</th><th>Objem (µl)</th></tr></thead><tbody><tr><td>DI</td><td>13,5</td></tr><tr><td>BU</td><td>12</td></tr><tr><td>DM</td><td>10</td></tr><tr><td>IC</td><td>2</td></tr><tr><td>RM 1b</td><td>8,5</td></tr><tr><td>DE</td><td>1</td></tr><tr><td>RM 1a</td><td>3</td></tr><tr><td><b>Celkový objem</b></td><td><b>50</b></td></tr></tbody></table>	Složka	Objem (µl)	DI	13,5	BU	12	DM	10	IC	2	RM 1b	8,5	DE	1	RM 1a	3	<b>Celkový objem</b>	<b>50</b>
Složka	Objem (µl)																		
DI	13,5																		
BU	12																		
DM	10																		
IC	2																		
RM 1b	8,5																		
DE	1																		
RM 1a	3																		
<b>Celkový objem</b>	<b>50</b>																		
2	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Pipetováním</b> jemně promíchejte. Nemíchejte vířením!</li><li>• Odpipetujte 50 µl Master Mix do každé předchlazené kapiláry LightCycler®.</li></ul>																		
3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Přidejte 50 µl eluátu každého vzorku do zvláštní kapiláry a uzavřete ji pomocí uzavíracího nástroje.</li><li>• Přidejte 50 µl eluátu negativní kontroly (NC) do kapiláry. NC není součástí LightCycler® SeptiFast mecA Kit M<sup>BRAC</sup> a připravuje se zpracováním NC z LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup>. Vzorky z každé přípravy vzorků a série PCR musí být analyzovány spolu s NC připravené ve stejné sérii. Nekombinujte vzorky připravené v různých sériích v jednom cyklu. Uzavřete kapiláru pomocí uzavíracího nástroje.</li><li>• Do kapiláry přidejte 50 µl reagenční kontroly (RC). Uzavřete kapiláru pomocí uzavíracího nástroje.</li></ul>																		
4	Přemístěte všechny kapiláry dle seznamu umístění vzorků v makru SeptiFast mecA (RC, NC, vzorek 1, vzorek 2 ...) do karuselu na vzorky LightCycler®.																		
5	Centrifugujte karusel na vzorky LightCycler® pomocí LC karuselové centrifugy 2.0 (provedte kontrolu hladiny tekutiny v kapilárách).																		
6	Umístěte karusel na vzorky LightCycler® do zařízení LightCycler® 2.0.																		

## Plnění a provoz zařízení LightCycler® 2.0

**POZN.: Doporučuje se používat zařízení LightCycler® 2.0 v místnosti oddělené od oblasti čištění DNA a přípravy pracovních roztoků.**

1. Zapněte makro *SeptiFast mecA* (název souboru: *SeptiFast mecA\_1.0\_04488814001*). Podívejte se prosím do provozní příručky k zařízení LightCycler® 2.0, kapitola "Spouštění makra Roche".

**POZN.: Nepoužívejte pole <assay lot numbers>. Pokud chcete přidat číslo šarže testu k cyklu, vložte informaci do odpovídajícího pole v editoru vzorku.**

**POZN.: Je-li uživatel odhlášen, nepokračujte v cyklu. Nový cyklus začněte s novým jménem.**

2. Uložte cyklus s novým jménem, které umožňuje jednoznačnou identifikaci (např. jméno uživatele a datum).
3. Redukujte vzorky z nastaveného seznamu plnění, je-li potřeba méně než 5 vzorků. Je-li nedopatřením vymazáno příliš mnoho kapilár, nepřidávejte je, ale začněte postup od začátku.
4. Zadejte specifická data pacienta do <závorky> (např. *mecA <Jméno-01>*).
5. Po přidání všech informací specifických pro vzorek pokračujte v průvodci a spusťte cyklus zařízení LightCycler® 2.0.
6. Po dokončení cyklu zkontrolujte hladinu tekutiny v kapilárách (výsledky pro kapiláru jsou neplatné, pokud je objem v kapiláře variabilní).

**POZN.: Neměňte předpony názvů vzorku. Závorky nemažte. Každý vzorek musí obsahovat předponu specifickou pro test (mecA), aby byla umožněna identifikace SIS. Neměňte jméno reagenční kontroly a negativní kontroly.**

**POZN.: Některé zvláštní znaky jako ' < > ` ` ` a € mohou porušovat zásady zadávání jmen v poli jméno.**

### Detekce píky a automatická identifikace píky

#### Obecné vysvětlení modulů analýzy

- Manuální volání  $T_M$  vyžaduje manuální ovládání ve dvou automaticky aplikovaných volacích modulech  $T_M$ . Absolutní kvantifikační modul, který je také aplikován automaticky, nevyžaduje žádné manuální ovládání.
- Panel  $T_M$  každého režimu analýzy je předdefinován v makru *SeptiFast mecA*.
- V okně vrcholu tání jsou vyobrazeny všechny křivky vybraných grafů.
- Je možné označit výběr nebo zrušit výběr panelů  $T_M$ .
- Základní úroveň každého režimu analýzy je předdefinována v makru *SeptiFast mecA*.
- Neprovádějte změnu ani nerušte výběr základních úrovní. Pokud je nedopatřením provedena změna, запиšte správné hodnoty z tabulky 2. Základní hodnoty.
- Je-li aktivována více než jedna kapilára, objeví se nastavení první kapiláry v zaškrťovacím rámečku.
- Posun panelů ovlivní všechny aktivované kapiláry.

**POZN.: Nepravdějte změnu nastavení <Channel>, <Color Compensation>, <Program>, <Method>, <Show Shoulders>, <Peak Area> a <Peak Width>.**

- Píky jsou definovány jako maxima nad základní linií. Ramena nejsou píky.
- Posuvníky musí být zvoleny v rámci platného rozmezí  $T_M$  (viz tabulka 1).

Tabulka 1:  $T_M$  Rozmezí pro platné píky

	CH 640		CH 705	
	Nízká $T_M$ (°C)	Vysoká $T_M$ (°C)	Nízká $T_M$ (°C)	Vysoká $T_M$ (°C)
<i>mecA</i>	62,00	69,00	51,50	58,50

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

Tabulka 2: Základní hodnoty

	CH 640	CH 705
<i>mecA</i>	0,021	0,022

#### Úprava panelů $T_M$

1. Po dokončení cyklu zobrazí průvodce experimentem okno <Analyses have been created>.
2. Posuňte okno dolů (nestiskávejte <Finish>).
3. Ujistěte se, že jsou viditelné hodnoty  $T_M$  a výchozí úroveň.
4. Klikněte na modul analýzy (např.,  $T_M$  volání *mecA* 640).
5. Aktivujte všechny pozice testu, abyste získali přehled.
6. Klikněte pouze na pozici *mecA* #RC#.
7. Upravte panel  $T_M$  na maximum píky nad základní linií, zaměřte se pouze na platné rozmezí  $T_M$ .  
Není-li nad základní linií žádný pik, panel  $T_M$  musí být smazán (deaktivujte zaškrtnutí v odpovídajícím rámečku). Na konci volání  $T_M$  pro specifickou kapiláru musí být pouze vrcholy píků s panely  $T_M$ .
8. Aktivujte další pozici (např. *mecA* #NC#) spolu s *mecA* #RC# pro získání přehledu. (Automatické nastavení stupnice se upraví na nejvyšší pik).
9. Aktivujte pouze vybranou pozici (např. *mecA* #NC#). (Automatické nastavení stupnice se upraví na základní píky pro NC. Základní linie nemusí být nadále viditelná.)
10. Pokračujte s detekcí píků vzorků, jak je uvedeno v krocích 5-7.
11. Po dokončení analýzy prvního detekčního kanálu ( $T_M$  volání *mecA* 640), pokračujte s  $T_M$  volání *mecA* 705, jak je popsáno v krocích 4-10.

#### Dokončete $T_M$ volání

1. Přesuňte průvodce experimentem do středu monitoru a stiskněte <Finish>.
2. Automaticky je vytvořena zpráva LightCycler® a musí být vytisknuta.
3. Cyklus je automaticky uložen.
4. Exportujte soubor \*.ixi do <C:Export to SIS>.
5. Zkontrolujte zprávu o příznaku a zda je zobrazeno <run state: complete>.
6. Pokud se příznaky objeví nebo jsou zobrazeny jiné zprávy pro stav cyklu, cyklus je neplatný a všechny vzorky musí být testovány znovu.

## Automatická identifikace píků pomocí SeptiFast Identification Software v2.0 (SIS)

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

## VÝSLEDKY

### Interpretace výsledků

PŘÍZNAKY a KOMENTÁŘE mohou být generovány softwarem SeptiFast Identification Software 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 v rámečku SPECIMEN.

Obr. 1: Rámeček Specimen

Specimen	Assay	Data	Result	Flags	Comment
SeptiFast mecA sample 1	mecA	<CH ..., TM ..., PH ..., CP...>	<mecA>		
SeptiFast mecA sample 2	mecA		⊖		

Další informace je možné získat v polích COMMENT v RUN FLAGS a ASSAY FLAGS. Všechny příznaky jsou uvedeny v tabulce 3.

### Výsledky vzorku

Název <mecA> v políčku RESULT znamená, že byl vzorek pozitivní na mecA.

**Pozn.: Zkontrolujte prosím políčko komentáře testu LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRUC</sup> pokud se zobrazí příznak <for mecA resistance testing: Peak for CoNS from SML detected><sup>1</sup>. Pro další informace se prosím podívejte do části Omezení metody.**

Nezpracovaná data relevantních píků jsou zobrazena v políčku DATA včetně kanálu (CH), bodu tání (T<sub>m</sub>), výšky píku (PH) a bodu křížení (CP<sup>2</sup>). Symbol ⊖ v políčku RESULT znamená, že nebyl detekován žádný analyt v rámci definovaných kritérií pro mecA.

<sup>1</sup> SML v hlavní seznam SeptiFast Test Master List. Pro detaily prosím nahlédněte do příbalového letáku k LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRUC</sup>

<sup>2</sup> CP je uvedeno pro kanál 640

### Validace cyklu

Validace cyklu je provedena pomocí SeptiFast Identification Software v2.0. Neplatné výsledky jsou automaticky zobrazeny a jsou označeny ✗. Komentáře k příznakům a odpovídající interpretace jsou uvedeny níže.

Tabulka 3: Příznaky pro validaci cyklu

	Komentáře <sup>3</sup>	Interpretace
ASSAY FLAG	NC: IC not detected	V NC nebyly detekovány mecA ani IC.
ASSAY FLAG	NC: < CH ..., TM ..., PH ..., CP ...>, < mecA >	V NC byla detekována mecA.
ASSAY FLAG	RC: No amplicon: <mecA>	RC selhala.
SPECIMEN FLAG	IC not detected	Ve vzorku nebyla detekována mecA ani IC.

<sup>3</sup> Systémové chyby jsou uvedeny v části Řešení potíží

## KONTROLA KVALITY

Jeden replikát každé NC a RC musí být zahrnut ke každému cyklu testu. NC a RC musí být umístěny do definovaných pozic, jak je popsáno v části Příprava reagensí.

Doporučuje se provádět cyklus vlastního pozitivního materiálu jako pozitivní kontrolu přes celý pracovní postup, jak je uvedeno v části Příprava kontroly.

SIS stanovuje výsledek IC, NC a RC. Pokud kontroly nevyhovují definovaným specifikacím, všechny výsledky vzorku jsou označeny příznakem. Zkontrolujte rámeček SPECIMEN výtisku cyklu ohledně příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je cyklus platný.

### Negativní kontrola (NC)

NC musí být negativní a její vnitřní kontrola musí být pozitivní. Pokud NC nevyhovuje těmto kritériím, všechny výsledky vzorku budou označeny příznakem. Celý cyklus musí být zopakován.

### Reagenční kontrola (RC)

RC musí být pozitivní pro amplicon mecA. Pokud RC nevyhovuje tomuto kritérii, všechny výsledky vzorku budou označeny příznakem. Celý cyklus musí být zopakován.

### Pozitivní kontrola (PC)

Pozitivní kontrola musí být pozitivní. Pokud PC nevyhovuje tomuto kritérii, cyklus je neplatný. SIS nezobrazí žádný příznak. Celý cyklus musí být zopakován.

### Vnitřní kontrola (IC)

Vnitřní kontrola musí být detekována jako pozitivní v všech negativních vzorců a také u negativní kontroly. Pokud IC nevyhovuje tomuto kritérii, výsledek vzorku bude označen příznakem.

V případě neplatných kontrol zopakujte znovu celý proces (příprava vzorku a kontroly, amplifikace a detekce všech 3 testů pomocí LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRUC</sup> a následné testování rezistence pomocí LightCycler® SeptiFast mecA Test M<sup>BRUC</sup>). Jsou-li kontroly trvale neplatné, kontaktujte vaši místní kancelář společnosti Roche pro technickou pomoc.

## ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

**Tabulka 4: Systémové chyby uvedené v políčku KOMENTÁŘE (COMMENTS) pro RUN FLAGS a ve výstisku SIS**

Systémová zpráva (vyobrazená v části příznaků výstisku 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 úroveň, protokol cyklu, atd.) mohly být změněny.	Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte základní hodnoty dle tabulky 2. Uložte a znovu exportujte.
CCC File Name: Multiple CCC used!	Dva nebo více různých souborů kompenzace barvy jsou aktivní 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 nový objekt kompenzace barvy.
Invalid Macro	Bylo aplikováno nesprávné makro	Proveďte kontrolu správného makra v softwaru LightCycler® anebo SeptiFast Software Set v2.0.
Invalid Baseline	Základní hodnoty byly nedopatřením změněny	Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte základní hodnoty dle tabulky 2. 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 na vzorek 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 <sub>M</sub> Calling	Nebylo provedeno žádné manuální volání T <sub>M</sub> (u žádného vzorku ani u žádného modulu analýzy). Makro bylo ukončeno bez analýzy	Otevřete originální *.ixo soubor v softwaru LightCycler® a proveďte manuální volání T <sub>M</sub> . 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.

Pokud ve zprávě SIS chybí jeden nebo více vzorků, proveďte kontrolu zda jedna nebo více kapilár na vzorky nejsou nesprávně pojmenovány nebo zda nějaká kapilára nechybí. Pro nápravu otevřete originální \*.ixo soubor v softwaru LightCycler® a zkontrolujte zadání jména vzorku v editoru vzorku. Změňte přednastavená jména, uložte a znovu exportujte.

### OMEZENÍ METODY

- Je-li *S. aureus* detekován v testu LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAD</sup> a políčko komentář v rámečku vzorku je <for mecA resistance testing: Peak for CoNS from SML detected>, byla detekována směs *S. aureus* a CoNS. Detekce *mecA* může být způsobena *mecA* obsahující kmen CoNS a nikoliv MRSA.
- I když *mecA* obsahující CoNS nejsou detekovány testem LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAD</sup>, detekce *mecA* může být způsobena přítomností CoNS pod detekční hranicí a nikoliv MRSA.
- Pod specifickou hranicí detekce (viz část Analytická citlivost) se mohou vyskytnout falešně negativní výsledky, protože detekce DNA *S. aureus* pomocí testu LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAD</sup> může mít větší citlivost, než detekce *mecA* DNA pomocí LightCycler® SeptiFast *mecA* Kit M<sup>BRAD</sup>.
- LightCycler® SeptiFast *mecA* Kit M<sup>BRAD</sup> detekuje gen *mecA* a neumožňuje průkaznou fenotypickou identifikaci.
- Tento test je validován pouze pro používání s lidskou krví odebranou do K-EDTA jako antikoagulantu. Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky nesprávné, falešně negativní nebo falešně pozitivní.
- Použití tohoto produktu by mělo být omezeno na personál speciálně vyškolený pro pracovní postup LightCycler® SeptiFast *mecA* Kit M<sup>BRAD</sup>.
- Výkonnost LightCycler® SeptiFast *mecA* Kit M<sup>BRAD</sup> je stanovena pro krev obsahující 1 000 až 30 000 bílých krvinek/μl.

## HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

### Analytická senzitivita

Minimální senzitivita je 30 CFU/ml K-EDTA krve. Studie popsaná níže ukazuje, že detekční mez pro MRSA byla stanovena pro *S. aureus* pomocí LightCycler® SeptiFast Test M<sup>BRAC</sup> a pro *mecA* pomocí LightCycler® SeptiFast *mecA* Kit M<sup>BRAC</sup>. Sériová ředění známé koncentrace MRSA (ATCC 33592) byly nastříknuty do plné krve od zdravých dárců a byly zpracovány způsobem popsaným v příbalových letáčích odpovídajících testů. Každá hladina byla analyzována v osmi replikátech za použití dvou sarží. Tabulka 5 ukazuje kombinovaná data pro obě sarže. Detekční mez pro *S. aureus* je 7,7 CFU/ml (95%) CI=[4,9-19,0] a pro *mecA* 24,2 CFU/ml (95%) CI=[15,9-48,9].

Tabulka 5: Mez detekce

Koncentrace MRSA [CFU/ml]	Počet <i>mecA</i> pozitivních	Počet <i>S. aureus</i> pozitivních
100	16/16	16/16
50	16/16	16/16
25	14/16	16/16
12,5	14/16	16/16
6,25	10/16	14/16
3,13	5/16	13/16
1,56	1/16	7/16
0,78	0/16	4/16
0	0/16	0/16

### Analytická specifika

#### Inkluzivita

Inkluzivita byla testována pomocí genomické DNA 167 MRSA kmenů. Testované kmeny zahrnovaly jeden referenční kmen (ATCC 33592) a 166 klinických izolátů odebraných v Evropě a USA. Izoláty obsahovaly SCC*mec* typu I-V charakterizované pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE). SCC*mec* je stafylokoková chromozomální kazeta (Staphylococcal Chromosomal Cassette), což je mobilní genetický element, který obsahuje gen *mecA*. Další 588 klinické izoláty MRSA bez další molekulární charakteristiky byly analyzovány. U 580 izolátů byl detekován *mecA*, zbývajících 8 izolátů bylo klasifikováno jako hraničně rezistentní na oxacilin (Borderline Oxacillin Resistant) *S. aureus* (BORSA) nebo modifikovaný *S. aureus* (MODSA)<sup>4</sup>, vykazujících MIC pod 8 µg oxacilinu na ml.

#### Exkluzivita

Byla testována genomická DNA následujícího panelu nejčastějších patogenů způsobujících systémové krevní infekce (13), kmenů, které s těmito patogeny úzce souvisejí a kmenů, které fylogeneticky úzce souvisejí se *S. aureus*. Všechny tyto druhy byly negativní na *mecA*.

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Enterobacter taylori</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Burkholderia cepaci</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

<sup>4</sup> BORSA má nízkou rezistenci na základě zvýšené produkce β-laktamázy, MODSA má změněnou PBP strukturu s nižší vazebnou afinitou nebo hyperprodukcí PBP (vzácné). Žádná ze skupin není nositelem genu *mecA*.

Interferující látky

Následující látky neinterferují s detekcí *mecA* DNA pomocí tohoto testu.

**Tabulka 6: Interferující látky**

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

## POZNÁMKA PRO KUPUJÍCÍHO

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

## LITERATURA

1. Pfaller, M.A., et al. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33:283-97.
2. Diekema, D.J., et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 (2001) (suppl 2), S114-S132.
3. Zetola, N., et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 5, Issue 5, 275-286.
4. Cosgrove, S.E., et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan 1;36(1):53-9. Epub 2002 Dec 13.
5. Whitby, M., et al. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med J Aust*. 2001 Sep 3;175(5):264-7.
6. Kollef, M.H., et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections. *Chest* (1999); 115: 462-74.
7. 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: 529-35.
8. Lodise, T.P., et al. Outcomes Analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* (2003); 36: 14-23.
9. Paterson, D.L., et al. Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: are minimization of selection of resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive? *Clin Infect Dis*. (2003);36(8):1006-12.
10. Ryffel, C., et al. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene*. 1990 Sep 28;94(1):137-8.
11. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
12. 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.
13. Cockerill FR 3rd, et al, Analysis of 281,797 consecutive blood cultures performed over an eight-year period: trends in microorganisms isolated and the value of anaerobic culture of blood, *Clin Infect Dis*. 1997; 24 (3): 403-18.





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



Distributed by

Roche Diagnostics  
Indianapolis, IN 46256 USA  
(For Technical Assistance call the  
Roche Response Center  
toll-free: 1-800 526 1247)

Roche Diagnostics  
H7V 4A2 Laval, Quebec  
(For Technical Assistance call:  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG  
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics  
F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim, Germany

Distributore in Italia:  
Roche Diagnostics SpA  
Piazza Durante 11  
I-20131 Milano

Roche Diagnostics S.L.  
E-08006 Barcelona

Distribuidor em Portugal:  
Roche Farmacéutica Química, Lda  
P-2700 Amadora



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

ROCHE, LIGHTCYCLER, MGRADE, FASTSTART, SEPTIFAST, HYBPROBE a AMPERASE jsou obchodní známky společnosti Roche.  
ROCHE RESPONSE CENTER je servisní značka společnosti Roche.

Amphotericin B<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Bristol-Myers Squibb.  
Aquo-Trinitrosan<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Merck & Co., Inc.  
ARA-cell<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Cell pharma GmbH.  
Arterenol<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Aventis Pharma Ltd.  
Cancidas<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti MSD Sharp & Dohme GmbH.  
Ciprobay<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Bayer AG.  
Dexahexal<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Hexal AG.  
Diflucan<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Pfizer Inc.  
Fortum<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti GlaxoSmithKline.  
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Ratiopharm International.  
InfectoClont<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Infectopharm GmbH.  
LTK-008<sup>™</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti biodelta, ZTB GmbH.  
Novalgín<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Aventis Pharma Ltd.  
Piperacillin<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Hexal AG.  
Refobacin<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Merck & Co., Inc.  
Sobelin<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Pfizer Inc.  
Tazobac<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Wyeth Pharmaceuticals AG.  
Vancomycin<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti Lilly Pharma Holding GmbH.  
Zienam<sup>®</sup> je registrovaná obchodní známka společnosti MSD Sharp & Dohme GmbH.  
Zyvoxid<sup>®</sup> 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 sublicense od GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, USA a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvánie, USA.

© 2008, Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

2/2008

(04623932001-03ENGL)  
04822641001-03