

MALDI Biotyper 3.0 uživatelský manuál



Bruker Daltonics



● MALDI Biotyper_{3.0}

Zákonná a regulační upozornění

Copyright © 2010

Bruker Daltonik GmbH

Všechna ostatní obchodní označení jsou ve výlučném vlastnictví příslušných majitelů.

Veškerá práva vyhrazena

Kopírování, upravování nebo překládání toho manuálu bez předchozího písemného souhlasu je zakázáno (mimo výjimky definované v zákonech o ochraně autorských práv).

Historie dokumentu

MALDI Biotyper 3.0 Uživatelský manuál, 2. revize (únor 2011)

Výrobní číslo: #269025#987654

První vydání: leden 2011

Záruka

Informace uvedené v tomto dokumentu mohou být bez předchozího upozornění pozměněny.

Firma Bruker Daltonik GmbH neposkytuje na tento materiál žádnou záruku, a to včetně (avšak bez omezení na) implicitní prodejní záruky a vhodnost jeho použití pro jiné účely.

Firma Bruker Daltonik GmbH neodpovídá jak za chyby, které se v tomto dokumentu mohou vyskytnout, tak také za náhodné či následné škody, které vzniknou v souvislosti s pořízením, provozováním anebo používáním tohoto materiálu.

Firma Bruker Daltonik GmbH rovněž nenese zodpovědnost za použití nebo spolehlivost tohoto softwaru u těch zařízení, která nejsou výrobky zn. Bruker Daltonik GmbH.

Užití obchodních známek

Názvy společností a produktů zde zmiňované mohou být ochrannými známkami příslušných vlastníků.

Omezení používání

Použití pouze pro výzkum (RUO). Nepoužívat na diagnostické procedury.

Odmítnutí odpovědnosti za hyperlink

Firma Bruker Daltonik GmbH neposkytuje žádnou záruku (ani písemnou, ani ústní) a nezodpovídá ani za obsah, ani za údaje, jež jsou uvedeny na těch internetových stránkách, na které tento dokument odkazuje

Kontakt

Pro získání dalších informací a služeb kontaktujte svého místního zástupce firmy Bruker Daltonics

| | |
|--|--|
| Česká Republika | Německo |
| Bruker Daltonics s.r.o. | Bruker Daltonik GmbH |
| Zdráhalova 10 | Fahrenheitstraße 4 |
| Brno, 613 00 | 28359 Bremen |
| Česká Republika | Německo |
| Telefon e: +420 544 526 988 | Telefon: +49 421 2205-450 |
| Fax: +420 544 526 989 | Fax: +49 421 2205-370 |
| Internet: www.bdal.cz | Internet: www.bdal.de |
| Service Support | Service Support |
| Telefon: +420 733 351 541 | Telefon: +49 421 2205- 350 |
| E-mail: service@bdal.cz | E-mail: service@bdal.de |

OBSAH

| | | |
|---|-----------|--|
| Zákonná a regulační upozornění | 2 | |
| Kontakt | 4 | |
| Obsah..... | 5 | |
| Novinky..... | 9 | |
| Typografické a aplikační zvyklosti | 11 | |
| Začínáme s programem MALDI Biotyper | 14 | |
| Analýza výsledků | 14 | |
| 1 Systémové komponenty | 16 | |
| 1.1 Použití přístroje MALDI Biotyper ke klasifikaci v reálném čase | 16 | |
| 1.1.1 Identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie | 16 | |
| 1.1.2 Generování identifikačních molekulárních otisků ('Fingerprints') | 17 | |
| 1.1.3 Výpočet skóre vzorku | 18 | |
| 1.2 Offline klasifikace (OC) přístrojem MALDI Biotyper | 19 | |
| 1.3 Program flexControl | 19 | |
| 2 Klasifikace v reálném čase pomocí softwaru MALDI Biotyper Realtime Classification (RTC) | 20 | |
| 2.1 Spuštění softwaru..... | 20 | |
| 2.2 Uživatelské rozhraní programu MALDI Biotyper Realtime Classification | 20 | |
| 2.2.1 Změna velikosti okna programu MALDI Biotyper RTC | 24 | |
| 2.3 Průvodce programem MALDI Biotyper RTC | 24 | |
| 2.4 Vytvoření nového projektu | 27 | |
| 2.5 Vytvoření projektu pomocí tlačítka New... nacházejícího se v Průvodci | 28 | |
| 2.5.1 Vložení údajů o vzorku | 30 | |
| 2.6 Vytvoření projektu pomocí tlačítka Import... | 48 | |
| 2.6.1 CSV (Classification Job) soubory..... | 48 | |
| 2.6.2 Import údajů o vzorku ze souboru CSV | 50 | |
| 2.7 Definování projektových metod | 51 | |
| 2.8 Kontrola nastavení projektu | 53 | |
| 2.9 Zrušení nastavení projektu..... | 53 | |
| 2.10 Vymazávání projektů | 54 | |
| 2.11 Spuštění klasifikačního procesu | 55 | |
| 2.12 Pokračování v přerušném klasifikačním procesu | 56 | |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.13 | Pokračování klasifikačního procesu | 59 |
| 2.14 | Zrušení klasifikačního procesu | 63 |
| 2.15 | Natahování/nahrávání již archivovaného projektu..... | 64 |
| 2.16 | Zobrazení výsledků klasifikace | 65 |
| 2.17 | Generování zprávy o výsledcích..... | 68 |
| 2.17.1 | Struktura zprávy o výsledcích klasifikace..... | 69 |
| 2.17.2 | Informace o projektu | 69 |
| 2.17.3 | Přehledná tabulka výsledků..... | 70 |
| 2.17.4 | Shoda výsledků s předlohou | 72 |
| 2.17.5 | Význam hodnot skóre | 72 |
| 2.17.6 | Význam kategorií konzistence..... | 73 |
| 2.17.7 | Tabulky zařazení jednotlivých analytů..... | 73 |
| 2.18 | Specifické zprávy o kategoriích shody..... | 75 |
| 2.19 | Vytvoření statistické zprávy | 76 |
| 3 | MALDI Biotyper – Offline klasifikace (OC) | 77 |
| 3.1 | Spuštění softwaru..... | 77 |
| 3.2 | MALDI Biotyper OC – Uživatelské rozhraní | 77 |
| 3.2.1 | Náhled souboru | 79 |
| 3.2.3 | Náhled taxonomického dendrogramu | 82 |
| 3.2.4 | Náhled gelu | 83 |
| 3.2.5 | Náhled tabulky..... | 84 |
| 3.2.6 | Panel nástrojů..... | 88 |
| 3.2.7 | Online pomoc | 89 |
| 3.3 | Práce s programem MALDI Biotyper OC | 90 |
| 3.3.1 | Hrubá spektra a hlavní spektrum (MSP) | 90 |
| 3.3.2 | Vkládání spekter a MSP do Náhledu souboru | 91 |
| 3.3.3 | Tvorba, editování a výběr metod zpracování | 96 |
| 3.3.4 | Předběžné zpracování spekter | 100 |
| 3.3.5 | Standardní a subtypizovaná hlavní spektra | 103 |
| 3.4 | Klasifikace neznámých vzorků porovnáním jejich spekter anebo hlavních spekter 117 | |
| 3.4.1 | Výpočet hodnoty skóre..... | 117 |
| 3.4.2 | Provádění klasifikace | 118 |
| 3.4.3 | Zobrazení výsledků klasifikace MSP..... | 120 |

| | | |
|--|--|------------|
| 3.4.4 | Subtypizace úzce příbuzných mikroorganismů..... | 121 |
| 3.4.5 | Generování zprávy o výsledcích klasifikace | 123 |
| 3.5 | Taxonomické dendrogramy a knihovny MSP | 124 |
| 3.5.1 | Editor taxonomického dendrogramu MALDI Biotyper..... | 125 |
| 3.5.2 | Vytváření a užívání taxonomických dendrogramů..... | 126 |
| 3.5.3 | Odstranění taxonomického dendrogramu..... | 131 |
| 3.5.4 | Vytváření a používání knihoven MSP | 131 |
| 3.6 | MSP dendrogramy | 132 |
| 3.6.1 | Vytvoření MSP dendrogramů..... | 132 |
| 3.6.2 | Zobrazení MSP dendrogramů..... | 133 |
| 3.7 | Klastrování spekter pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) . | 135 |
| 3.7.1 | PCA hmotnostních spekter | 136 |
| 3.7.2 | Klastrování pomocí PCA | 136 |
| 3.7.3 | Zobrazení výsledků klastrování pomocí PCA | 138 |
| 3.8 | CCI analýza..... | 142 |
| 3.8.1 | Vytvoření CCI Matrix | 142 |
| 3.8.2 | Zobrazení výsledků CCI..... | 145 |
| 3.8.3 | Provedení CCI klasifikace | 146 |
| 3.8.4 | Zobrazení výsledků CCI klasifikace | 148 |
| 3.9 | Uzavření programu MALDI Biotyper OC..... | 148 |
| 3.10 | Rychlé odkazy do menu programu MALDI Biotyper 3.0 Menus a zkrácené příkazy | 148 |
| 3.11 | Řešení problémů..... | 151 |
| Příloha A — Příprava matrix a MALDI terčků..... | | 154 |
| A.1 | Příprava matrix roztoku | 155 |
| A.2 | Čištění MALDI terčků | 156 |
| Příloha B — Analýza vzorků | | 158 |
| B.1 | Kultivace mikroorganismů | 158 |
| B.2 | Příprava vzorků | 158 |
| B.2.1 | Metoda přímého transferu..... | 159 |
| B.2.2 | Metoda extrakce kyselinou mravenčí..... | 160 |
| B.2.3 | Metoda TFA extrakce | 161 |
| B.3 | Měření MALDI-TOF spekter..... | 162 |
| B.3.1 | Kalibrace | 163 |

| | |
|---|------------|
| Příloha C — Instalace a licencování softwaru MALDI Biotyper..... | 166 |
| C.1 Systémové požadavky | 166 |
| C.2 Instalace softwaru MALDI Biotyper | 167 |
| C.2.1 Instalace MALDI Biotyper serveru..... | 167 |
| C.2.2 Instalace balíčku MALDI Biotyper Offline Classification | 168 |
| C.2.3 Instalace balíčku MALDI Biotyper Offline Classification v síti se vzdáleným MALDI Biotyper Serverem | 168 |
| C.3 Licencování softwaru MALDI Biotyper | 169 |
| C.4 Odinstalování programu MALDI Biotyper..... | 170 |
| C.5 Instalace programu MALDI Biotyper Real Time Classification..... | 170 |
| Příloha D — Nastavení registrů (určeno pouze pro vyspělé uživatele) | 171 |
| Příloha E — Povolný modus..... | 174 |
| E.1 Činnost softwaru MALDI Biotyper v povoleném módu..... | 174 |
| E.2 Operační práva k aplikacím Bruker Daltonics UserManagement a MALDI Biotyper 175 | |
| E.3 Změna uživatelských hesel | 176 |
| E.4 Zamykání a odemykání uživatelů..... | 177 |
| E.5 Zamykání a odemykání aplikací programu Bruker Daltonics..... | 178 |
| Příloha F — Glosář | 180 |
| Index | 184 |

Novinky

Aktualizované balíčky programů MALDI Biotyper Realtime Classification (RTC) a MALDI Biotyper Offline Classification (OC) obsahují několik nových funkcí, které ulehčují identifikaci vzorků a zpracování dat.

Novinky a vylepšené funkce programu MALDI Biotyper RTC:

- Přímé zobrazení výsledků identifikace — okamžitý přístup k výsledkům rozborů dat v době kdy jsou zpracovávány další vzorky.
- Opakovaný rozbor zkoumaných vzorků — pokud se pokud rozbor nezdaří, lze vzorky zcela jednoduše analyzovat znovu.
- Zobrazení případů shody (‘matching hints’) na obrazovce – zvláštní klasifikační informace jsou okamžitě k dispozici.
- Zobrazení úplného seznamu správných výsledků – lze zviditelnit až 10 případů shody aniž by bylo třeba vypracovat zprávu.
- Interaktivní validace – uživatel může definovat validační status řazení výsledků (viz část 2.15).
- Vzdálené definování a validace projektu – pohodlné nastavení projektu v jakémkoli počítači.
- Německá, francouzská a španělská verze – usnadnění pro ty uživatele, kteří nehovoří anglicky.
- Zlepšená grafická vizualizace výsledků – rychlý odhad výsledků klasifikace.
- Vyhledávání archivovaných projektů podle jména vzorku a jeho ID – snadnější práce s daty.
- Definovaná validační pozice a automatická kalibrace (viz část 2.5.1.9).
- Hlášení o konzistentních kategoriích a o statistice (viz části 2.18 a 2.19).

Nové a vylepšené funkce programu MALDI Biotyper OC:

- Přímý import RTC projektů – pohodlné následné zpracování dat o RTC projektu.
- Rychlé natažení obsahu uzlu s taxonomickým stromem – rychlejší organizace dat.

- Funkce Gel view zobrazí kterýkoli podsoubor hrubých spekter – zlepšená vizualizace dat.
- Exportování tabulky CCI — zjednodušená výměna dat.

Typografické a aplikační zvyklosti

Tyto zvyklosti obsahují styly písma užívané k označení jednotlivých položek grafického uživatelského rozhraní (GUI) (např. Položky v menu)

Navíc obsahují i vysvětlivky termínů užitých k popisu interakce uživatele s grafickým uživatelským rozhraním (např. zmáčknutí pravého tlačítka myši)

Uživatelské rozhraní

Vypnout (Clear)

Funkci programu vypnete nastavením kurzoru myši na zaškrtnuté políčko a zmáčknutím levého tlačítka myši.

Příklad: 'Vypněte políčko **Curve Smoothing (vyrovnání křivky).**'

Kliknout (Click)

Ke spuštění požadované akce programu nastavte kurzor myši na položku GUI a zmáčkněte levé tlačítko.

Příklad: 'Zmáčkněte **OK.**'

Kliknout a táhnout (Click and drag)

Nastavte kurzor myši na okno a zmáčkněte levé tlačítko myši. Držte levé tlačítko zmáčknuté a pohněte kurzorem myši tak abyste označili požadovanou (obvykle obdélníkovou) oblast.

Příklad: 'Přibližte zajímavé body pomocí příkazu „kliknout a přetáhnout“ („click and drag“) v okně zobrazujícím spektrum.

Dvojité kliknutí (Double-click)

Ke spuštění požadované akce programu nastavte kurzor myši na příslušnou položku a zmáčkněte rychle dvakrát po sobě levé tlačítko myši.

Příklad: 'Dvakrát po sobě klikněte rychle levým tlačítkem myši na položku **Sample.**'

Táhnout a přesunout (Drag and drop)

Nastavte kurzor myši na příslušnou položku a zmáčkněte levé tlačítko. Levé tlačítko myši držte zmáčknuté a vybranou položku přesuňte na jiné místo.

Příklad: 'Přesuňte pomocí příkazu „Táhnout a přesunout“ („Drag and drop“) tabulku do jiné skupiny tabulek.'

Vybrat (Select)

Přejděte na požadovaný příkaz v Menu.

Příklad: 'Vyberte příkaz **File > Zip > Zip Project...**'

Při výběru dané položky na ni nastavte kurzor myši (např. při vložení tabulky) a zmáčkněte levé tlačítko.

Příklad: 'Vyberte požadovaný soubor z nabídky a klikněte na **Export.**'

Příslušnou položku programu aktivujte nastavením kurzoru myši na nezaškrtnuté políčko a zmáčknutím levého tlačítka myši.

Příklad: 'Zaškrtněte políčko **Curve Smoothing.**'

Kliknout pravým tlačítkem myši (Right-click)

Pro otevření kontextového menu u dané položky uživatelského rozhraní (GUI) nastavte kurzor myši na tuto položku a zmáčkněte pravé tlačítko.

Příklad: 'Zmáčkněte pravé tlačítko myši v okně Spectrum View'.

Ovládání klávesnice

Stisknout (Press)

Použijte klávesy vyznačené na klávesnici. Pokud jsou vyznačeny změnové klávesy (např. **SHIFT**, **ALT**, **CTRL**), držte je stisknuty současně s další klávesou.

Příklad: 'K přepnutí mezi okny Tabulka a Spektrum zmáčkněte **CTRL+F3.**'

Typografické konvence

Názvy souborů a adresářů a jejich umístění

Názvy souborů a adresářů a jejich umístění jsou psány fontem `monospace type`.

Příklad: 'Navigujte do adresáře `C:\Bruker\solarixcontrol\test` a otevřete soubor `test_1.txt`.

Položky grafického uživatelského rozhraní

Položky grafického uživatelského rozhraní umožňují interakce uživatele s programem aniž by bylo nutno použít klávesnici.

Mezi typické položky GUI patří okna, menu, menu s volbami, roletky s možnostmi a tlačítka v programu.

- Názvy oken jsou psány běžnými kapitálkami.

- Názvy polí pro vkládání textu a tlačítek jsou psány **tučně**.

Příklad: 'Do okna New Digest vložte hodnoty pro **Name** (povinný údaj) a **Note** (nepovinný údaj) a klikněte na tlačítko **Next>**.'

- Příkazy menu a volby GUI jsou psány **tučně**.

Příklad: 'Vyberte **Window > Show View > LC-MS Survey**'.

Klávesnice

Odkazy na klávesy jsou psány **tučně**.

Příklad: 'Zmáčkněte **ALT+F4**'.

Publikace

Odkazy na elektronické a tištěné dokumenty jsou psány *kurzívou*.

Příklad: 'Pro získání dalších detailů vyhledejte manuál *ProteinScape Administrator*'.

Odkazy URL

Jednotné lokátory zdrojů (URLs) jsou psány podtrženě. Názvy schémat (např: http://) jsou vynechány

Příklad: 'Další podrobnosti naleznete na odkazu www.mascot.org/users'.

Začínáme s programem MALDI Biotyper

Tato sekce poskytuje souhrnný přehled postupů potřebných k roztřídění neznámých mikroorganismů pomocí softwaru MALDI Biotyper.

Předpoklady

Použití hmotnostního spektrometru MALDI-TOF (viz Příloha A)

Připravený MALDI terčík (viz Příloha A)

►► Roztřídění neznámých mikroorganismů pomocí programu MALDI Biotyper RTC

1. Vložte misku se vzorkem do hmotnostního spektrometru (viz příručka s návodem)
2. Spusťte program MALDI Biotyper Realtime Classification (viz část 2.1).
3. Spusťte Průvodce programem MALDI Biotyper Realtime Classification Wizard (viz část 2.3).
4. Vytvořte nový projekt (viz část 2.4).
5. Zadejte údaje o vzorku (viz část 2.5.1).
6. Definujte projektové metody (viz část 2.7).
7. Zkontrolujte nastavení projektu a spusťte identifikaci (viz část 2.8).
8. Vytvořte přehled výsledků identifikace (viz část 2.17).

Analýza výsledků

Výsledky rozboru získané pomocí programu MALDI Biotyper RTC mohou být dále zpracovávány a analyzovány pomocí programu MALDI Biotyper Offline Classification.

►► Analýza výsledků pomocí programu MALDI Biotyper OC

1. Spusťte klasifikační program MALDI Biotyper OFFLINE Classification (viz část 1.1).
2. Nahrajte projekt MALDI Biotyper RTC do programu MALDI Biotyper Offline Classification (viz část 3.3.2.2).
3. Program MALDI Biotyper použijte k následujícím úkonům:
 - Proveďte analýzu neznámých mikroorganismů pomocí:
 - o Hrubých spekter anebo hlavních spekter (viz část 3.4)

- o Matice kompozitního korelačního indexu (Composite Correlation Index Matrice; viz část 3.8.3)
- Zpřesnění klasifikace úzce příbuzných mikroorganismů pomocí subtypizace podle hlavních spekter (MSP – viz část 3.4.4)
- Začlenění spekter určených mikroorganismů do taxonomických stromů a knihoven MSP (viz část 3.5)
- Ke zjištění vztahů mezi mikroorganismy použijte:
 - o PCA dendrogramy a tabulky skóre a nahrávání (viz část 3.7)
 - o MSP dendrogramy (viz část 3.6)
 - o CCI matrice (viz část 3.8.1)

1 Systémové komponenty

Software MALDI Biotyper má tři hlavní komponenty:

- MALDI Biotyper RTC (klasifikace v reálném čase)
 - o Tento software je určen pro ty uživatele, kteří chtějí neznámé vzorky klasifikovat rychle a snadně. V tomto případě uživatel prostě vloží vzorek do přístroje, spustí proces klasifikace a čeká na výsledek.
- MALDI Biotyper OC (offline klasifikace)
 - o Určeno pro vyspělejší uživatele tj. ty, kteří chtějí klasifikační proces přesně doladit a podrobně zkoumat vztahy mezi jednotlivými skupinami organismů.
- flexControl
 - o Tento software se používá ke kontrole přístroje MALDI-TOF. V průběhu klasifikace vzorku přístrojem MALDI Biotyper může tento program běžet skrytě.

1.1 Použití přístroje MALDI Biotyper ke klasifikaci v reálném čase

1.1.1 Identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie

V současnosti představují biochemické testy základ většiny technik, jež se k identifikaci mikroorganismů používají. Ke kulturám se přidávají ty reagenty, které jsou metabolizovány pouze specifickými organismy. To má za následek určitou charakteristickou změnu barvy přidaného činidla a tu pak lze porovnat s referenčními hodnotami. Korelování výsledků velkého počtu testů provedených u kultivovaného vzorku potom umožňuje indikaci identity příslušného mikroorganismu.

Přístroj MALDI Biotyper používá odlišnou metodiku: mikroorganismy jsou v tomto případě identifikovány na základě exprese jejich vlastních bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie. Tento hmotový spektrální obraz proteinové exprese se porovnává s referenčními hodnotami uvedenými v databázi přístroje (seznam záznamů obsažených v této referenční databázi lze na požádání obdržet).

Výchozím materiálem pro klasifikaci pomocí přístroje MALDI Biotyper je individuální kolonie mikroorganismů, která je získána po jejich krátkodobé kultivaci na agarové

plotně (obvykle přes noc). Vzorek pak je přenesen na určitou pozici terčiku MALDI target a vysušen na vzduchu.

Po vysušení se ke vzorku přidá malé množství zásobního roztoku (matrix). Organické rozpouštědlo, které je v tomto roztoku obsaženo, pak z mikroorganismů extrahuje jednotlivé bílkoviny. Tyto extrahované proteiny jsou hlavně ribozomálního původu a ve vzorku jsou přítomny ve vysokých koncentracích.

Jakmile matrix vykryštalizuje, je příprava vzorku dokončena a lze jej analyzovat.

Není-li tato jednoduchá metoda přípravy vzorku úspěšná, lze použít dodatečný protokol obsahující krátký popis jednotlivých kroků chemické extrakce k tomu, aby se zvýšil počet mikroorganismů, jež lze pomocí MALDI analýzy identifikovat.

Hmotnostní spektrometrie zvaná MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionisation) TOF (Time of Flight) představuje základ analýz prováděných přístrojem MALDI Biotyper. Laser hmotového spektrometru MALDI-TOF ozáří směs matrix/vzorek, matrix odpaří a v rámci tzv. "měkkého" ionizačního procesu uvolní pozitivně nabitě proteiny. Základním faktorem tohoto procesu je schopnost matrix absorbovat UV záření a přenášet protony na extrahované bílkoviny.

Proteinové ionty jsou pak na krátkou vzdálenost elektrostaticky urychleny a proletí trubicí přístroje rychlostí, která je úměrná jejich hmotnosti. Proteinové ionty o různé hmotnosti doletí do detektoru během různých časových intervalů. Jednoduchým změřením doby, která uplyne mezi pulzačním zrychlením a příslušným signálem detektrou (nanosekundy), lze rychlost iontů změřit velmi přesně a výslednou hodnotu pak konvertovat na přesnou molekulární hmotnost.

1.1.2 Generování identifikačních molekulárních otisků ('Fingerprints')

Analýza pomocí přístroje MALDI Biotyper generuje charakteristickou distribuci hlavních ribozomálních bílkovin podle jejich hmotnosti a intenzity. Vzhledem k tomu, že toto hmotové spektrum je pro velký počet mikroorganismů druhově specifické, představuje de facto jejich "molekulární identifikátor" (tzv. fingerprint). Neznámé mikroorganismy lze pak identifikovat na základě srovnání jejich molekulárního identifikátoru s tisíci vzorů (pattern), jež jsou v referenční databázi uloženy.

Při zpracování dat je prvním krokem přenesení získaných hmotových spekter na seznam píků (peaks). Ve druhém kroku je pak tento seznam píků porovnáván se všemi jednotlivými vzory (profily), jež jsou v referenční databázi uloženy.

1.1.3 Výpočet skóre vzorku

Srovnávací algoritmus použitý ke srovnání molekulárního identifikátoru vzorku vypočítává tři samostatné hodnoty pro tři základní charakteristiky vzorku a pro referenční spektra.

1. Nejdříve se stanoví počet těch signálů v referenčním spektru, které se srovnávanému neznámému spektru podobají nejvíce. Při žádném srovnávání není výsledek tohoto srovnání roven nule a úplné porovnání dává hodnotu = 1.
2. Pak se stanoví počet těch signálů neznámého spektra, které se partnerským hodnotám referenčního spektra nejvíce přibližují. Při žádném srovnání není výsledek tohoto srovnání roven nule a úplné porovnání dává hodnotu = 1.
3. Nakonec se propočte symetrie srovnávaných signálních párů. Jestliže vysoce intenzivní (high-intensity) signály neznámého spektra korespondují s vysoce intenzivními signály spektra referenčního a odpovídají-li si navzájem i signály nízko intenzivní (low-intensity), je výsledkem tohoto postupu vysoce symetrická hodnota a tzv. srovnávací (korelační) matice dává hodnotu blízkou 1. Jestliže ale srovnávané páry signálů tuto symetrii nevykazují je výsledná hodnota blízká nule.

Uvedené tři hodnoty jsou pak společně vynásobeny a výsledek je normalizován na 1000. Hodnota vypočteného skóre je v tomto případě dekadickým logaritmem tohoto výsledku. Maximálně dosažitelná hodnota skóre je rovna 3 (= log 1000).

Následná klasifikace hodnot vypočteného skóre vykazuje nejvyšší shodu v horní části seznamu. Čím je hodnota skóre vyšší, tím pravděpodobnější je I klasifikace analyzovaného druhu. Barevně kódované zobrazení hodnoty vypočteného skóre přitom umožňuje rychlé hodnocení výsledků.

Hodnoty skóre $\geq 2,0$ lze považovat za pravděpodobnou klasifikaci.

V této souvislosti je ale důležité si uvědomit, že hodnota skóre vygenerovaného přístrojem MALDI Biotyper RTC znamená jen pravděpodobnost toho, že neznámý mikroorganismus bude jedním z druhů, jež jsou v databázi přístroje MALDI Biotyper zachyceny.

1.2 Offline klasifikace (OC) přístrojem MALDI Biotyper

Při offline klasifikaci využívá přístroj MALDI Biotyper OC stejnou databázi a nabízí tytéž klasifikační algoritmy jako přístroj MALDI Biotyper RTC; rozdíl spočívá pouze v tom, že tato metoda dává uživateli větší volnost při definování klasifikačních parameterů. Software přístroje MALDI Biotyper OC umožňuje uživateli rovněž optimalizaci klasifikačního procesu, a to tím, že vytváří, modifikuje a organizuje data referenčního spektra.

Zdokonalená analýza a různé výstupy umožňují také vizualizaci vztahů existujících mezi různými skupinami mikroorganismů a testovanými vzorky, a to na základě použití metod analýzy základních komponent (Principal Component Analysis – PCA) a kompozitního korelačního indexu (Composite Correlation Index – CCI).

1.3 Program flexControl


Program flexControl je určen pro konfiguraci a řízení činnosti hmotnostních spektrometrů typu Time-Of-Flight (TOF) výrobních řad *microflex*, *autoflex* a *ultraflex* firmy Bruker. Program flexControl pracuje v operačních systémech Microsoft® Windows® anebo XP® (SP3).

Více informací lze získat v manuálu *flexControl User Manual*.

2 Klasifikace v reálném čase pomocí softwaru MALDI Biotyper Realtime Classification (RTC)

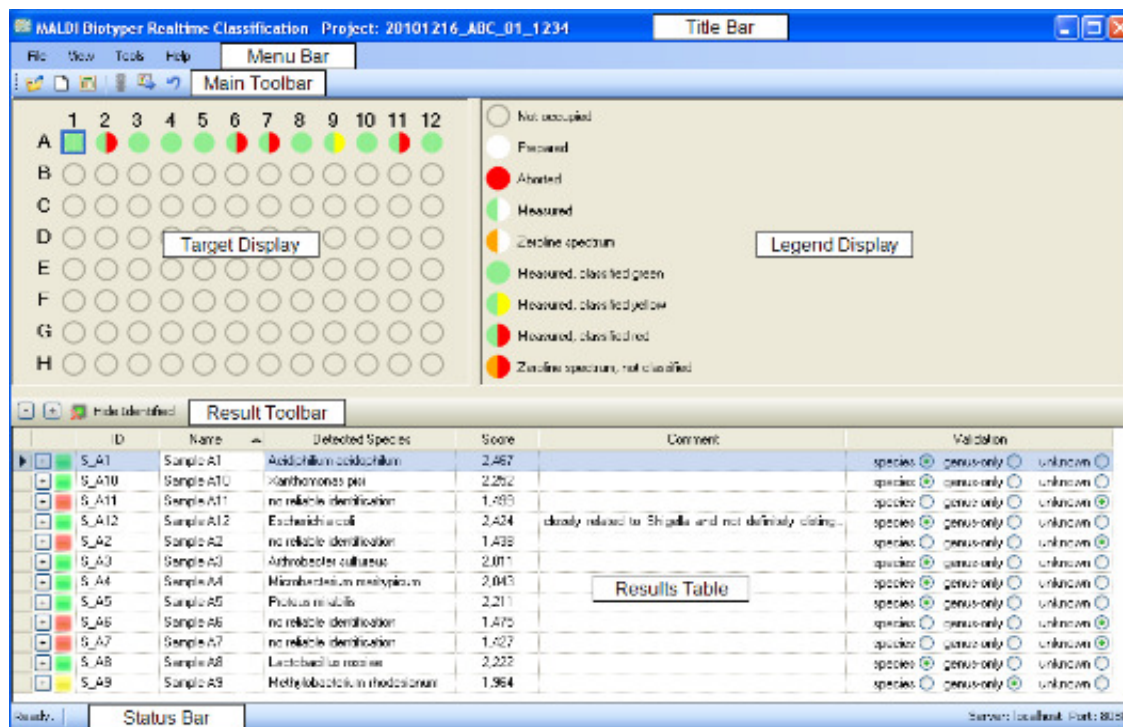
2.1 Spuštění softwaru

Pro spuštění softwaru MALDI Biotyper Realtime Classification je třeba:

1. Buď zvolit nabídku  > Programs > Bruker Daltonics > MALDI Biotyper RTC anebo dvakrát kliknout na ikonu desktopu MALDI Biotyper RTC.

2.2 Uživatelské rozhraní programu MALDI Biotyper Realtime Classification

Okno programu MALDI Biotyper Realtime Classification obsahuje lišty: titulek-, menu- a status (title-, menu-, toolbar- a status-); cílový a legendový displej (target and legend displays) a výsledkovou tabulku (results table).



Lišta Titulek (Title)










Tato lišta zobrazuje název aplikace a obsahuje známá tlačítka systému Windows umožňující minimalizaci, maximalizaci a zavření okna. Je-li klasifikace spuštěna anebo jsou-li zobrazeny výsledky klasifikace již ukončené, je zde zobrazeno i jméno souvisejícího projektu.

Lišta Menu

Tato lišta zobrazuje nabídky Soubor, Náhled, Nástroje a Pomoc (**File, View, Tools and Help**) programu MALDI Biotyper RTC.

Lišta Panely nástrojů

Na liště Panely nástrojů jsou zobrazena tlačítka umožňující přímý přístup k určitým příkazům.

| <u>Panel</u> | <u>Tip</u> | <u>Funkce</u> |
|---|-------------------------------|--|
| Hlavní panel nástrojů | | |
|  | Otevřít klasifikaci | Otevření archivovaného projektu |
|  | Nová klasifikace | Vytvoření nového projektu anebo natažení projektu již existujícího |
|  | Náhled výsledků | Generování zprávy o výsledcích klasifikace |
|  | Zavřít klasifikaci | Zavření právě probíhající klasifikace |
|  | Export validace | Uložení uživatelem definovaného stavu validace |
|  | Resetování validace | Použití již nastaveného stavu validace |
| Výsledky | | |
|  | Kolaps (zrušení) všeho | Kolaps (zrušení) všech výsledků klasifikace |
|  | Expandovat vše | Expandovat všechny výsledky klasifikace |
|  | Skrýt/zobrazit identifikované | Skrýt/zobrazit druh na základě shodných(konzistentních) výsledků |

Displej terčíku

Cílový displej zobrazuje zástupce terčíku MALDI a indikuje pozici a stav vzorků.

Legenda k displeji

Tato legenda vysvětluje barevné kódování použité k indikaci momentálního stavu vzorků zobrazených na tomto displeji.

Tabulka výsledků

Ve výsledkové tabulce je zobrazen souhrn výsledků aktivního nebo již ukončeného klasifikačního cyklu. Kliknutím pravého tlačítka na záhlaví tabulky se sloupce buď zobrazí anebo skryjí. Pořadí sloupců lze změnit kliknutím levého tlačítka na záhlaví tabulky a přetažením sloupce na nové místo.

| Sloupec | Komentář |
|------------------------|--|
| Ikona | Kódování barvami semaforu. |
| ID | Identifikační číslo analytu (analyzovaného vzorku) (= ID vložené na stránku Analyte Placement v Průvodci k programu MALDI Biotyper RTC). |
| Název | Název analytu (= jméno vložené na stránku Analyte Placement v Průvodci k programu MALDI Biotyper RTC). |
| Pozice | Pozice cílového analytu (= pozice vložená na stránku Analyte Placement v Průvodci k programu MALDI Biotyper RTC). |
| Čip | Čip vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci k programu MALDI Biotyper RTC. |
| Detekovaný druh | Jméno nejvíce odpovídajícího organismu. |
| Skóre | Bodová hodnota výsledku porovnání. |

| | |
|--|--|
| Poznámka | Náznak shody (existuje-li) |
| Popis | Popis analytu (= popis vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci k programu MALDI Biotyper RTC). |
| Validace | Uživatелеm měnitelné konzistentní kategorie. |
| Výsledky srovnání – Ikona | Barevné kodování rozšířených (expandovaných) výsledků (použito je barev dopravních světel). |
| Výsledky srovnání – Skóre | Hodnota skóre shody u rozšířených (expandovaných) výsledků |
| Výsledky srovnání – Zjištěný druh | Jméno srovnávaného organismu v rozšířených (expandovaných) výsledcích. |
| Výsledky srovnání – Poznámka | Náznak shody u rozšířených (expandovaných) výsledků (existuje-li). |
| Výsledky srovnání – Vazba | NCBI identifikátor v příslušném uzlu (node) taxonomického kmene podle NCBI (existuje-li) v rozšířených výsledcích. Je-li system napojen na Internet, otevře hyperlink v daném nodu taxonomický prohlížeč NCBI. |

Chcete-li zabránit tomu, aby výsledková tabulka automaticky nerolovala směrem nahoru a aby v průběhu klasifikace nové výsledky nebyly zobrazovány, zvolte řídicí políčko **Switch off scrolling** (Vypnout rolování). Výsledky se na zobrazované tabulce přestanou pohybovat.

Není-li nabídka **Switch off scrolling** vybrána, je stávající zobrazovaná výsledková zbulka ovlivňována právě probíhajícím měřením. Nové výsledky se objevují v dolní části tabulky, výsledková tabulka automaticky pomalu roluje směrem vzhůru a objevují se na ní postupně další a další nové výsledky.

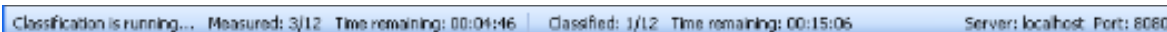
Status Bar (Stavová lišta)

Informace o aktuálním stavu programu MALDI Biotyper je zobrazena na levé straně stavové lišty, zatímco informace o připojení počítače jsou viditelné na straně pravé.



Connecting to flexControl successful | Server: localhost Port: 8080

Také průběh klasifikace je na stavové liště zachycen. Toto hlášení obsahuje číslo momentálně měřeného vzorku, propočtený zbývající čas měření (z programu flexControl), údaj o počtu vzorků, které již byly klasifikovány, a zbývající dobu klasifikace (z programu MALDI Biotyper RTC).



Classification is running... Measured: 3/12 Time remaining: 00:04:46 | Classified: 1/12 Time remaining: 00:15:06 | Server: localhost Port: 8080

2.2.1 Změna velikosti okna programu MALDI Biotyper RTC

Okno programu MALDI Biotyper RTC se vždy otevírá ve velikosti, která byla nastavena výrobcem; uživatel ji však může změnit a přizpůsobit svým potřebám.

Velikost celého okna lze zvětšit nebo zmenšit kliknutím kurzoru na jeho okraj a jeho následným roztážením na požadovanou velikost. Spolu s tím se adekvátně změní i velikost displeje a zobrazené výsledkové tabulky.

Relativní šířku cílového displeje a zobrazení příslušné legendy lze změnit kliknutím a potažením jejich svislého dělítky potřebným směrem.

Také relativní výšku výsledkové tabulky, cílového displeje a příslušné legendy lze změnit kliknutím a potažením jejich vodorovného dělítky potřebným směrem.

2.3 Průvodce programem MALDI Biotyper RTC

Poradce programu MALDI Biotyper RTC se používá pro:


- vytvoření nového klasifikačního projektu (viz část 2.4)
- pokračování v přerušeném klasifikačním procesu (viz část 2.12)
- natažení (nahrání) již archivovaných projektů a zobrazení výsledků (viz část 2.15).

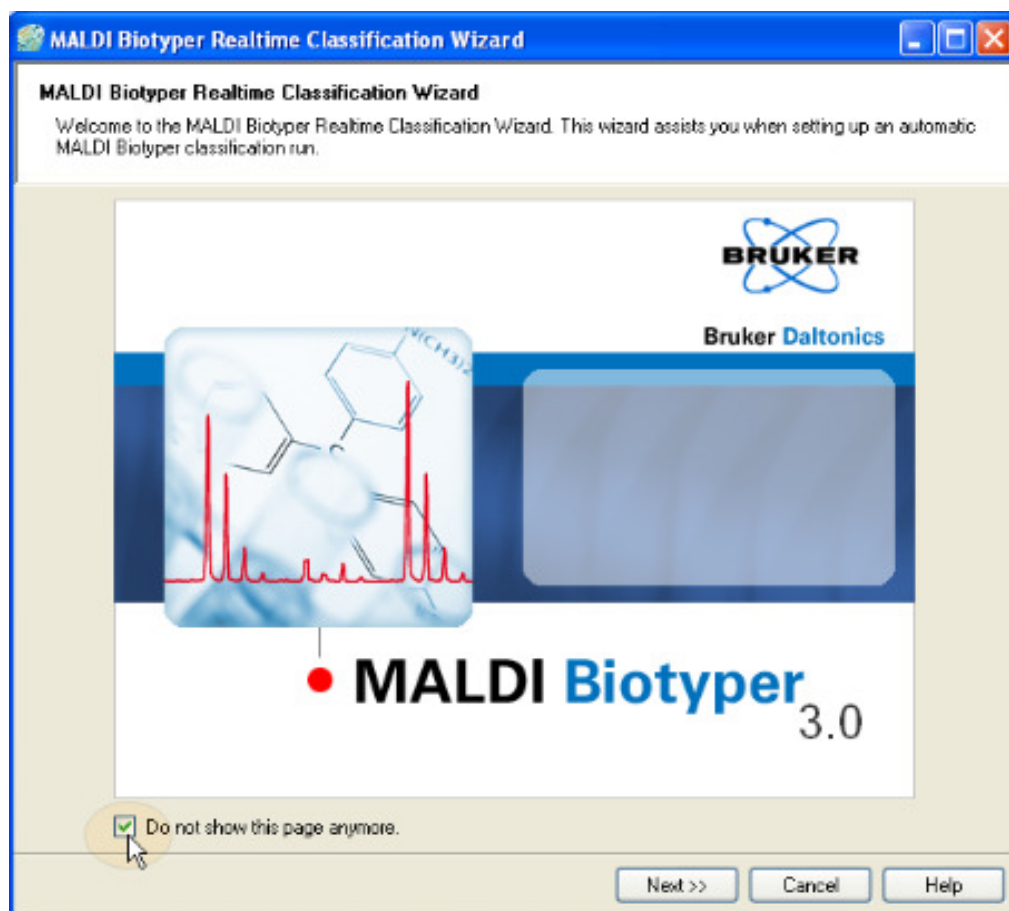
Průvodce (Wizard) programem MALDI Biotyper RTC má pět samostatných stránek:

- Stránka **uvítací (Welcome)** (volitelná).

- Stránka **definování projektu (Definition of Project)** — používá se buď k definování nových anebo k uložení již existujících klasifikačních projektů.
- Stránka **umístění analytu (Analyte Placement)** — používá se k vložení údajů o vzorku.
- Stránka **volba metod programu MALDI Biotyper (Selection of MALDI Biotyper Methods)** — používá se k definování metod předběžné přípravy vzorku a jeho identifikace (preprocessing and identification).
- Stránka **shrnutí projektu (Project Summary)** — používá se ke kontrole nastavení projektu.

Chcete-li Průvodce programem MALDI Biotyper RTC spustit:

- zvolte příkaz **File > New classification** a
- klikněte buď na  na liště nebo
- současně stiskněte tlačítka **Ctrl+N**.



Tip: Při tvorbě budoucích projektů vyberte kontrolní box; tím přeskóčíte uvítací stránku (**Welcome**).

Kliknutím na nabídku **Next >** na uvítací stránce (**Welcome**) získáte přístup na stránku definování projektu (**Definition of Project**).

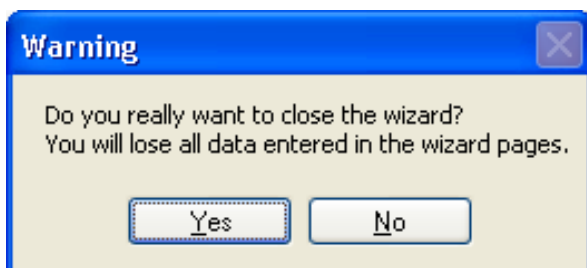
Příkazová tlačítka nacházející se v dolní části každé stránky umožňují uživateli navigaci uvedenou v obsahu Průvodce.

Tlačítko Funkce

| | |
|------------------|-----------------------------|
| Help | Spuštění prohlédávače. |
| < Back | Návrat na předchozí stránku |
| Next > | Přechod na další stránku |

Tlačítko **Funkce**

Cancel Otevření níže uvedeného konfirmačního dialogu.



Chcete-li Průvodce zavřít a vrátit se zpět do programu MALDI Biotyper Realtime Classification, klikněte na tlačítko **Yes**; tím Průvodce zavřete a vrátíte se zpět do původního okna. Chcete-li se vrátit zpět na právě otevřenou stránku Průvodce programem, klikněte na tlačítko **No**.

{b}Poznámka Zrušení nastavení (setupu) probíhající klasifikace bude mít za následek ztrátu všech nových dat, která by na stránce Průvodce vložena (s výjimkou názvu projektu, popisu projektu a tvůrce – **Project Name**, **Project Description** a **Creator**).

Finish Tento příkaz průvoce uzavírá a spouští proces klasifikace.

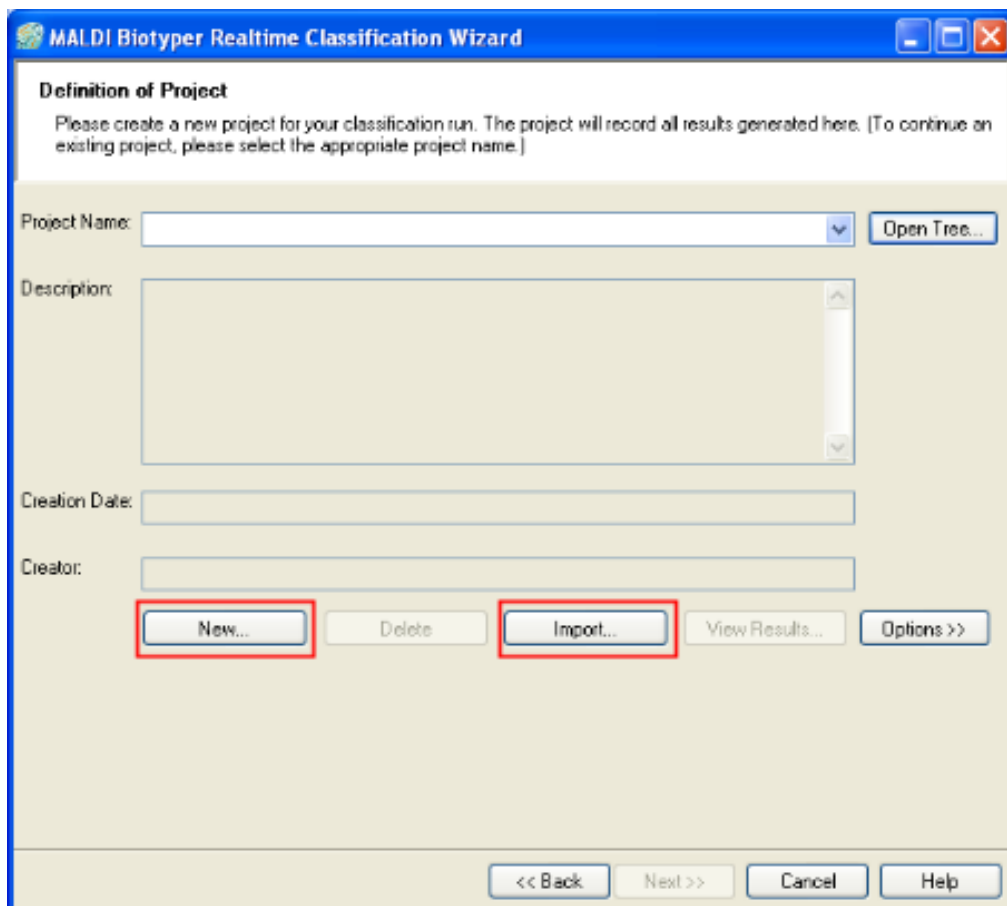
2.4 Vytvoření nového projektu

►► Vytvoření klasifikačního projektu

Klasifikační projekt lze pomocí Průvodce programem MALDI Biotyper RTC vytvořit dvěma způsoby:

- Kliknutím na tlačítko **New...** na stránce **Definition of Project** (viz část 2.5) a přidáním údajů o vzorku na cílovou pozici, která se nachází na stránce **Analyte Placement**.

- Kliknutím na tlačítko **Import...** na stránce **Definition of Project** (viz část 2.5) a importováním 'klasifikačního úkolu' ('classification job'), který je vygenerován nanášecím (spotting) robotem anebo LIMS.



{b}Poznámka{/b} Za výběr té setupové procedury klasifikačního projektu, která je pro příslušnou laboratoř nejvhodnější, je zodpovědný uživatel programu.

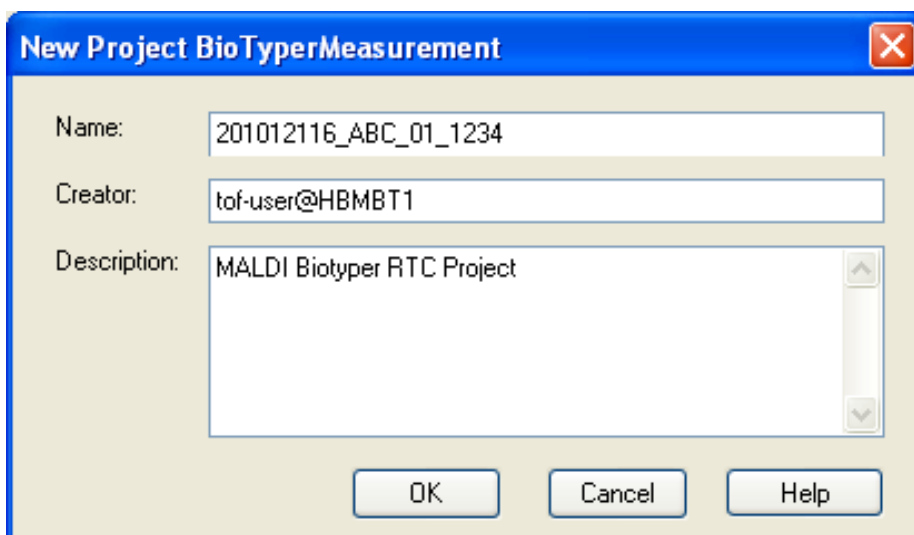
2.5 Vytvoření projektu pomocí tlačítka **New...** nacházejícího se v Průvodci

Název projektu, jeho tvůrce a jeho fakultativní popis se vkládají na stránku **Definition of Project**.

Chcete-li pomocí tlačítka New... vytvořit nový klasifikační projekt:

1. klikněte na tlačítko **New...** na stránce **Definition of Project**.
2. V rámci dialogu **New Project Biotyper Measurement**, vložte název tohoto nového projektu do políčka **Name** a do políčka **Creator** uveďte jméno té osoby, která bude projekt tvořit.

Tip Pro vytvoření názvu projektu se doporučuje použít následující postup:
<date>_<operator's name or initials>_<sequential number>_<target ID>
Syntax: yyyymmdd_ABC_01_01234, e.g.
20081208_JKB_02_01234.



I když je tvůrce (**Creator**) systémem navržen automaticky (= jméno uživatele je zalogováno do Windows), lze jeho jméno změnit. Tvůrce (**Creator**) projektu ale definován být musí. Je-li původně nastavený údaj vymazán, je tlačítko **OK** vyřazeno z provozu, a to až do okamžiku, kdy bude vložen nový identifikátor.

Popis projektu lze vložit do políčka **Description** (tento údaj je nepovinný).

Poznámka: Maximální délka názvu (**Name**) a tvůrce (**Creator**) projektu činí 50 znaků. Maximální délka popisu (**Description**) projektu činí 255 znaků.

3. Kliknutím na tlačítko **OK** se vrátíte na stránku **definování projektu (Definition of Project)**; na ní se pak objeví podrobné údaje o projektu novém.

The screenshot shows the 'MALDI Biotyper Realtime Classification Wizard' window, specifically the 'Definition of Project' step. The window has a blue title bar and standard Windows window controls. The main area is light beige and contains the following fields and buttons:

- Project Name:** A text box containing '20101216_ABC_01_1234' and a dropdown arrow. To its right is an 'Open Tree...' button.
- Description:** A large text area containing 'MALDI Biotyper RTC Project'.
- Creation Date:** A text box containing '16.12.2010 16:17:31'.
- Creator:** A text box containing 'tof-user@HBMBT1'.
- Buttons:** A row of five buttons: 'New...', 'Delete', 'Import...', 'View Results...', and 'Options >>'.
- Footer Buttons:** A row of four buttons: '<< Back', 'Next >>', 'Cancel', and 'Help'.

4. Kliknutím na tlačítko **Next** přejdete v Průvodci na stránku **Analyte Placement**; tato stránka se používá k přidání údajů o vzorku na cílové pozice (viz část 2.5.1).

2.5.1 Vložení údajů o vzorku

Údaje o vzorku lze na cílové pozice dodat čtverým způsobem. Údaje o vzorku lze:

- vložit přímo pomocí myši a klávesnice počítače (viz část 2.5.1.3),
- zkopírovat a vložit z některého tabulkového programu, např. Microsoft Excelu (viz část 2.5.1.5),
- importovat ze souboru XML (viz část 2.5.1.6) or
- načíst a postupně vložit pomocí čárových kódů (viz část 2.5.1.4).

2.5.1.1 Volba cílové pozice vzorků

Mají-li být data vkládána přímo z klávesnice, je třeba na cílovém displeji zvolit ty cílové pozice, na něž tato data mají být uložena (viz část 2.5.1.3).

Jsou-li údaje o vzorku vkládány kopírováním z tabulkového procesoru anebo importem ze souboru XML, jsou cílové pozice definovány těmi údaji, které jsou buď vkládány (viz část 2.5.1.5) anebo importovány (viz část 2.5.1.6).

Sekvenční způsob vkládání

Při použití sekvenčního způsobu vkládání jsou za výchozí cílovou pozici postupně ukládány i pozice další. Tento modus se obzvláště hodí pro vkládání údajů o vzorku pomocí čárových kódů (viz část 2.5.1.4).

Modus sekvenčního vkládání (Sequential Insert Mode) se aktivuje kliknutím pravého tlačítka myši na požadovanou startovací pozici a volbou příkazu **Sequential Insert Mode** v kontextovém menu cílového displeje.

Zvolená cílová pozice je při aktivaci zvýrazněna bílým kroužkem a přidána na seznam v náhledu tabulky. Hodnota uvedená v kolonce **Pozice** je pak automaticky zkopírována do kolonky **Name** (může však být pozměněna). Textový kurzor se objeví v kolonce identifikačního čísla vzorků (sample **ID**).

ID vzorku lze nyní vložit buď pomocí klávesnice a stisknutí tlačítka **Return** anebo jeho oskenováním z čárového kódu vzorku. Poté, co je **ID** vzorku uloženo, vloží se do náhledu tabulky další následná pozice a kurzor se přesune na políčko pro vložení dalšího **ID**. Momentálně aktivní pozice je na cílovém displeji zvýrazněna modrým čtverečkem.

V modu sekvenčního vkládání je myš stále aktivní. Kliknutím na určitou buňku tabulky se do ní textový kurzor přesune. Následné vložení dat do dalších buněk tabulky lze učinit pomocí klávesnice anebo čtečky čárových kódů.

Jakmile je ukládání údajů o vzorku ukončeno, lze modus sekvenčního vkládání vypnout tím, že příkaz **Sequential Insert Mode** z kontextního menu displeje odstraníme.

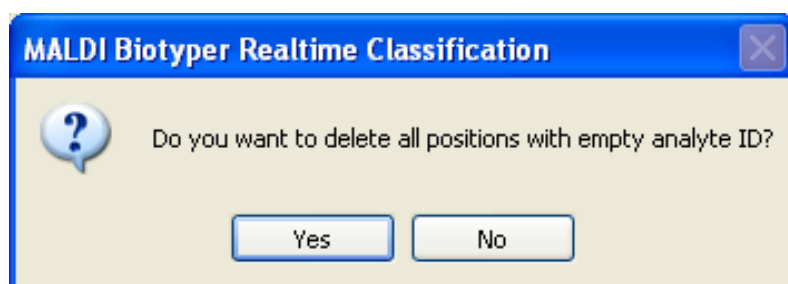
2.5.1.2 Požadavky kladené na kategorii údajů o vzorku

Vlastnosti a jmenná omezení údajů o vzorku vkládaných na stránku **Analyte Placement** jsou uvedeny v Tab. 3-1.

Neobsazená identifikační čísla vzorku (**ID**) v projektu nejsou povolena. Vkládané **ID** musí být uživatelem vytvořeno tak, že se buď napíše, zkopíruje či importuje z určitého externího zdroje dat anebo se načte z čárového kódu.

Jsou-li údaje importovány z XML souboru anebo přeneseny z tabulkového procesoru, dojde v případě neobsazeného **ID** vzorku k tomu, že tento příkaz / vložení nebude fungovat.

Jestliže existují pozice s neobsazenými identifikačními čísly (**ID**) vzorků, dojde v okamžiku, kdy je kliknuto na tlačítko **Next**, k zahájení konfirmačního dialogu.



Tabulka 3-1 Vlastnosti a jmenná omezení kategorií údajů o vzorku

| <u>Kategorie</u> | <u>Povinné/Nepovinné</u> | <u>Charakter omezení</u> | <u>Speciální znaky*</u> |
|------------------------|----------------------------------|--|-------------------------|
| Pozice | Povinné | Velké písemno následované jednomístnou anebo dvomístnou číslicí (např. A3, D11 atd.) | Nepoužito |
| Čip | Povinné | 0 nebo 1 ¹ | Nepoužito |
| Datum vytvoření | Povinné (přidává se automaticky) | Nepoužito | Nepoužito |
| Jméno | Nepovinné (doporučeno) | 50 | Ne |
| ID | Povinné | 50 | Ne |
| Popis | Nepovinné | 50 | Ano |

* Ke speciálním znakům patří ty, které v zázvech souborů nejsou povoleny (\\:*?<>|)

¹Ty MALDI terčičky které žádnou substrukturu nemají, jsou výrobcem definovány jako Čip 0; MSP BigAnchorChip™ 96 a MTP BigAnchorChip™ 384 T F charakterizují substrukturu tzv. kalibračních míst na Čipu 1, jež lze použít jako validační pozici.

Povinné a nepovinné údaje

Kolony se záhlavím **Name** a **Description** obsahují nepovinné údaje; doporučujeme však použít nejméně jedno jméno (**Name**) analyzovaného vzorku. V módu sekvenčního ukládání, jsou v případě prázdných názvů (**Names**) do nich automaticky ukládány údaje vložené do kolony **Pozice**.

Omezení počtu znaků

Velikost údajů vkládaných do kolonek **Name**, **ID** a **Description** je omezena počtem 50 znaků. Manuálně nelze vložit více než 50 znaků. Při načítání z čárového kódu budou řetězce údajů vkládaných do kolonek **Name**, **ID** anebo **Description** zkráceny a po 50. znaku již nebudou zobrazeny.

Při importu dat ze souboru XML anebo při jejich přenášení z tabulky dojde také k tomu, že importovaný/přenášený příkaz nebude proveden v tom případě, že délka řetězce **ID** anebo **Name** překročí hranici 50 znaků. V kolonce **Description** bude delší text bez jakéhokoli upozornění zkrácen taktéž na 50 znaků.

Speciální znaky

Speciální znaky a znaky, které v názvech souborů nelze použít (\\:*?<>|), nemohou být použity ani v řetězcích kategorií ID anebo Name. Při manuálním vkládání dat anebo při načítání z čárového kódu jsou tyto speciální znaky bez jakéhokoli upozornění rovněž vypuštěny.

Při importu dat ze souboru XML anebo při jejich kopírování z tabulky nebude importovaný/kopírovaný příkaz proveden v tom případě, že název nebo identifikační číslo (**Name** or **ID**) analytu budou obsahovat některý z výše uvedených speciálních znaků.

2.5.1.3 Přímé vkládání údajů o vzorku

Cílové pozice, k nimž mají být údaje o vzorku přiřazeny, je třeba vybrat na cílovém displeji stránky **Analyte Placement**. Pro zvolené cílové pozice lze údaje o vzorku vložit přímo z klávesnice.

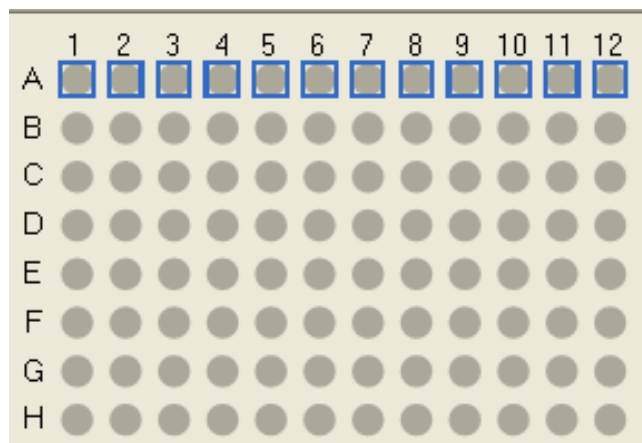
Poznámka: Vkládané údaje musí respektovat omezení týkající se délky řetězce a používání speciálních znaků (viz část 2.5.1.2).

Volba cílové pozice pomocí myši

V následující tabulce je popsán způsob, jenž lze použít při výběru cílových pozic. Modrý čtvereček oznamuje, že určitá pozice byla vybrána.

| <u>Myš</u> | <u>Funkce</u> |
|---|---|
| Kliknutí levým tlačítkem na pozici (např. A5) | Exkluzivní výběr pozice. |
| Kliknutí levým tlačítkem na písmeno řádku (např. A) | Exkluzivní výběr všech pozic v řádku. |
| Kliknutí levým tlačítkem na název sloupce (např. 5) | Exkluzivní výběr všech pozic ve sloupci. |
| Kliknutí levým tlačítkem na rolující text (marquee) a jeho přetažení | Exkluzivní výběr všech pozic v rolujícím textu. |
| Podržení Ctrl + kliknutí levým tlačítkem na určitou pozici | Přidání pozice do výběru. |
| Podržení Ctrl + kliknutí levým tlačítkem na název řádku | Přidání všech pozic v řádku do výběru. |
| Podržení Ctrl + kliknutí levým tlačítkem na název sloupce | Přidání všech pozic ve sloupci do výběru. |
| Podržení Ctrl + kliknutí levým tlačítkem na rolující text a jeho potažení | Přidání všech pozic v obdélníčku řádku do výběru. |
| Kliknutí levým tlačítkem mezi pozice | Zpětný výběr všech pozic. |

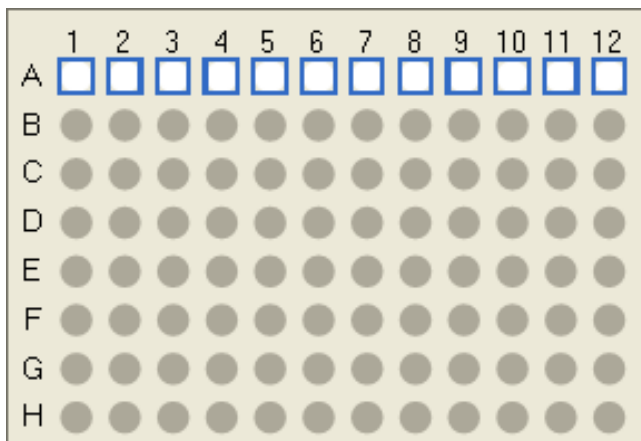
Příklad: Vybrání řádku A kliknutím levého tlačítka myši na **A**.



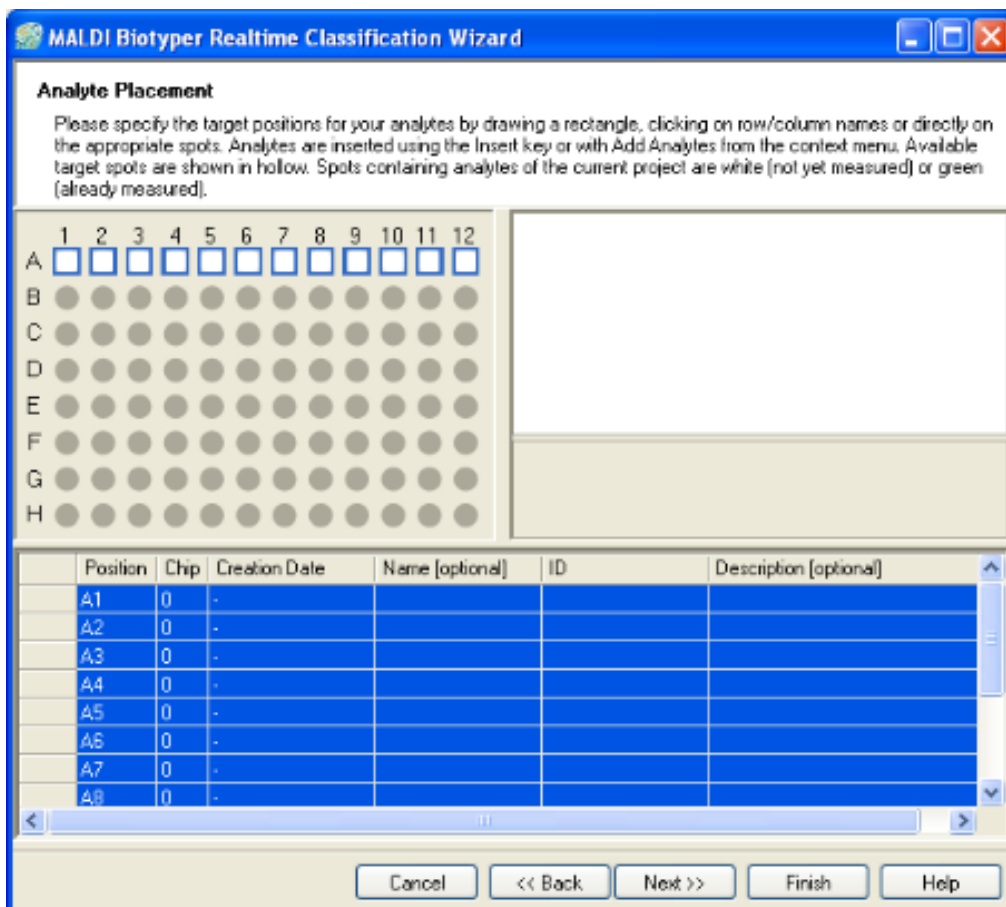
Možnosti přímého vložení údajů o vzorku

- Zvolte příslušné cílové pozice, klikněte pravým tlačítkem na kteroukoli z nich (nacházející se v modrém obdélníčku) a z kontextového menu vyberte příkaz **Add Samples** (přidat vzorky).
- Zvolte cílové pozice a na klávesnici stiskněte tlačítko **Insert** (vložit).

Vybrané cílové pozice jsou aktivními (na cílovém displeji se objeví bílý indikační kroužek).



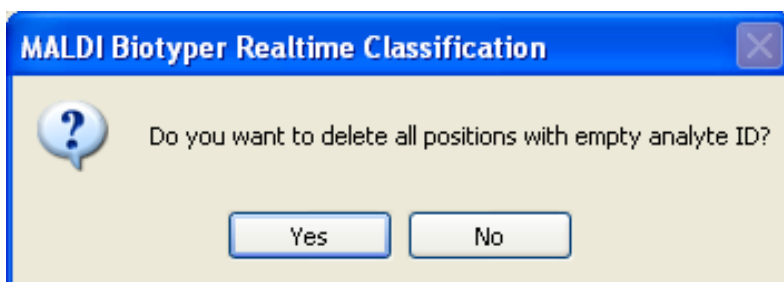
Příkazy **Pozice** a **Chip** jsou u všech aktivovaných cílových pozic automaticky vygenerovány a vloženy do tabulky vzorků. Při uložení projektu do databáze se také automaticky uloží datum jeho vytvoření (**Creation Date**).



2. Požadované identifikátory vzorku přidejte do sloupce **ID**.
3. Do sloupců **Name** a **Description** přidejte všechny potřebné deskriptory (nepovinný údaj).

Obsah tabulky lze zkopírovat a přenést pomocí příkazů **Copy** a **Paste**, které se nacházejí ve sloupcovém záhlaví kontextových menu (tato se zpřístupní kliknutím pravého tlačítka na záhlaví sloupců). Tyto operace probíhají jako standardní procedury programu Microsoft Windows GUI.

4. Jakmile je vkládání dat ukončeno, klikněte na tlačítko **Next**, čímž přejdete na stránku výběru metod programu MALDI Biotyper (**Selection of MALDI Biotyper Methods**).
 - a. Jestliže existují pozice s neobsazenými identifikačními čísly (**ID**) vzorků, dojde v okamžiku, kdy je kliknuto na tlačítko **Next**, k zahájení konfirmačního dialogu.



- b. Kliknutím na tlačítko **Yes** vymažete v prázdném **ID** všechny aktivní pozice projektu a otevřete stránku **Project Summary** (souhrn projektu).
- c. Kliknutím na tlačítko **No** se vrátíte na stránku **Analyte Placement** a poté vložíte chybějící **ID** vzorku.
- d. Jakmile je ukládání dat ukončeno, klikněte na tlačítko **Next** a pokračujte na stránce výběr metod (**Selection of MALDI Biotyper Methods**).

2.5.1.4 Načítání údajů o vzorku z čárových kódů

Údaje o vzorku lze z čárových kódů načíst pomocí čtečky a pracovního modu postupného vkládání dat (Sequential Insert Mode).

Poznámka Vkládané údaje musí respektovat ta omezení, která se týkají délky řetězce a používání speciálních znaků (viz část 2.5.1.2).

Čtečku čárového kódu lze považovat za druhou klávesnici. Každý textový řetězec, který je na klávesnici napsán, může být vložen i naskenováním příslušného čárového kódu.

Standardní aplikace čtečky čárových kódů je určena pro ty vzorky, které potřebují označit svým vlastním (jedinečným) **ID**. Toto označení lze snadno provést při použití sekvenčního modu vkládání (viz část 2.5.1.1), v němž je seznam vzorků vyplňován tak, že se čárové kódy vzorků skenují striktně podle pořadí, v němž byly připraveny.

Chcete-li údaje o vzorcích číst z čárových kódů za použití modu sekvenčního vkládání (Sequential Insert Mode), učiňte následující kroky:

1. Kliknutím levého tlačítka myši zvolte potřebnou výchozí pozici (např. A1) na cílovém displeji pozice vzorku (**Sample Position**).

Tato pozice je nyní označena jako pozice vybraná (výběr indikuje modrý obdélníček).

- Pravým tlačítkem klikněte na vybrané pozice a vyberte v kontextovém menu modus sekvenčního vkládání (**Sequential Insert Mode**).

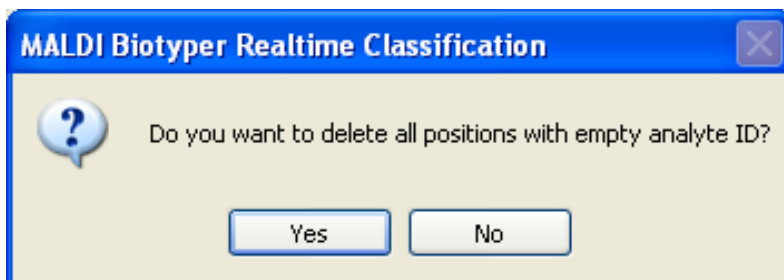
Vybraná cílová pozice je pomocí bílého kroužku označena jako aktivní a je přidána do seznamu, který je zobrazen na náhledu tabulky. Hodnota uvedená v pozičním políčku (**Pozice**) je automaticky zkopírována do políčka jméno (**Name**) (lze ji ale změnit). Textový kurzor se v políčku objeví až pro vložení **ID** vzorku.

- Oskenujte **ID** prvního vzorku pomocí čtečky čárových kódů (používání vzorků s čárovým kódem je velmi výhodné a doporučuje se).

Nejsou-li čárové kódy k dispozici, lze je také oskenovat ze seznamu cílových pozic.

- Pokračujte ve skenování čárových kódů tak dlouho, až jsou vloženy údaje o všech vzorcích.
- Jakmile je ukládání údajů o vzorku ukončeno, klikněte na nabídku **Next**.

Tím se otevře níže uvedený konfirmační dialog. Po oskenování posledního čárového kódu přeskočí kurzor automaticky na ten nový řádek, který má prázdné (neobsazené) **ID** vzorku.



- Abyste přešli na stránku výběru metod (**Selection of MALDI Biotyper Methods**), klikněte na nabídku **Yes**.

2.5.1.5 Kopírování a vkládání dat z tabulkového procesoru

Údaje o vzorku lze kopírovat a vkládat také z tabulkových procesorů, např. z programu Microsoft Excel.

Poznámka Vkládané údaje musí respektovat ta omezení, která se týkají délky řetězce a používání speciálních znaků (viz část 2.5.1.2).

Pro kopírování a vkládání dat z tabulkového procesoru je třeba provést následující kroky:

1. Otevřete vhodný inputový soubor v tabulkovém procesoru.

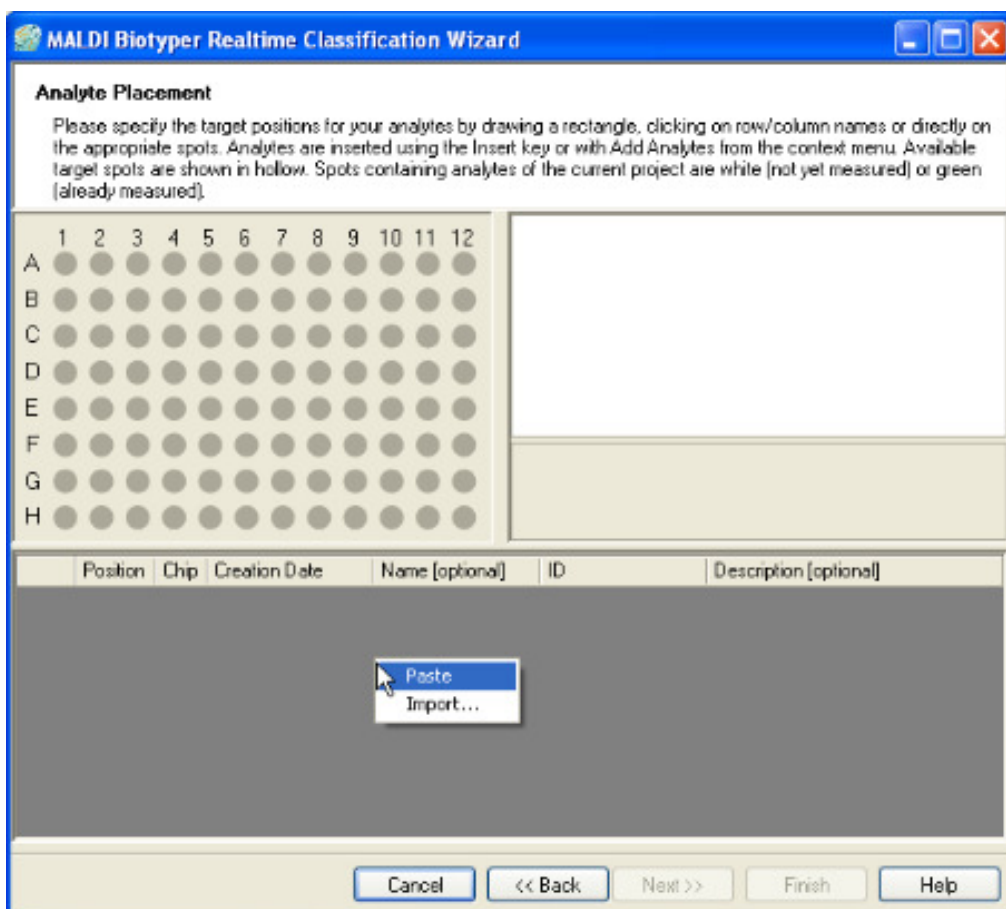
Tento inputový soubor by měl obsahovat potřebné informace v následujícím uspořádání: **Pozice** (pozice - sloupec A), **Chip**² (čip – sloupec B), **Name** (název – sloupec C), **ID** (identifikační číslo – sloupec D) a **Description** (popis – sloupec E). Je-li projekt v běhu, bude datum vytvoření (**Creation Date**) přidáno programem zcela automaticky.

2. Pak vyberte ty buňky, které obsahují údaje o vzorku.

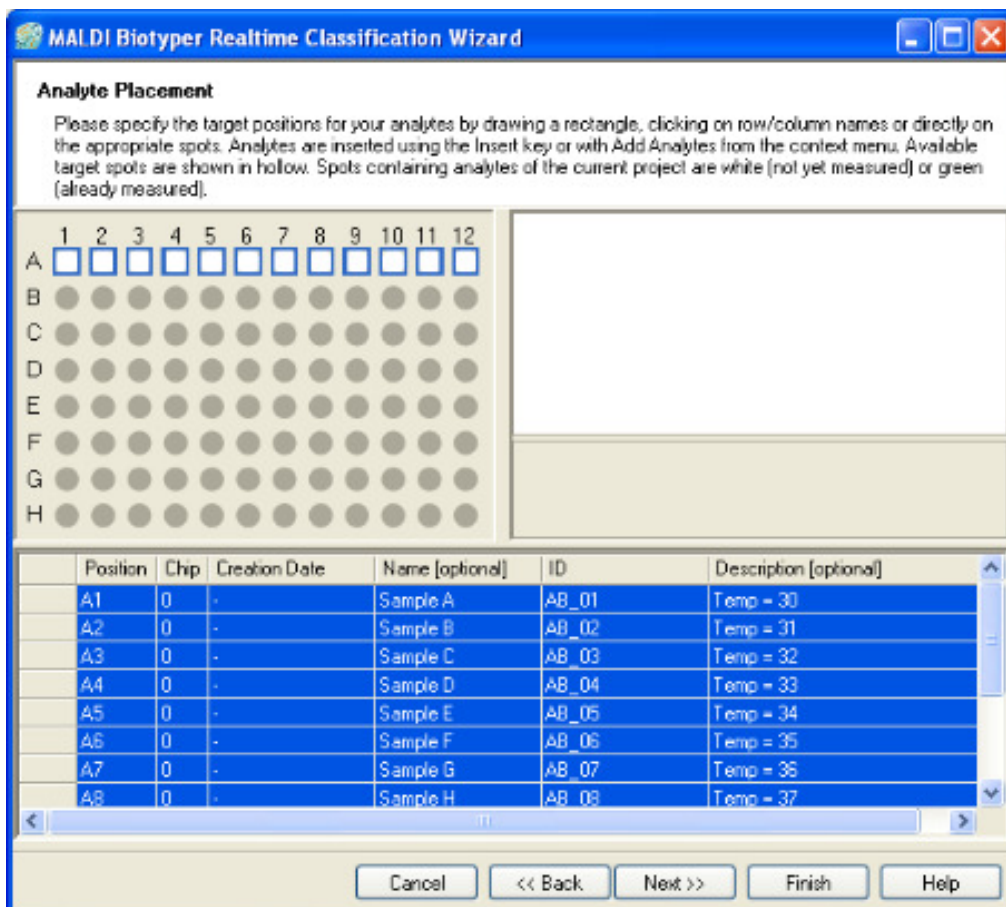
| | A | B | C | D | E | F |
|----|-----|---|----------|-------|-----------|---|
| 1 | A1 | 0 | Sample A | AB_01 | Temp = 30 | |
| 2 | A2 | 0 | Sample B | AB_02 | Temp = 31 | |
| 3 | A3 | 0 | Sample C | AB_03 | Temp = 32 | |
| 4 | A4 | 0 | Sample D | AB_04 | Temp = 33 | |
| 5 | A5 | 0 | Sample E | AB_05 | Temp = 34 | |
| 6 | A6 | 0 | Sample F | AB_06 | Temp = 35 | |
| 7 | A7 | 0 | Sample G | AB_07 | Temp = 36 | |
| 8 | A8 | 0 | Sample H | AB_08 | Temp = 37 | |
| 9 | A9 | 0 | Sample I | AB_09 | Temp = 38 | |
| 10 | A10 | 0 | Sample J | AB_10 | Temp = 39 | |
| 11 | A11 | 0 | Sample K | AB_11 | Temp = 40 | |
| 12 | A12 | 0 | Sample L | AB_12 | Temp = 41 | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |

² Ty MALDI terčíky, které žádnou substrukturu nemají, jsou výrobcem definovány jako Čip 0; MSP BigAnchorChip™ 96 a MTP BigAnchorChip™ 384 T F charakterizují substrukturu tzv. kalibračních míst na Čipu 1a lze je použít jako validační pozici.

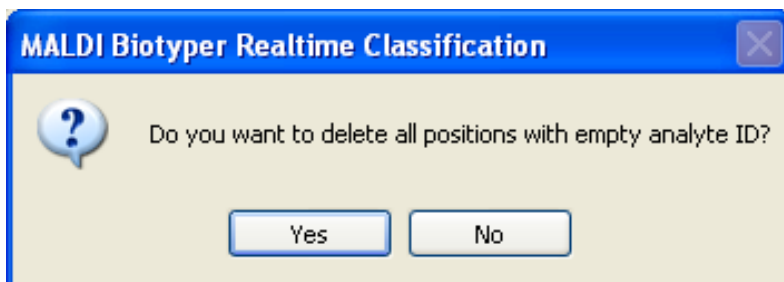
3. Chcete-li vybrané údaje do schránky přidat, stiskněte buď kombinaci tlačítek **Ctrl+C** anebo na vybrané údaje klikněte pravým tlačítkem myši a v kontextovém menu programu schránky zvolte příkaz **Copy**.
4. Na stránce **Analyte Placement** v Průvodci programem, klikněte pravým tlačítkem na náhled prázdné tabulky a v kontextovém menu zvolte příkaz **Paste**; tímto příkazem kopírované údaje do tabulky vložíte.



Vybrané cílové pozice se tak stanou aktivními (na cílové obrazovce budou označeny bílým kroužkem) a údaje o vzorku budou vloženy do zobrazené tabulky.



- a. Jestliže kopírovaná data porušují některá z omezení týkajících se vzorků (viz část 2.5.1.2), objeví se chybové hlášení.
 - b. Klikněte na **Yes** v nabídce dialogu a v tabulkovém procesoru zkontrolujte zda u některých dat nedošlo k nedodržení požadavků (tj. >50 znaků či použití speciálních znaků).
 - c. Chcete-li data opět vložit, opakujte kroky 2 a 3.
5. Jakmile je ukládání dat vzorku ukončeno, klikněte v Průvodci programem na nabídku **Next** a tím postoupíte na stránku volby metod (**Selection of MALDI Biotyper Methods**).
- a. Je-li na aktivních pozicích prázdné identifikační číslo vzorku (empty sample ID), klikněte na tlačítko **Next** a otevře se následující konfirmační dialog.



- b. Kliknutím na nabídku **Yes** vymažete z projektu všechny aktivní pozice s prázdnými **ID** a otevřete stránku **Project Summary**.
- c. Kliknutím na nabídku **No** se vrátíte na stránku **Analyte Placement**. Vymazání stávající definice vzorku provedete tak, že v nabídce kontextového menu na displeji zvolíte příkaz **Clear**.
- d. Zkontrolujte, zda v datech tabulkového procesoru nechybí identifikační čísla vzorků a zopakujte kroky 2 a 3; tím údaje znovu vložíte.
- e. Jakmile je ukládání dat o vzorku ukončeno, klikněte na nabídku **Next**, čímž v Průvodci přejdete na stránku volby metod (**Selection of MALDI Biotyper Methods**).

2.5.1.6 Import údajů o vzorku ze souboru XML

Údaje o vzorku lze ze souboru XML importovat.

Poznámka Vkládané údaje musí respektovat ta omezení, která se týkají délky řetězce a používání speciálních znaků (viz část 2.5.1.2).

Poznámka Postup při importování dat vzorku není stejný jako při vytváření projektu pomocí tlačítka **Import...** v Průvodci (viz část 2.6).

Struktura XML souboru použitého pro import dat

Struktura příslušného XML souboru je velmi jednoduchá.

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8" ?>
- <sequence name="AnalytePlacement" creator="kok" date="2008-09-09T14:03:00+02:00">
  <pos spot="A1" chip="0" samplename="Sample A" sampleidentifier="XY00001-3" description="measured at A1" />
  <pos spot="A2" chip="0" samplename="Sample B" sampleidentifier="XY00002-3" description="measured at A2" />
  <pos spot="A3" chip="0" samplename="Sample C" sampleidentifier="XY00003-3" description="measured at A3" />
  <pos spot="A4" chip="0" samplename="Sample D" sampleidentifier="XY00004-3" description="measured at A4" />
  <pos spot="A5" chip="0" samplename="Sample E" sampleidentifier="XY00005-3" description="measured at A5" />
  <pos spot="A6" chip="0" samplename="Sample F" sampleidentifier="XY00006-3" description="measured at A6" />
  <pos spot="A7" chip="0" samplename="Sample G" sampleidentifier="XY00007-3" description="measured at A7" />
  <pos spot="A8" chip="0" samplename="Sample H" sampleidentifier="XY00008-3" description="measured at A8" />
  <pos spot="A9" chip="0" samplename="Sample I" sampleidentifier="XY00009-3" description="measured at A9" />
  <pos spot="A10" chip="0" samplename="Sample J" sampleidentifier="XY00010-3" description="measured at A10" />
  <pos spot="A11" chip="0" samplename="Sample K" sampleidentifier="XY00011-3" description="measured at A11" />
  <pos spot="A12" chip="0" samplename="Sample L" sampleidentifier="XY00012-3" description="measured at A12" />
</sequence>
```

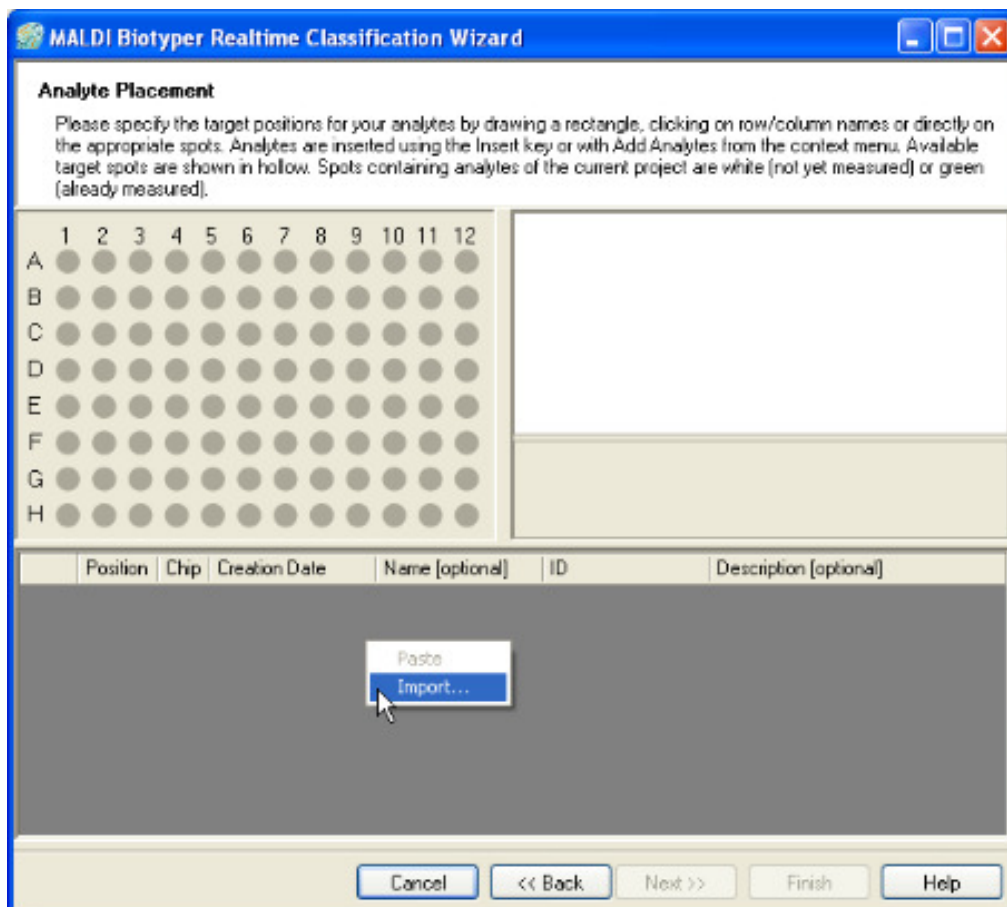
Pro každou připravenou pozici obsahuje **sekvence** kořenového elementu také element dceřinný (child element), který je označen jako **pos**. K definování obsahu sloupců tabulky se používají tzv. atributy (*spot*, *chip*, *samplename* atd.; viz níže).

| <u>Kategorie dat vzorku</u> | <u>XML pos atribut</u> |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Pozice | <i>spot</i> |
| Čip | <i>chip</i> |
| Název | <i>samplename</i> |
| ID | <i>identifikátor vzorku</i> |
| Popis | <i>popis</i> |

Tento způsob importu údajů o pozici vzorku je třeba použít při poloautomatickém pracovním postupu, při němž jsou importované XML soubory vytvářeny externím programem zcela automaticky. Znamená to tedy, že interaktivně jsou prováděny pouze jednotlivé kroky tvorby projektu a selekce XML souboru.

Import údajů o vzorku ze souboru XML

1. Na stánce **Analyte Placement** v Průvodci programem zobrazíte kliknutím na pravé tlačítko myši prázdnou tabulku a v kontextovém menu zvolíte nabídku **Import**.

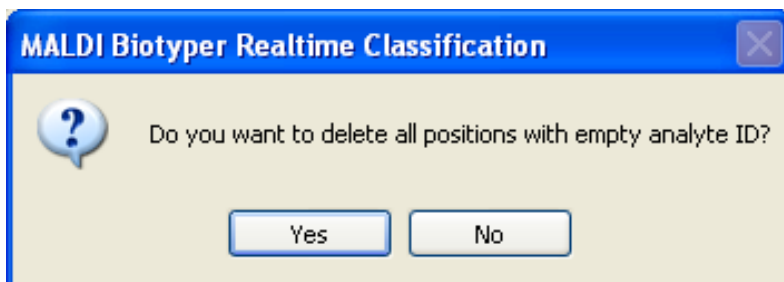


2. V otevřeném dialogu (**Open** dialog) zvolte odpovídající XML soubor a poté klikněte na nabídku **Open**.

Tím jsou importovány údaje o souboru XML a zvolené cílové pozice (selected target pozices) se stanou aktivními (na cílovém displeji budou zvýrazněny bílým indikačním kroužkem).

Nesplňují-li importovaná data ta omezení, která se údajů o vzorku týkají (viz část 2.5.1.2), objeví se chybové hlášení. V dialogu klikněte na nabídku **Yes** a v souboru XML zkontrolujte případné chyby (>50 znaků; použití speciálních znaků). Opakováním kroků 1 a 2 jsou pak data reimportována.

3. Jestliže se na stránce volby metod (**Selection of MALDI Biotyper Methods**).
 - a. nachází po kliknutí na nabídku **Next** na aktivních pozicích prázdné identifikační číslo vzorku (empty sample **ID**), otevře se následující konfirmační dialog.



- b. Kliknutím na nabídku **Yes** budou z projektu vymazány všechny pozice s prázdným **ID** a otevře se stránka **Project Summary**.
- c. Kliknutím na nabídku **No** se vrátíte na stránku **Analyte Placement**; v kontextovém menu cílového displeje pak zvolte nabídku **Clear** a tím vymažete stávající definici vzorku.
- d. Zkontrolujte, zda v souboru XML nechybí identifikační čísla vzorků a zpakováním kroků 1 a 2 proveďte reimport dat.
- e. Jakmile je vkládání údajů o vzorku ukončeno, klikněte na nabídku **Next**, čímž v Průvodci přejdete na stránku volby metod (**Selection of MALDI Biotyper Methods**).

2.5.1.7 Editace údajů o vzorku

Editace obsahu náhledu tabulky

Měnit lze pouze obsah sloupců **Name**, **ID** a **Description**.

Prvním kliknutím myši vyberete text v příslušné buňce tabulky. Vložením jakéhokoli nového textu dojde k přepsání jejího obsahu.

Druhým kliknutím myši navedete kurzor do textu. Na pozici kurzoru pak bude vložen jakýkoli nový text.

Editaci obsahu buňky ukončíte stisknutím tlačítka **Return**. Kurzor přeskočí směrem dolů do další buňky, která se ve vybraném sloupci nachází. Tím je vybrán úplný obsah buňky a vložením jakéhokoli nového textu dojde k přepsání textu stávajícího.

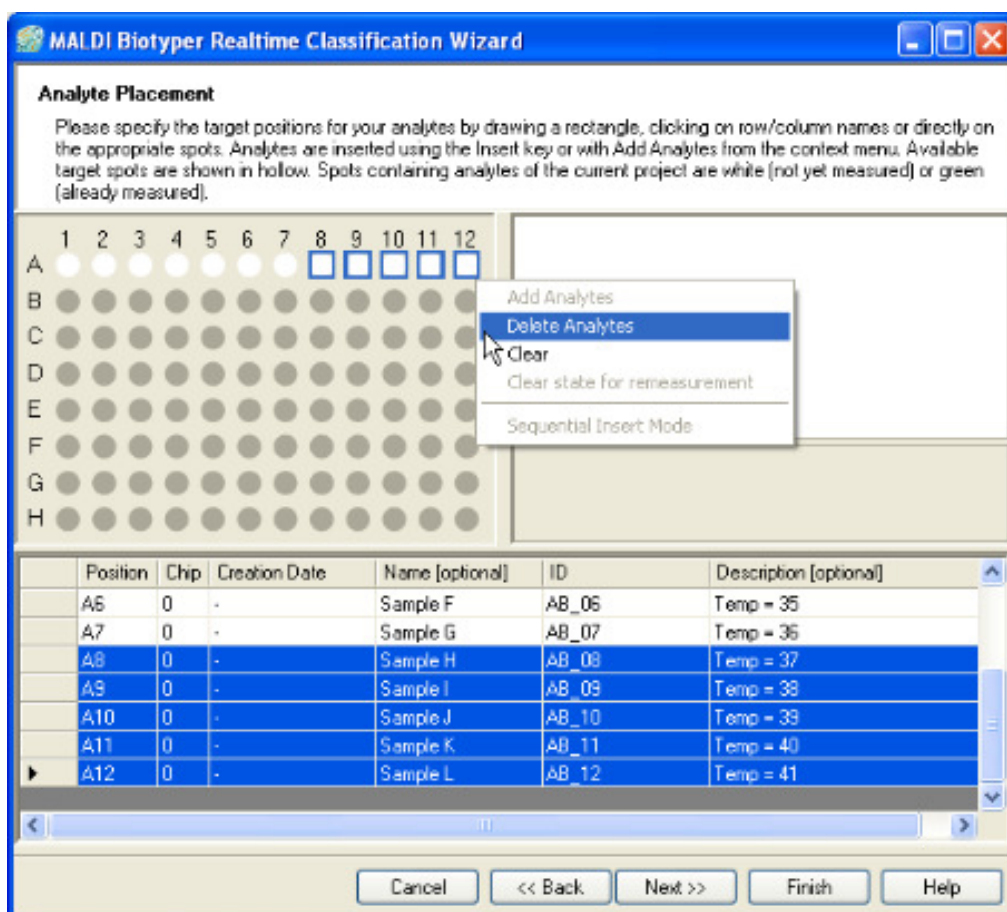
Třídění obsahu tabulky

Tabulky lze třídit podle hodnot, které jsou uvedeny v jednotlivých specifických sloupcích, kliknutím na záhlaví příslušného sloupce. Chcete-li pořadí údajů ve sloupci

uvést obráceně (tj. odshora dolů nebo naopak), klikněte na záhlaví sloupce znovu. Měněný sloupec a způsob třídění je v jeho záhlaví označen symbolem ▼ či ▲.

2.5.1.8 Vymazání údajů o vzorku z cílových pozic

Údaje o vzorku lze vymazat tak, že na cílovém displeji zvolíte data nacházející se na příslušné cílové pozici; pak kliknutím pravého tlačítka myši na nabídku **vymaž analyzované vzorky (Delete Analytes)** tato vybraná data z kontextového menu odstraní.



Poznámka Údaje o vzorku lze vymazat pouze z těch cílových pozic, které nebyly měřeny (zvýrazněno bílým indikačním kroužkem).

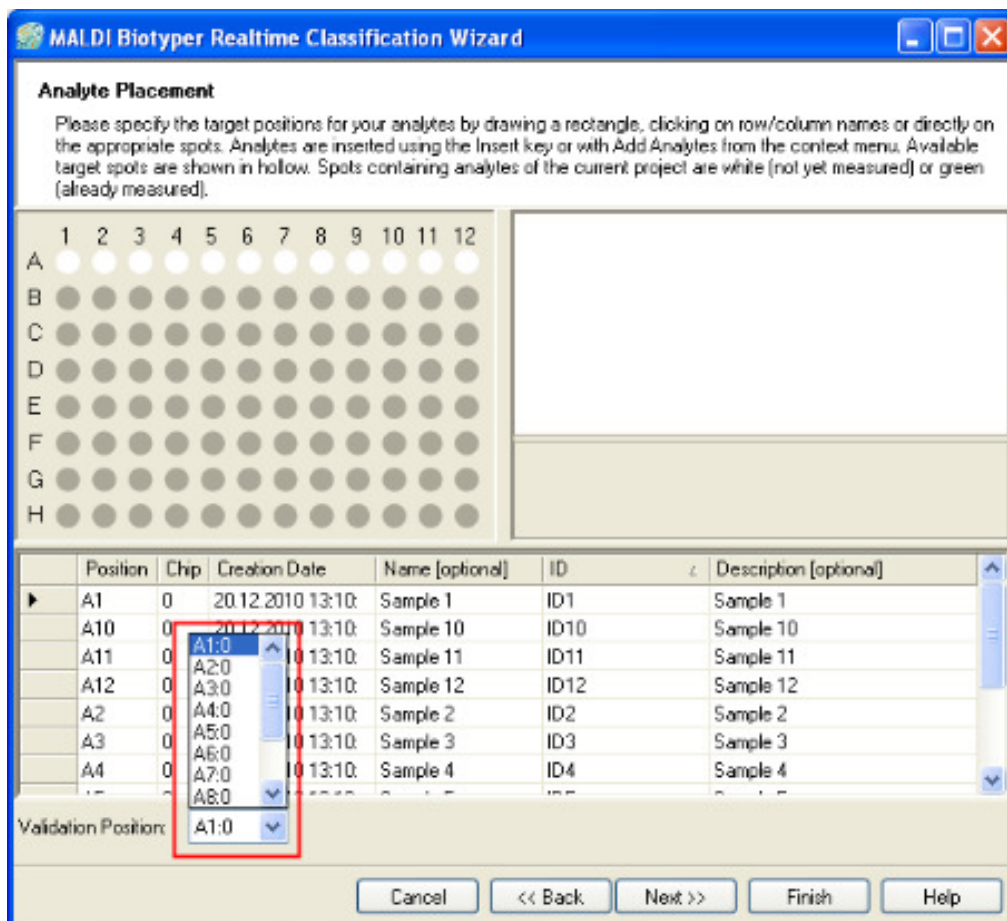
Údaje o vzorku lze vymazat ze všech cílových pozic, a to tak, že kliknete pravým tlačítkem myši na cílový displej a v kontextovém menu zvolíte nabídku **Clear**.

2.5.1.9 Definování validační pozice

Uživatel si může vybrat tu cílovou pozici, na níž bude automatická kalibrace a validační procedura provedena ještě před zahájením klasifikačního procesu.

Kalibrace a validační procedura se provedou na cílové pozici obsahující vzorek standardního bakteriálního testu (Bruker Bacterial Test Standard; Bruker výr. č. #255343). Tento standard je v podstatě preparátem kmene *E. coli* DH5 α , který byl v horním hmotovém rozmezí napíchnut spolu s dvěma dalšími proteiny; tímto opatřením je umožněna kalibrace v hmotovém rozmezí 4 až 17 kDa.

Validační pozici lze také vybrat pohybem směrem dolů přes seznam nabídek **Validation Pozice** na stránce **Analyte Placement**. Volbou příkazu **None** se pak validační krok vynechává. Validační pozice musejí být aktivní (aktivace je zvýrazněna bílým indikačním kroužkem).



Výrobce nastavená validační pozice je stejná jako pozice, která byla použita při posledním klasifikačním procesu. Je-li tato pozice inaktivní, je validační pozice definována jako první aktivní pozice.

Při prvním otevření stránky **Analyte Placement** (tj. v okamžiku, kdy žádná z pozic není aktivní), není v boxu obsahujícím seznam zobrazena žádná pozice a proto ji ani nelze vybrat.

Poznámka Přesvědčte se o tom, že testovací standard (Bruker Bacterial Test Standard) byl připraven v té pozici, v níž bude k validaci použit.

Doporučuje se používat stále tu pozici, která odpovídá validační pozici pro všechny MALDI terčíky (např. A1:0).

Je-li klasifikační běh přerušeno nebo zrušeno ještě před dokončením validace, je třeba validační pozici definovat znovu.

2.6 Vytvoření projektu pomocí tlačítka Import...

Nový klasifikační projekt lze v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC vytvořit kliknutím na tlačítko **Import...** na stránce **Definition of Project** (viz část 2.4).

Tato importní funkce je klávesovou zkratkou sloužící pro vytvoření projektu a pro přidání údajů o vzorku na stránku **Analyte Placement**; tyto údaje jsou importovány pomocí externě vytvořené definice terčíku (označované také jako 'klasifikační zadání - classification job').

V klasifikačním zadání jsou údaje o vzorku definovány v souboru znakově separovaných hodnot (character-separated values - CSV), který je generován buď pomocí nanášecího robota (spotting robot) nebo LIMS.

Poznámka Vytvoření projektu pomocí tlačítka **Import...** v průvodci programem není totožné s importováním údajů o vzorku ze souboru XML na stránce **Analyte Placement** (viz část 2.5.1.6).

2.6.1 CSV (Classification Job) soubory

Minimální soubor klasifikačního zadání (CSV file) musí obsahovat údaj o pozici (**Positions**) vzorku a o jeho odpovídajícím identifikačním čísle (**ID**), jež jsou od sebe odděleny středníkem; každá pozice se nachází na samostatném řádku.

Původně nastavená konfigurace předpokládá, že se pozice vzorku (**Position**) nachází v prvním sloupci a že **ID** vzorku je ve sloupci druhém (pozice terčíku je použita také jako název vzorku - **Sample Name**).

Tak například soubor klasifikačního zadání CSV definujícího identifikační čísla pozic vzorků **ID** A1–A12 určitého terčíku mohou vypadat následovně:

```
A1;XY00001-1
A2;XY00002-1
A3;XY00003-1
A4;XY00004-1
A5;XY00005-1
A6;XY00006-1
A7;XY00007-1
A8;XY00008-1
A9;XY00009-1
A10;XY00010-1
A11;XY00011-1
A12;XY00012-1
```

Doplňující údaje, např. názvy či popisy (**Sample Names** or **Sample Descriptions**) analytu mohou být připojeny ke každému řádku. Každá kategorie přitom musí být oddělena středníkem.

Poznámka: Data musejí odpovídat omezením týkajícím se délky řetězce a používání speciálních znaků (viz část 2.5.1.2).

Pojmenování souboru klasifikačního zadání

Je-li projekt vytvořen pomocí tlačítka **Import...** v průvodci programem, použije se název souboru klasifikačního zadání jako název projektu (**Project Name**). Maximální délka názvu projektu (**Project Name**) činí 50 znaků.

Název souboru klasifikačního zadání má mít příponu “.in”.

Tip Pro pojmenování souborů klasifikačních zadání se doporučuje používat následující schéma: <datum>_<jméno nebo iniciály operátora>_<sekvenční číslo>_<target ID> Syntax: rrrmmdd_ABC_01_01234, např. 20081208_JKB_02_01234.in.

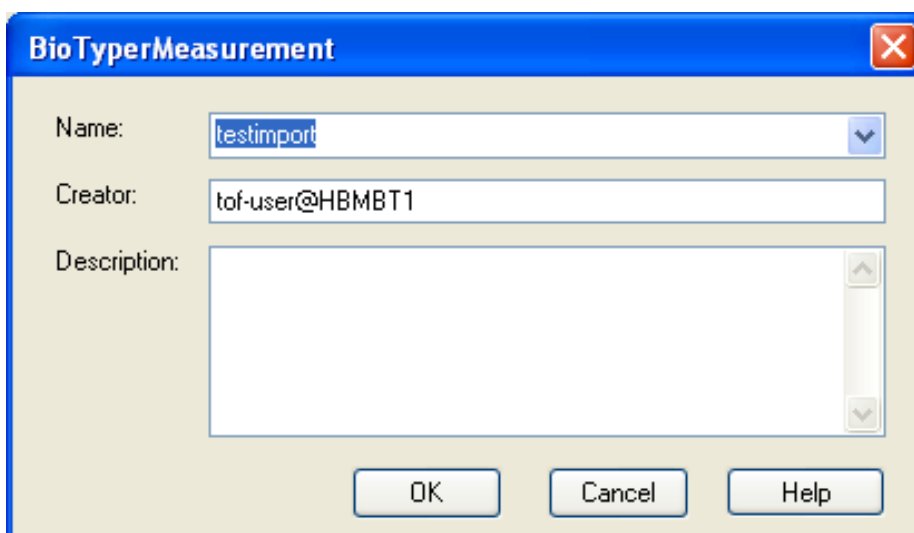
Lokalizace souborů klasifikačních zadání

Soubory klasifikačních zadání“.in” by měly být ukládány do importního adresáře, který je do registru zadán v průběhu instalace softwaru (viz část Příloha D).

2.6.2 Import údajů o vzorku ze souboru CSV

Chcete-li importovat údaje o vzorku ze souboru CSV:

1. Klikněte na okénko **Import...** na stránce definice projektu (**Definition of Project**).
2. V dialogu o importu projektu (**Import Project**) klikněte na tlačítko **drop-down**, které se nachází vpravo od políčka **Name**; tak se zobrazí všechny CSV soubory, které jsou v daném okamžiku v designovaném importním adresáři dostupné (viz část Příloha D).



3. Požadovaný soubor zvolte tak, že na něj prostě kliknete.

Jméno souboru přitom bude použito i jako název projektu (**Project Name**).

4. Identifikátor osoby vytvářející projekt vložte do políčka **Creator**. Tvůrce projektu (**Creator**) je systémem navržen automaticky (jméno uživatele je současně zalogováno do Windows = uživatel), lze jej ale i změnit.

Popis projektu (nepovinný údaj) lze vložit do políčka popis projektu (**Project Description**).

5. Chcete-li se v Průvodci vrátit zpět na stránku definice projektu (**Definition of Project**), klikněte na nabídku **OK**.

Název souboru CSV je pak přidán do políčka název projektu (Project Name) na stránce definice projektu (**Definition of Project**).

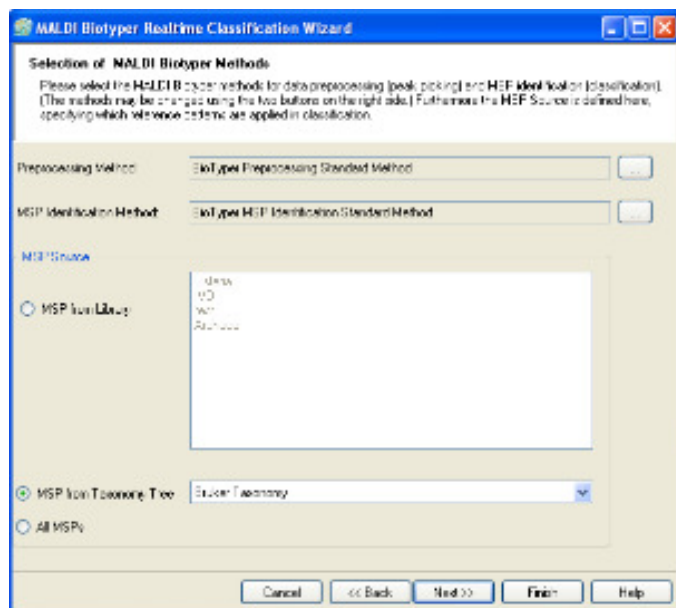
6. Kliknutím na tlačítko **Next** budete importovat data z vybraného souboru CSV a v Průvodci programem postoupíte na stránku **Selection of MALDI Biotyper Methods** (viz část 2.7).

Poznámka: Stránka **Analyte Placement** průvodce je pak automaticky doplněna ze vstupního souboru a nebude už možno do ní vstoupit.

- a. Jestliže soubor CSV obsahuje pozici s prázdným vzorkem anebo neodpovídají-li vstupní údaje příslušným omezením (viz část 2.5.1), objeví se chybové hlášení a projekt nebude importován.
- b. V dialogu klikněte na tlačítko **Yes** a zkontrolujte jak identifikační číslo vzorku, tak také to, zda jsou dodrženy požadavky na formát dat (>50 znaků; používání speciálních znaků).
- c. Chcete-li data reimportovat, zopakujte kroky 1 až 6.

2.7 Definování projektových metod

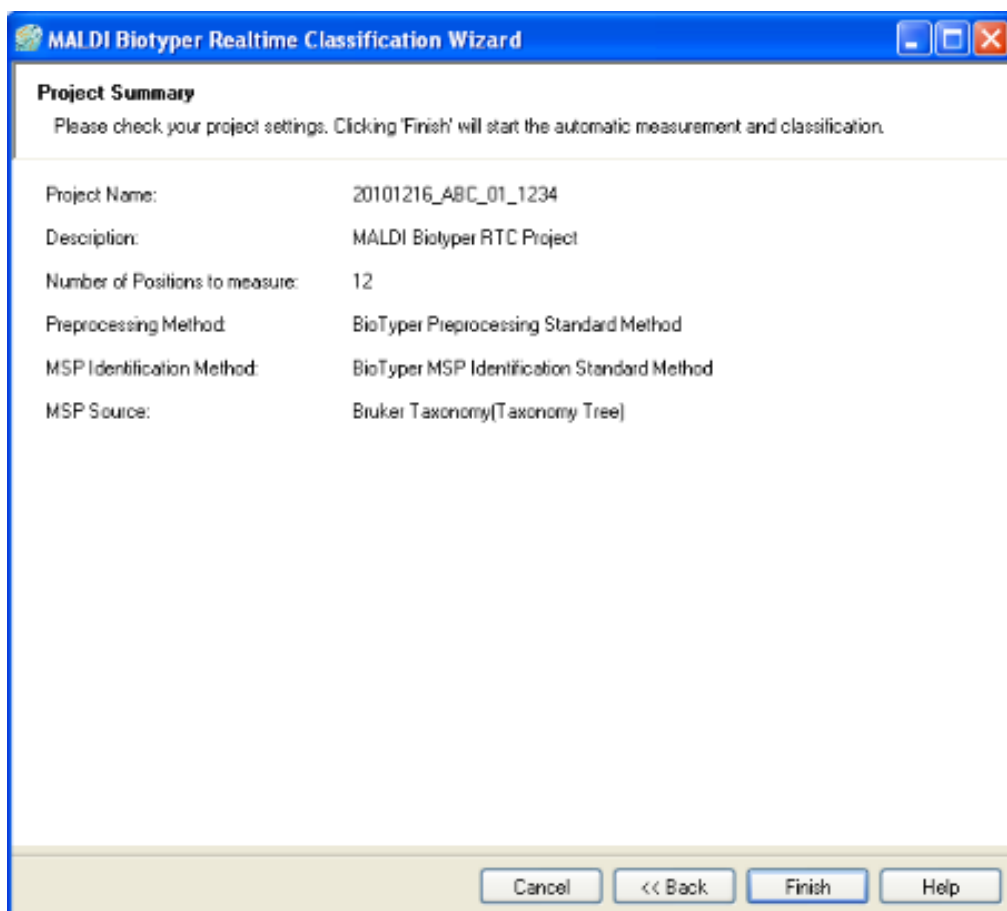
Stránka výběru selekčních metod programu MALDI Biotyper (**Selection of MALDI Biotyper Methods**) se používá k definování podrobností týkajících se procesu klasifikace hlavního spektra (MSP). Obecně lze říci, že tovární nastavení poskytuje uspokojivé výsledky a že tedy lze tuto stránku kliknutím na nabídku **Next** přeskočit a v Průvodci programem pokračovat až na stránce shrnutí projektu (**Project Summary**).



| <u>Inputové políčko</u> | <u>Funkce</u> |
|---|---|
| Metoda předběžné přípravy | Definuje metodu použitou k vytvoření seznamu píků (peak list) na základě hrubých dat. |
| Metoda identifikace MSP | Definuje metodu použitou k porovnání seznamu píků spektra vzorku s referenčními vzory (MSPs) obsaženými v databázi. |
| Zdroj MSP | Definuje ta hlavní spektra, která budou pro klasifikaci použita. |
| <ul style="list-style-type: none"> MSP z knihovny spekter | Vybere ze seznamu jednotlivé požadované knihovny (mnohonásobná selekce je možná po stisknutí klávesy CTRL) |
| <ul style="list-style-type: none"> MSP z taxonomického dendrogramu | Vybere ze seznamu požadovaný taxonomický dendrogram (vybrán ale může být pouze jeden jediný). |
| <ul style="list-style-type: none"> Všechna MSP | Klasifikace je provedena za použití všech dostupných MSP (včetně nepřirazených). |

2.8 Kontrola nastavení projektu

Stránka **Projekt Summary** se používá ke kontrole nastavení momentálního klasifikačního projektu a ke spuštění klasifikačního procesu. Tato stránka poskytuje přehled o hlavních parametrech procesu klasifikace programem MALDI Biotyper.



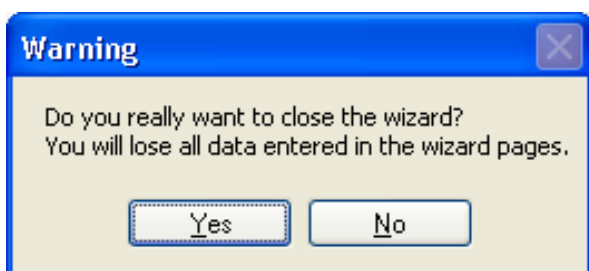
2.9 Zrušení nastavení projektu

Nastavení projektu lze zrušit z kterékoli stránky Průvodce programem MALDI Biotyper RTC.

Chcete-li zrušit nastavení projektu:

1. Klikněte nabídkou **Cancel** na kteroukoli ze stránek Průvodce programem MALDI Biotyper RTC.

Po tomto kliknutí se objeví níže uvedený konfirmační dialog.




- Kliknutím na **No** se vrátíte zpět na stránky Průvodce programem MALDI Biotyper RTC.
- Kliknutím na **Yes** Průvodce uzavřete a vrátíte se do zdrojové aplikace.

Poznámka: Zrušení setupu projektu bude mít za následek ztrátu všech dat do projektu vložených (s výjimkou údajů název projektu, popis projektu a tvůrce projektu **Project Name**, **Project Description** a **Creator**). Projekty, které již byly zrušeny, lze z databáze vymazat (viz část 2.10).

2.10 Vymazávání projektů

Projekty, které již byly zrušeny (viz část 2.9), lze z databáze vymazat. Vymazat ale nelze ty projekty, které již obsahují klasifikační údaje,.

Chcete-li zrušený projekt z databáze vymazat

1. Zvolte buď nabídku **File > New Classification** anebo klikněte na .
2. Přejděte na stránku **Definition of Project**.
3. Požadovaný projekt zvolte buď:
 - a. výběrem jeho názvu (**Project Name**) v sestupném seznamuanebo

- b. kliknutím na nabídku **Open Tree**; pak navigujte na požadovaný projekt a klikněte na **OK**.

Použití nabídky **Open Tree** umožňuje uživateli vyhledávat v projektové databázi řetězce názvů projektů anebo **ID** analyzovaných vzorků. Vyberte příslušný box, vložte vyhledávací filtr a zobrazte ty projekty, jejichž názvy anebo **ID** relevantní řetězce obsahují.

***Tip** K vyhledání řetězce v názvech projektů a ID použijte symbol divoké karty (*). Tak např. použitím vyhledávacího filtru *ABC* budou zobrazeny všechny názvy projektů a ID, které obsahují řetězec ABC.*

4. Kliknutím na **Delete** zvolený projekt z databáze. vymažete

Tlačítko **Delete** je inaktivováno výběrem toho projektu, který obsahuje klasifikační data.

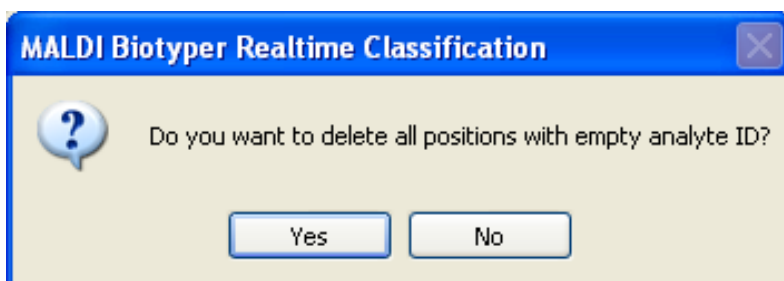
2.11 Spuštění klasifikačního procesu

Klasifikační proces lze spustit z kterékoli stránky Průvodce programem MALDI Biotyper RTC (s výjimkou stránky **Welcome**). Ke spuštění klasifikačního procesu musí existovat přinejmenším jedna cílová pozice s platným **ID**.

Chcete-li klasifikační proces spustit:

1. Klikněte na kterékoli stránce Průvodce programem MALDI Biotyper RTC na tlačítko **Finish** (kromě stránky **Welcome**).

Existují-li při stisknutí tlačítka **Finish** aktivní pozice s prázdným **ID** vzorku, dojde k otevření konfirmačního dialogu



- Kliknutím na nabídku **Yes** vymažete z projektu všechny aktivní pozice s prázdným **ID** a odstartujete klasifikační proces.
- Kliknutím na nabídku **No** se vrátíte na stránku **Analyte Placement** a vložíte chybějící **ID** vzorku.
 - o Jakmile bude ukládání dat ukončeno, klikněte na nabídku **Finish** a odstartujte klasifikační proces.


2.12 Pokračování v přerušném klasifikačním procesu

Klasifikační proces, který byl z nějakého důvodu přerušen (např. manuálním přerušáním anebo výpadkem proudu), lze obnovit opětovným otevřením projektu pomocí Průvodce programem MALDI Biotyper RTC a zahájením procesu nové klasifikace.

Po skončení klasifikačního procesu lze jednotlivé pozice opět změřit (a reklasifikovat).

Po aktivaci se validace automaticky zopakuje pomocí té validační pozice, která byla použita těsně před přerušáním.

Chcete-li v přerušném klasifikačním procesu pokračovat:

1. Zvolte nabídku **File > New Classification** anebo klikněte na .
2. Pak přejděte na stránku **Definition of Project**.
4. Požadovaný projekt zvolte buď:
 - a. výběrem jeho názvu (**Project Name**) v sestupném seznamu
anebo
 - b. kliknutím na nabídku **Open Tree**; pak navigujte na požadovaný projekt a klikněte na **OK**.
Použití nabídky **Open Tree** umožňuje uživateli vyhledávat v projektové databázi řetězce názvů projektů anebo **ID** analyzovaných vzorků. Vyberte příslušný box, vložte vyhledávací filtr a enter a zobrazte ty projekty, jejichž názvy anebo **ID** relevantní řetězce obsahují.

Tip K vyhledání řetězce v názvech projektů a ID použijte symbol divoké karty (*). Tak např. použitím vyhledávacího filtru *ABC* budou zobrazeny všechny názvy projektů a ID, které obsahují řetězec ABC.

4. Kliknutím na nabídku **Next** otevřete v Průvodci stránku **Project Summary** a zkontrolujte nastavení projektu.

Nabídka počet pozic k měření (**Number of Positions to measure**) indikuje počet nezměřených pozic vzorků.


5. Kliknutím na nabídku **Finish** znovu nainiciujete klasifikační proces.

Jakmile je klasifikační proces ukončen, objeví se na obrazovce zpráva o výsledcích klasifikace; tato správa obsahuje výsledky, které byly získány na všech měřených pozicích (tj. jak před přerušením, tak také po něm).

Poznámka Cílový displej a výsledková tabulka v okně MALDI Biotyper Realtime Classification nezobrazí již dříve naměřené a oklasifikované analytové pozice.

Poznámka Ty cílové pozice, které byly v okamžiku přerušeni měřeny, mohou být z klasifikace vypuštěny. Jestliže přerušeni tohoto procesu zabránilo provedení klasifikačního úkolu, musí být pozice příslušného vzorku změřena znovu.

Chcete-li cílové pozice opět změřit:

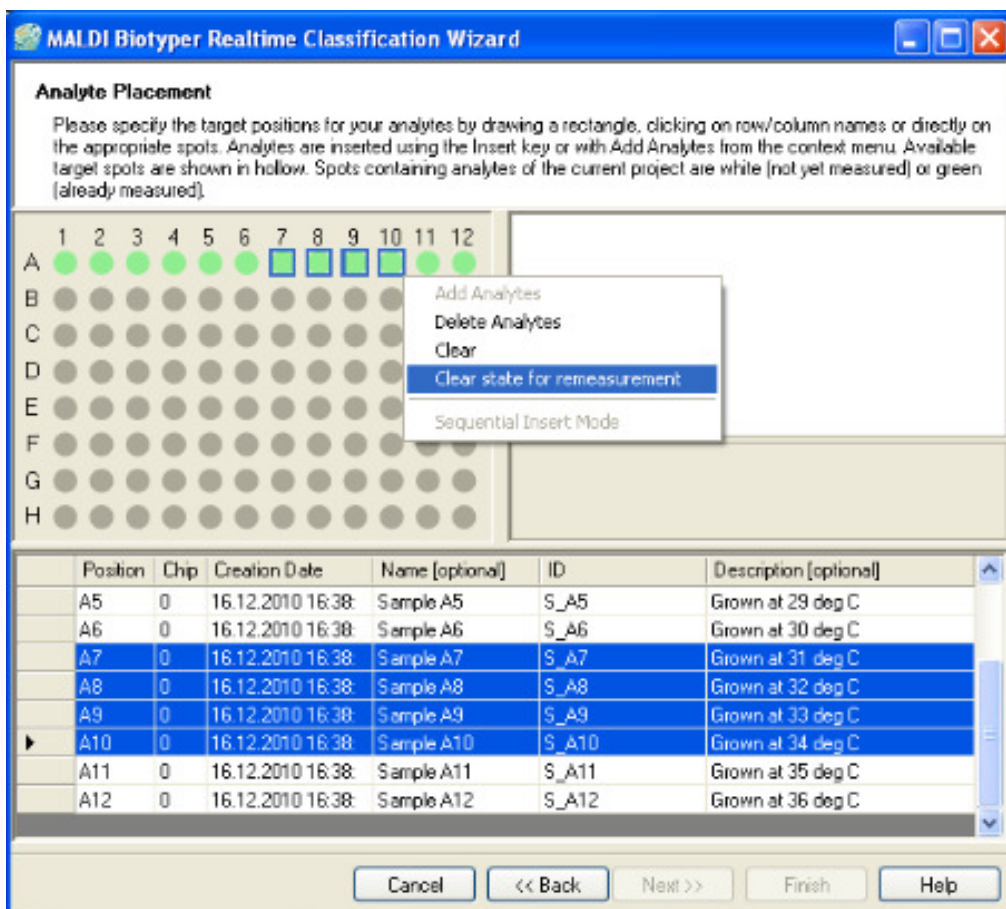
1. Zvolte buď nabídku **File > New Classification** anebo klikněte na .
2. Přejděte na stránku **Definition of Project**.
3. Požadovaný projekt zvolte buď:
 - a. výběrem jeho názvu (**Project Name**) v sestupném seznamu

anebo

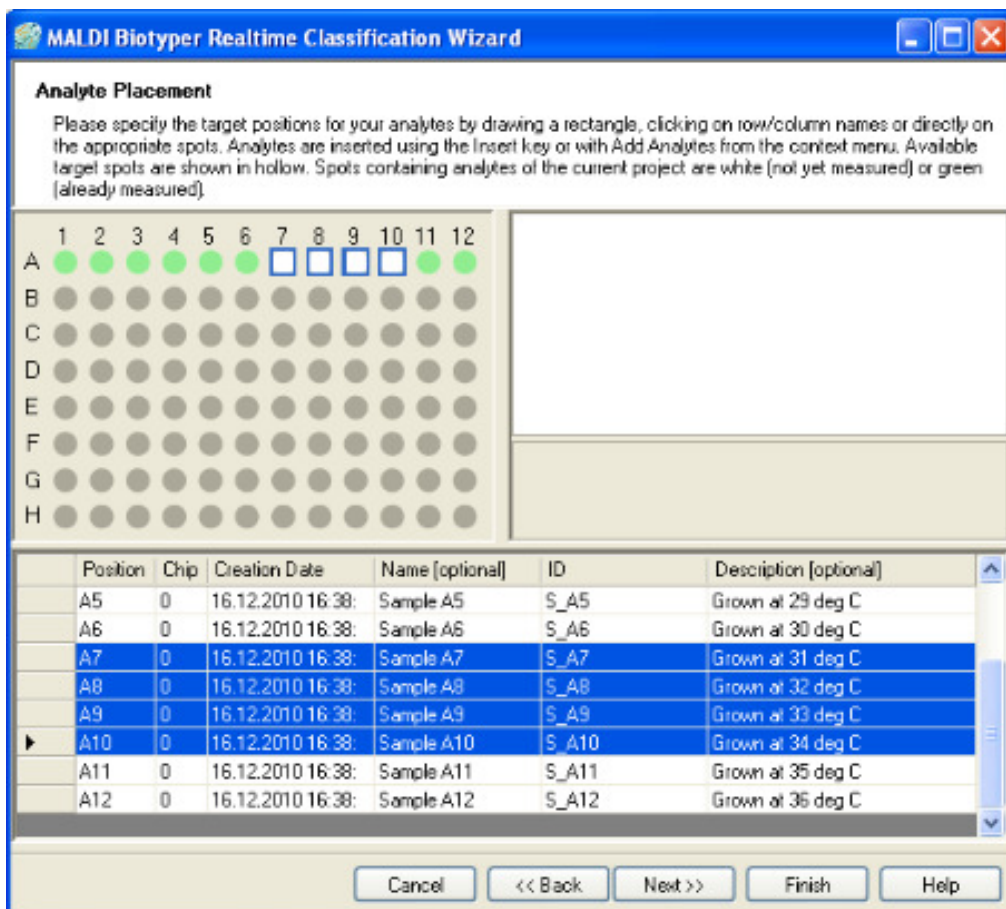
- b. kliknutím na nabídku **Open Tree**; pak navigujte na požadovaný projekt a klikněte na **OK**.
Použití nabídky **Open Tree** umožňuje uživateli vyhledávat v projektové databázi řetězce názvů projektů anebo **ID** analyzovaných vzorků. Vyberte příslušný box, vložte vyhledávací filtr a enter a zobrazte ty projekty, jejichž názvy anebo **ID** relevantní řetězce obsahují.

Tip *K vyhledání řetězce v názvech projektů a ID použijte symbol divoké karty (*). Tak např. použitím vyhledávacího filtru *ABC* budou zobrazeny všechny názvy projektů a ID, které obsahují řetězec ABC.*

- Kliknutím na nabídku **Next** otevřete stránku **Analyte Placement**.
- Zvýraznění požadované cílové pozice (pozic) dosáhnete kliknutím pravého tlačítka myši a výběrem nabídky **Clear state for remeasurement** v kontextovém menu.



Na cílovém displeji změni zvolené pozice svoji barvu ze zelené na bílou.



- Kliknutím na nabídku **Finish** vyvoláte na zvolených cílových pozicích opakované měření a jejich reklasifikaci.

2.13 Pokračování klasifikačního procesu

Klasifikace v reálném čase programem MALDI Biotyper sestává ze dvou kroků, které se provádějí na každé pozici vzorku:

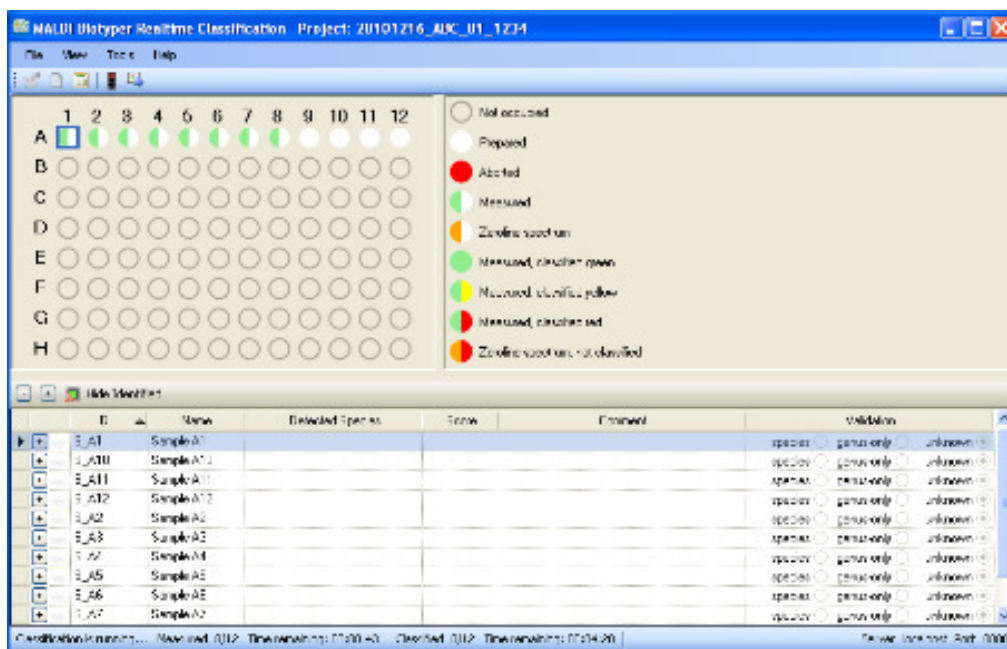
- ze vzorku je získáno hmotové spektrum (krok „měření“);
- výsledné hmotové spektrum je zpracováno a výsledný profil píků je porovnán s referenčními vzorky uloženými v databázi (krok „klasifikace“).

Klasifikační krok je zahájen okamžitě poté, co je související měřicí krok ukončen a co se hmotové spektrum stane opět dostupným.

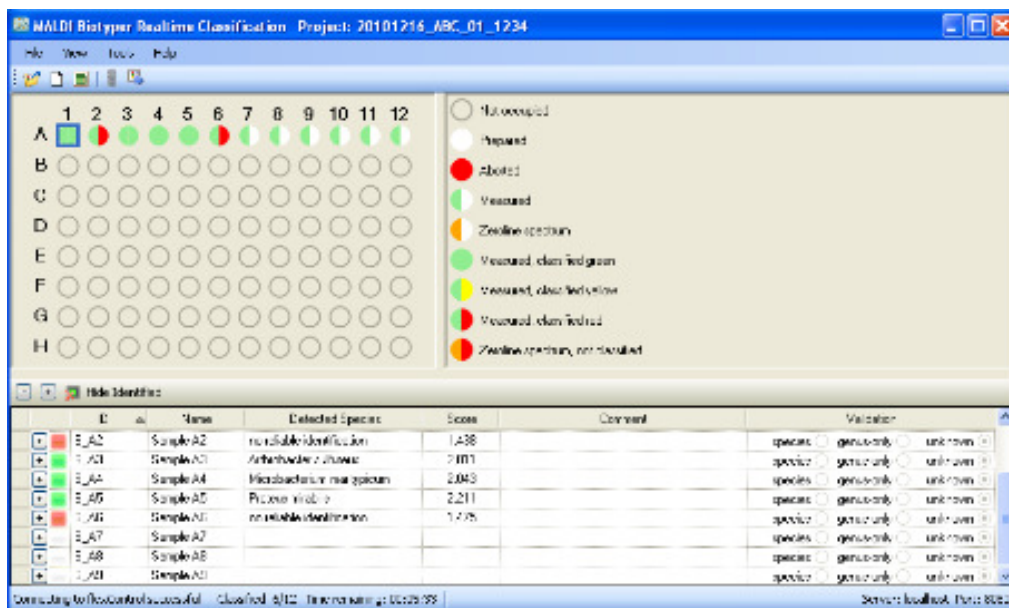
Jakmile je klasifikační proces spuštěn, zobrazí se v okně programu MALDI Biotyper Realtime Classification jako bílé tečky ty pozice vzorků, které budou v rámci stávajícího projektu měřeny.

Klasifikační krok daného vzorku je zahájen okamžitě poté, co je k dispozici hmotové spektrum. Postup měření a klasifikační kroky každého vzorku lze na cílovém displeji sledovat v reálném čase.

Jakmile je měření spektra úspěšně ukončeno, zbarví se levá polovina pozice vzorku dozelena. Jestliže ale měření neskončí úspěšně, zbarví se levá polovina pozice vzorku dooranžova.



Zbarvení pravé poloviny pozice vzorku indikuje bodovou hodnotu (skóre) každé klasifikace (dozelena, dožluta nebo dočervena). Použitý legendový displej zobrazuje barevné kódování a indikuje status vzorků na cílovém displeji.



Jakmile je klasifikace pozice vzorku ukončena, je výsledek příslušné klasifikace vložen do výsledkové tabulky.

Výsledková tabulka (viz část 2.2) okna programu MALDI Biotyper RTC Realtime Classification podává v reálném čase přehled o výsledcích klasifikace u aktivního projektu. Tato tabulka obsahuje pouze nejvíce (nejlépe) se shodující referenční předlohy (šablony) pro každou analyzovanou pozici a je souhrnem kompletní zprávy o výsledcích klasifikace (viz část 2.17).



Klasifikační proces je ukončen v okamžiku, kdy jsou změřeny a oklasifikovány všechny pozice vzorků. Validační nabídky jsou aktivovány podle přiřazených kódů dopravních světél.

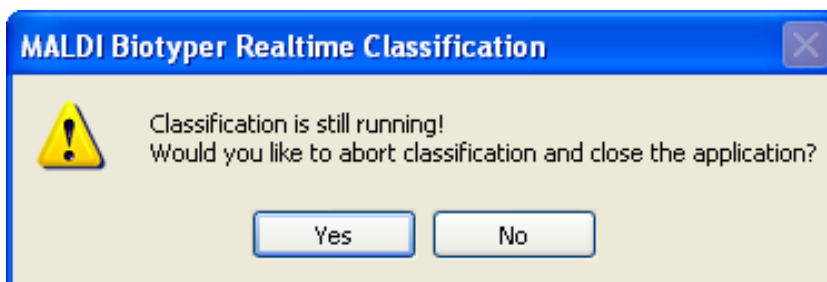
| ID | Name | Classified Species | Score | Comment | Methods |
|-------|------------|----------------------------|-------|---|-------------------------------------|
| S_41 | Sample 41 | Stenobothrus modestus | 2.427 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_410 | Sample 410 | Marthoonea pila | 2.232 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_411 | Sample 411 | no reliable identification | 1.429 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_412 | Sample 412 | Loxobothris coli | 2.435 | closest match to library and to library match | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_42 | Sample 42 | no reliable identification | 1.438 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_43 | Sample 43 | Aethobasus mullatus | 2.111 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_44 | Sample 44 | Stenobothrus modestus | 1.743 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_45 | Sample 45 | Protosia pullis | 2.211 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_46 | Sample 46 | no reliable identification | 1.475 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_47 | Sample 47 | no reliable identification | 1.477 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_48 | Sample 48 | Loxobasius novus | 2.222 | | spec:all gen:all:only link:all:only |
| S_49 | Sample 49 | Stenobothrus modestus | 1.554 | | spec:all gen:all:only link:all:only |

Poznámka Je-li klasifikace v reálném čase spuštěna poprvé po restartování počítače, může generování výsledků klasifikace zabrat určitý čas. Je to způsobeno tím, že jsou referenční předlohy nahrávány z databáze do vyrovnávací paměti.

2.14 Zrušení klasifikačního procesu

Probíhající klasifikaci lze manuálně zrušit:

- Kliknutím na aktivované tlačítko **Abort Classification**  v panelu nástrojů
 - o V tomto případě bude klasifikační proces ukončen bez jakéhokoli upozornění. Okno MALDI Biotyper Realtime Classification zůstává v tomto případě aktivní.
- Kliknutím na tlačítko **Close**  v titulkovém pruhu okna programu MALDI Biotyper Realtime Classification. Tímto způsobem se otevře následující konfirmační dialog:



- o Kliknutím na tlačítko **Yes** klasifikační proces zrušíte a okno MALDI Biotyper Realtime Classification uzavřete. Klasifikační proces pak pokračuje až do stisknutí tlačítka **Yes**.
- o Kliknutím na tlačítko **No** ponecháte klasifikační proces v běhu.

Poznámka Zrušením klasifikačního procesu se sice měření pozic vzorků zastaví, avšak klasifikace měřeného vzorku bude pokračovat. Po zrušení tohoto procesu nedojde k aktualizaci ani cílového displeje ani výsledkové tabulky v okně programu MALDI Biotyper Realtime Classification. Všechny klasifikační výsledky však budou po zrušení v projektu uloženy a lze je shlédnout na základě generování zprávy o výsledcích klasifikace.

Klasifikační proces může být ukončen i neúmyslně, např. v důsledku výpadku elektrického proudu.


Poznámka Dojde-li k neúmyslnému nebo nečekanému přerušení programu MALDI Biotyper RTC, projekt uložte a restartujte proces měření (viz část 2.12).

Tip Velmi vřele doporučujeme používat “nepřerušitelný zdroj energie“ („uninterruptible power supply – UPS , a to jak pro přístroj samotný, tak také pro jeho počítač.

2.15 Natahování/nahrávání již archivovaného projektu

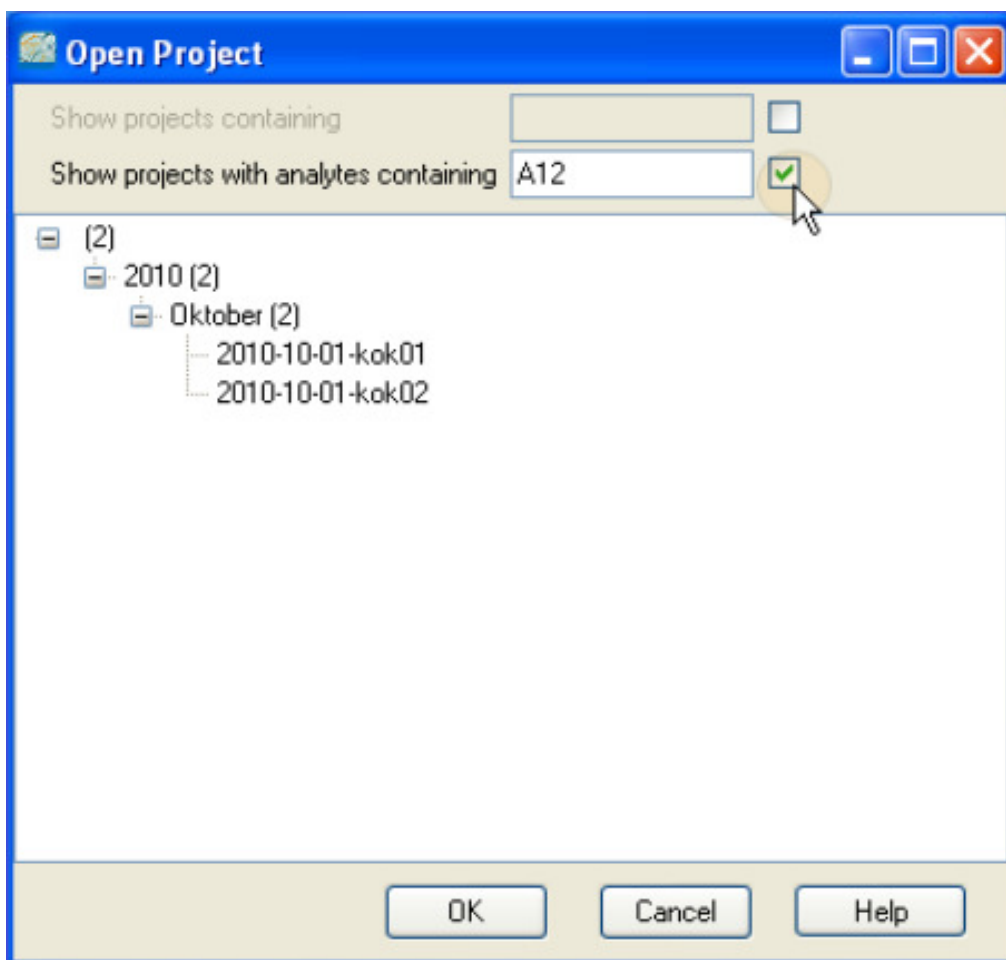
Archivované projekty lze do programu MALDI Biotyper RTC natáhnout zpět a stejně tak lze zobrazit i dosažené výsledky klasifikace (viz část 2.16).

Natažení archivovaného projektu:

1. Zvolte buď nabídku **File > Open Classification** anebo klikněte na .
2. Požadovaný projekt vyberte buď:
 - a. volbou projektu v seznamu **Project Name**.anebo
 - b. klikněte na nabídku **Open Tree**, přejděte na požadovaný projekt a klikněte na nabídku **OK**.

Použití nabídky **Open Tree** umožňuje uživateli vyhledávat v projektové databázi řetězce obsahující název projektu anebo **ID** analyzovaného vzorku. Vyberte příslušný box a vložte vyhledávací filtr, který vám umožní zobrazit ty projekty nebo analyzované vzorky, v jejichž názvu se relevantní řetězec vyskytuje.


Tip K vyhledání řetězce v názvech projektů a ID použijte symbol divoké karty (*). Tak např. použitím vyhledávacího filtru *ABC* budou zobrazeny všechny názvy projektů a ID, jež řetězec ABC obsahují.



2.16 Zobrazení výsledků klasifikace



Výsledky klasifikace lze nalézt ve výsledkové tabulce programu MALDI Biotyper RTC (viz část 2.2). Nejvíce odpovídající organismy (nebo 'nespolehlivou identifikaci') lze nalézt ve sloupci zjištěné druhy (**Detected Species**).

Rozšíření a kolabování seznamu výsledků

Chcete-li u individuálních vzorků zobrazit největší míru shody, klikněte v příslušném řádku vzorku na tlačítko  .


| Hide Identified | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------------|--|-------|----------------------------|-------|------------|------------------|------|---------|-------|---------------------------------------|-----------------------|--|-------|---------------------------------|-----------------------|--|-------|--|------------------------|--|-------|--|------------------------|--|-------|---|------------------------|--|-------|--|------------------------|--|-------|--------------------------------------|------------------------|--|-------|-----------------------------------|-----------------------|--|-------|----------------------------------|---------------------|--|-------|------------------------------------|---------------------|--|-------|
| | Position | Chip | ID | Detected Species | Score | Name | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A1 | 0 | S_A1 | Acidophilum acidophilum | 2,467 | Sample A1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A10 | 0 | S_A10 | Xanthomonas pisi | 2,252 | Sample A10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A11 | 0 | S_A11 | no reliable identification | 1,499 | Sample A11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A12 | 0 | S_A12 | Escherichia coli | 2,424 | Sample A12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A2 | 0 | S_A2 | no reliable identification | 1,430 | Sample A2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A3 | 0 | S_A3 | Arthrobacter sulfureus | 2,011 | Sample A3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Detected Species</th> <th>Link</th> <th>Comment</th> <th>Score</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Arthrobacter sulfureus DSM 20167T DSM</td> <td>43666</td> <td></td> <td>2,011</td> </tr> <tr> <td>Arthrobacter sulfureus B571 UFL</td> <td>43666</td> <td></td> <td>1,835</td> </tr> <tr> <td>Arthrobacter psychrophilicus DSM 15...</td> <td>257454</td> <td></td> <td>1,590</td> </tr> <tr> <td>Arthrobacter ordleyensis DSM 17432T D...</td> <td>225894</td> <td></td> <td>1,158</td> </tr> <tr> <td>Arthrobacter karguelensis DSM 15797T...</td> <td>254738</td> <td></td> <td>1,147</td> </tr> <tr> <td>Arthrobacter gangotriensis DSM 15796T...</td> <td>254737</td> <td></td> <td>1,063</td> </tr> <tr> <td>Arthrobacter ruscicus DSM 14555T DSM</td> <td>172040</td> <td></td> <td>1,070</td> </tr> <tr> <td>Pandoraea promerusa LMG 18817 HAM</td> <td>93220</td> <td></td> <td>1,068</td> </tr> <tr> <td>Providencia rettgeri 20837_2 CHB</td> <td>587</td> <td></td> <td>1,051</td> </tr> <tr> <td>Aeromonas hydrophila CECT B39T DSM</td> <td>644</td> <td>Species of this genus have very simil...</td> <td>1,091</td> </tr> </tbody> </table> | | | | | | | Detected Species | Link | Comment | Score | Arthrobacter sulfureus DSM 20167T DSM | 43666 | | 2,011 | Arthrobacter sulfureus B571 UFL | 43666 | | 1,835 | Arthrobacter psychrophilicus DSM 15... | 257454 | | 1,590 | Arthrobacter ordleyensis DSM 17432T D... | 225894 | | 1,158 | Arthrobacter karguelensis DSM 15797T... | 254738 | | 1,147 | Arthrobacter gangotriensis DSM 15796T... | 254737 | | 1,063 | Arthrobacter ruscicus DSM 14555T DSM | 172040 | | 1,070 | Pandoraea promerusa LMG 18817 HAM | 93220 | | 1,068 | Providencia rettgeri 20837_2 CHB | 587 | | 1,051 | Aeromonas hydrophila CECT B39T DSM | 644 | Species of this genus have very simil... | 1,091 |
| Detected Species | Link | Comment | Score | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter sulfureus DSM 20167T DSM | 43666 | | 2,011 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter sulfureus B571 UFL | 43666 | | 1,835 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter psychrophilicus DSM 15... | 257454 | | 1,590 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter ordleyensis DSM 17432T D... | 225894 | | 1,158 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter karguelensis DSM 15797T... | 254738 | | 1,147 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter gangotriensis DSM 15796T... | 254737 | | 1,063 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arthrobacter ruscicus DSM 14555T DSM | 172040 | | 1,070 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pandoraea promerusa LMG 18817 HAM | 93220 | | 1,068 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Providencia rettgeri 20837_2 CHB | 587 | | 1,051 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aeromonas hydrophila CECT B39T DSM | 644 | Species of this genus have very simil... | 1,091 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A4 | 0 | S_A4 | Microbacterium maritimum | 2,043 | Sample A4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | A5 | 0 | S_A5 | Proteus mirabilis | 2,211 | Sample A5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Kliknutím na tlačítko  seznam zkolabuje (collapse).

Chcete-li zobrazit u všech klasifikací projektu největší míru shody, klikněte v panelu nástrojů výsledkové tabulky na tlačítko . Chcete-li seznam zavřít, klikněte v panelu nástrojů na tlačítko .

Kliknutím na tlačítko  Hide Identified skryjete ve sloupci **Validation** všechny výsledky klasifikace definované jako druhově konzistentní.

| Show Identified | | | | |
|-----------------|----------|------|-------|------------------------------|
| | Position | Chip | ID | Detected Species |
| + | A11 | 0 | S_A11 | no reliable identification |
| + | A2 | 0 | S_A2 | no reliable identification |
| + | A6 | 0 | S_A6 | no reliable identification |
| + | A7 | 0 | S_A7 | no reliable identification |
| + | A9 | 0 | S_A9 | Methylobacterium rhodesianum |

Chcete-li znovu zobrazit zeleně zbarvené klasifikace, klikněte v panelu nástrojů na tlačítko .

| | Position | Chip | ID | Detected Species |
|--|----------|------|-------|------------------------------|
| | A1 | 0 | S_A1 | Acidophilum acidophilum |
| | A10 | 0 | S_A10 | Xanthomonas pisi |
| | A11 | 0 | S_A11 | no reliable identification |
| | A12 | 0 | S_A12 | Escherichia coli |
| | A2 | 0 | S_A2 | no reliable identification |
| | A3 | 0 | S_A3 | Arthrobacter sulfureus |
| | A4 | 0 | S_A4 | Microbacterium maritopicum |
| | A5 | 0 | S_A5 | Proteus mirabilis |
| | A6 | 0 | S_A6 | no reliable identification |
| | A7 | 0 | S_A7 | no reliable identification |
| | A8 | 0 | S_A8 | Lactobacillus rossiae |
| | A9 | 0 | S_A9 | Methylobacterium rhodesianum |

Změna validačního stavu klasifikace

Nabídka ve sloupci **Validation** umožňuje uživateli nastavit a uložit každého vzorku jeho klasifikační status.

►► Chcete-li změnit a uložit uživatelem definované validace:

- změňte **validační** status příslušné klasifikace kliknutím na odpovídající nabídku – tj.druh, pouze rod anebo neznámý (**species**, **genus-only** or **unknown**).

| Validation | | | |
|--|----------------------------------|--|--|
| species <input checked="" type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input type="radio"/> | |
| species <input checked="" type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input type="radio"/> | |
| species <input type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input checked="" type="radio"/> | |
| species <input checked="" type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input type="radio"/> | |
| species <input type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input checked="" type="radio"/> | |
| species <input checked="" type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input type="radio"/> | |
| species <input checked="" type="radio"/> | genus-only <input type="radio"/> | unknown <input type="radio"/> | |

Kliknutím na nabídku v panelu nástrojů resetujete **validační** status všech klasifikací v projektu na automaticky generované hodnoty (druhově konzistentní shoda = druh (**species**); rodově konzistentní shoda = pouze rod (**genus-only**); žádná konzistence = neznámý (**unknown**)).

- Kliknutím na nabídku v panelu nástrojů v projektu uložíte **validační** status klasifikace.


2.17 Generování zprávy o výsledcích

Zprávu o výsledcích klasifikace lze vytvořit buď pro aktivní projekt anebo pro projekt archivovaný. Klasifikační zprávy se na lokálním harddisku ukládají jako <projectname>.html následujícím způsobem:

```
C:\Documents and Settings\\Application Data\Bruker  
Daltonik\MALDIBiotyperAutomationControl\HtmpResults
```


Stávající HTML soubor je přepsán po vytvoření každé nové zprávy.

Chcete-li vytvořit zprávu o výsledcích klasifikace u aktivního projektu:

1. Vyberte buď nabídku **View > Results** anebo v hlavním panelu nástrojů klikněte na nabídku .

Zpráva o vytvoření klasifikačních výsledků je v tomto případě okamžitě odeslána do výrobcem nastaveného webového vyhledávače (browseru).

Chcete-li vytvořit zprávu o výsledcích klasifikace u archivovaného projektu:

1. Požadovaný projekt uložte (viz část 2.15).
2. Vyberte buď nabídku **View > Results** anebo v hlavním panelu nástrojů klikněte na nabídku .

Výrobcem nastavený webový browser se po několika sekundách otevře a zprávu zobrazí.

Poznámka: Tlačítko Zobraz výsledky (**View Results**) je aktivováno pouze tehdy, jsou-li ve vybraném projektu obsažena data.

Tisk zprávy o výsledcích klasifikace

Zprávu o výsledcích klasifikace lze z HTML vyhledávače vytisknout pomocí příkazu **File > Print**. Zprávy obsahující velký počet vzorků budou produkovat i velký počet stran. Vytisknutím informací o projektu (**Project Info**) a přehledné tabulky výsledků (**Result Overview**) lze vytvořit vhodný souhrnný přehled dosažených výsledků.

Tip *Symbols bodového hodnocení/skóre (např. **+++**) v **názvu vzorku (Sample Name)** lze použít k rychlému stanovení bodové hodnoty shody pomocí nátisků provedených černobílou tiskárnou.*

Je-li k dispozici i tiskárna barevná, lze webový prohlížeč nastavit tak, aby bylo tištěno barevné pozadí. Ke konverzi HTML zprávy do PDF dokumentu lze použít některou z PDF aplikací (např. 'PDFCreator').

Tip *Tisk na barevné pozadí se v Internet Exploreru přepíná pomocí příkazů **Tools > Internet Options > Advanced > Printing > Print background colours and images check box.***

2.17.1 Struktura zprávy o výsledcích klasifikace

Zpráva o výsledcích klasifikace má několik částí:

- První část zprávy se skládá z:
 - o **Informací o projektu (Project Info)** (viz část 2.17.2),
 - o Tabulky **Přehled výsledků (Result Overview)** (viz část 2.17.3),
 - o **Sledování shody (Matching Hints)** (viz část 2.17.4),
 - o **Významu hodnot skóre (Meaning of Score Values)** (viz část 2.17.5) a
 - o **Významu konzistenčních kategorií (Meaning of Consistency Categories)** (viz část 2.17.6).
- Druhá část zprávy obsahuje pro každý název analyzovaného vzorku, který je uveden v **přehledu výsledků (Result Overview)** samostatný oddíl **Analyte<number>** s detailní klasifikační tabulkou (ranking table) (viz část 2.17.7).

2.17.2 Informace o projektu

Část **Project Info** se nachází přímo pod záhlavím zprávy a obsahuje následující kategorie:

| Kategorie | Poznámka |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Project Name | Název projektu. |
| Project Description | Popis projektu (je-li specifikován) |
| Project Owner | Jméno tvůrce projektu. |

| <u>Kategorie</u> | <u>Poznámka</u> |
|-----------------------------------|--|
| Project Creation Date/Time | Časové určení projektu. |
| Project Analyte Count | Počet analyzovaných vzorků v projektu. |
| Project Type | Typ by měl být označen jako 'Vývoj' ('Development'). |
| Validation | Výsledek validace ('úspěšná' nebo 'neúspěšná') |
| Validation Pozice | Pozice standardu bakteriálního testu (Bruker Bacterial Test Standard). |

2.17.3 Přehledná tabulka výsledků

Tabulka přehledu výsledků (**Result Overview** table) obsahuje seznam dvou nejlepších případů shody, které byly zjištěny u každého z analyzovaných vzorků. Tato tabulka obsahuje následující sloupce:

| <u>Sloupec</u> | <u>Poznámka</u> |
|-------------------------------|---|
| Analyte Name | Název analyzovaného vzorku = údaj Name vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC spolu s přidruženými symboly hodnocení (skóre) a pod tím v závorkách uvedenou konzistenční kategorií. Hyperlink otevírá tabulku (ranking table) specifického zařazení vzorku (viz část 2.17.7). |
| Analyte ID | ID analytu = údaj ID vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC. |
| Organism (best match) | Organismus, jehož referenční hodnocení (reference pattern) má nejvyšší hodnotu skóre. Hyperlinkový údaj indikuje, že u této klasifikace existuje shoda s předlohou (viz část 2.17.4) |
| Score Value | Hodnota skóre nejlepšího výsledku srovnávání. |
| Organism (second best) | Organismus, jehož referenční hodnocení má druhou nejvyšší hodnotu skóre. Hyperlinkový údaj indikuje, že i u této klasifikace shoda |

| <u>Sloupec</u> | <u>Poznámka</u> |
|----------------|---|
| match) | s předlohou existuje (viz část 2.17.4) |
| Score Value | Hodnota skóre druhého nejlepšího výsledku srovnávání. |

Údaje o použitém barevném kódování, hodnotě skóre a o jeho symbolu, jež jsou uvedeny v **přehledu výsledků (Result Overview)**, jsou vysvětleny v kapitole **Meaning of Score Values** (viz část 2.17.5).

Kategorie shody A, B a C jsou vysvětleny v kapitole **Meaning of Consistency Categories** (viz část 2.17.6).


**Bruker Daltonik MALDI Biotyper
Classification Results**

Project Info

Project Name: 3010116_ABC_01_1134
 Project Description:
 Project Owner: kol-eun@EMBL1
 Project Creation Date/Time: 2010-12-16T18:07:51.088
 Project Analysis Count: 12
 Project Type: Development
 Validator: not present
 Validation Position:

Result Overview

| Analyte Name | Analyte ID | Organism (best match) | Score Value | Organism (second best match) | Score Value |
|---------------------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|
| Sample A1 (+++)(A) | S_A1 | <i>Aspergillus acidophanus</i> | 2.825 | not reliable identification | 1.111 |
| Sample A2 (-)(C) | S_A2 | not reliable identification | 1.111 | not reliable identification | 1.111 |
| Sample A3 (++)(A) | S_A3 | <i>Arthrospira salinarum</i> | 2.825 | <i>Arthrospira salinarum</i> | 1.824 |
| Sample A4 (++)(A) | S_A4 | <i>Microbacterium marisnigrum</i> | 2.825 | <i>Microbacterium lipoarcticum</i> | 1.111 |



Je-li zpráva vytvořena v průběhu procesu klasifikace, obsahují ty sloupce se záhlavím **Organism** a **Score Value**, u nichž údaje o analyzovaných vzorcích ještě nebyly zaměřeny anebo klasifikovány, hlášení 'údaj ještě neexistuje' a '< 0' ('not (yet) present' and '<0').

| | | | | | |
|------------------------------------|-----------|-------------------|-----|-------------------|-----|
| Sample K (-)(C) | XY00010-1 | not (yet) present | < 0 | not (yet) present | < 0 |
| Sample L (-)(C) | XY00011-1 | not (yet) present | < 0 | not (yet) present | < 0 |

2.17.4 Shoda výsledků s předlohou

Hlášení o shodě výsledku s referenčním vzorem (profilem) má dvě části (tj. Název referenčního vzoru a příslušnou Poznámku).

Matching Hints

| Matched Pattern | Comment |
|--|--|
| Bacillus atrophaeus DSM 675_DSM | The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material. |
| Escherichia coli ATCC 25922_THL | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli ATCC 25922_CHB | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli ATCC 35218_CHB | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli B421T_DSM 30083_UFL | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli DH5alpha_BRL | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli DSM 30083_HAM | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli ESBL EA RSS 1528T_CHB | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli MB11464-1_CHB | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Escherichia coli Nissl VML | closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment |
| Stenotrophomonas africana CIP 104854_HAM | is a member of Stenotrophomonas maltophilia group |

Tabulka **Matching Hints** obsahuje následující sloupce:

| <u>Sloupec</u> | <u>Poznámka</u> |
|------------------------|---|
| Matched Pattern | Název srovnávaného referenčního vzoru (úplné označení příslušného kmene). |
| Comment | Poznámka, která je pro tento referenční model/šablonu k dispozici (míra shody). |

2.17.5 Význam hodnot skóre

Kapitola **Význam hodnot skóre (Meaning of Score Values)** objasňuje význam barevných kódů, rozmezí hodnot skóre a symboly skórování, jež jsou v **přehledu výsledků (Result Overview)** uvedeny.

Meaning of Score Values

| Range | Description | Symbols | Color |
|-----------------|--|---------|--------|
| 2.300 ... 3.000 | highly probable species identification | (+++) | green |
| 2.000 ... 2.299 | secure genus identification, probable species identification | (++) | green |
| 1.700 ... 1.999 | probable genus identification | (+) | yellow |
| 0.000 ... 1.699 | not reliable identification | (-) | red |

2.17.6 Význam kategorií konzistence

Kapitola **Meaning of Consistency Categories** sumarizuje význam konzistenčních kategorií **A**, **B** a **C**.

Kromě obecné zprávy o výsledcích klasifikace (**Classification Results Report**), lze o každé konzistenční kategorii vygenerovat i zprávy specifické (viz část 2.18)

Meaning of Consistency Categories (A - C)

| Category | Description |
|----------|---|
| A | Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one. |
| B | Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled. |
| C | No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture) |

2.17.7 Tabulky zařazení jednotlivých analytů

Tabulky zařazení jednotlivých analytů (**Analyte-specific ranking tables**) lze zpřístupnit kliknutím na hyperlinkový údaj **Analyte Name**, který se nachází v **přehledu výsledků (Result Overview)**. Tyto přehledné tabulky obsahují 10 nejlepších výsledků uspořádaných v sestupném pořadí podle dosažených hodnot jejich skóre.

| Rank (Quality) | Matched Pattern | Score Value | NCBI Identifier |
|-------------------|--|----------------|------------------------|
| 1 (+++) | <i>Clostridium perfringens</i> B 1968_NCTC 3110_BOG | 2.514 | 1532 |
| 2 (+++) | <i>Clostridium perfringens</i> B 1038_NCTC 4964_BOG | 2.454 | 1532 |
| 3 (+++) | <i>Clostridium perfringens</i> B 1971_ATCC 3626_BOG | 2.335 | 1532 |
| 4 (++) | <i>Clostridium perfringens</i> A 1037_NCTC 8237_BOG | 2.254 | 37763 |
| 5 (++) | <i>Clostridium perfringens</i> D 2150_NCTC 8346_BOG | 2.253 | 107819 |
| 6 (++) | <i>Clostridium perfringens</i> C 1041_NCTC 10720_BOG | 2.11 | 79568 |
| 7 (-) | <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244 HAM | 1.338 | 235 |
| 8 (-) | <i>Listeria grayi marrii</i> DSM 20556 DSM | 1.262 | 1641 |
| 9 (-) | Bacillus atrophaeus DSM 575 DSM | 1.153 | 1452 |
| 10 (-) | <i>Clostridium beijerinckii</i> 1072_ATCC 25752_BOG | 1.136 | 1520 |

Poznámka Podrobnosti o jednotlivých kmenech, jež jsou uvedeny v detailních hodnotících tabulkách, slouží jen pro informaci.

I když jsou identity červeně zvýrazněných výsledků hodnocení (tj. s hodnotou skóre <1,7) v přehledu výsledků (**Result Overview**) potlačeny a nahrazeny údajem 'klasifikace není spolehlivá' ('not reliable classification', jsou v tabulkách hodnocení jednotlivých analyzovaných vzorků uvedeny.

Každá přehledná tabulka hodnocení obsahuje následující informace:


| Kategorie | Poznámka |
|----------------------------|---|
| Analyte Name | Název analyzovaného vzorku (= údaj Name vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC) |
| Analyte Description | Popis analytu (= údaj Description vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC. |
| Analyte ID | ID analytu (= údaj ID vložený na stránku Analyte Placement v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC. |

2.18 Specifické zprávy o kategoriích shody

Program MALDI Biotyper RTC může z archivovaných projektů vygenerovat také Specifické zprávy o kategoriích shody (Consistency category-specific reports). Tyto údaje umožňují uživateli vytvořit i zprávy, které obsahují jen výsledky vyjadřující shodu u jednotlivých druhů (zvýrazněno zeleně, kategorie A), rodů (zvýrazněno žlutě, kategorie B) anebo bez shody (zvýrazněno červeně, kategorie C).

Tyto specifické zprávy obsahují seznam dvou nejlepších výsledků dosažených u jednotlivých analyzovaných vzorků v každé ze zmíněných kategorií (A, B nebo C).

Chcete-li specifické zprávy o jednotlivých kategoriích shody vytvořit:

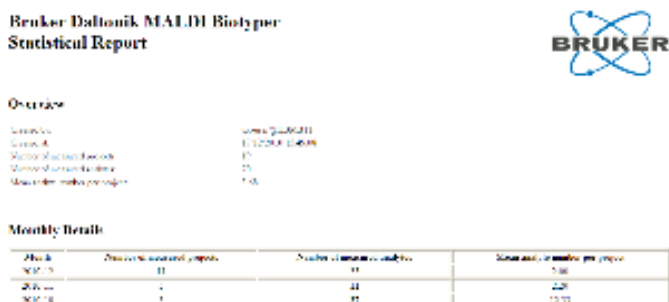
1. Vyberte buď nabídku **File > New Classification** anebo klikněte na .
2. Přejděte na stránku **Definition of Project**.
3. Požadovaný projekt vyberte buď:
 - a. ze sestupného seznamu názvů projektů (**Project Name**).anebo
 - b. klikněte na nabídku **Open Tree**, přejděte na požadovaný projekt a klikněte na **OK**.

Použití nabídky **Open Tree** umožňuje uživateli vyhledávat v databázi projektů ty řetězce, které obsahují buď názvy projektů anebo identifikační čísla jednotlivých analytů. Vyberte si odpovídající box a do něj vložte vyhledávací řetězec; tak zobrazíte ty projekty, v jejichž názvech anebo v identifikačních číslech jednotlivých analytů jsou tyto relevantní řetěze obsaženy.

***Tip** K vyhledání řetězce v názvech projektů a ID použijte symbol divoké karty (*). Tak např. použitím vyhledávacího filtru *ABC* budou zobrazeny všechny názvy projektů a ID, které obsahují řetězec ABC.*
4. Klikněte na nabídku **Options>>** a zprávu pro požadovanou kategorii vytvoříte kliknutím na nabídky **View Results A**, **View Results B** anebo **View Results C**.

2.19 Vytvoření statistické zprávy

Z projektové databáze lze vygenerovat i statistickou zprávu. Tato zpráva obsahuje měsíční přehled o počtu zpracovaných projektů a analytů .



Na lokální harddisk jsou statistické zprávy ukládány pod označením `ProjectStatistics.html` následujícím postupem:

```
C:\Documents and Settings\\Application Data\Bruker  
Daltonik\MALDIBiotyperAutomationControl\HtmpResults
```

Již existující HTML soubor bude při vytvoření každé nové zprávy vždy přepsán.

Chcete-li vytvořit statistickou zprávu:

1. Vyberte nabídku **View > Statistics**.

Vytvořená statistická zpráva pak je okamžitě odeslána do výrobcem nastaveného webového browseru.

Tisk statistické zprávy


Statistickou zprávu lze z HTML browseru vytisknout pomocí příkazu **File > Print**.

3 MALDI Biotyper – Offline klasifikace (OC)

3.1 Spuštění softwaru

Do aplikací Bruker Daltonics může být zalogován vždy jen jeden počítač; momentální uživatel je uveden na stavové liště programu MALDI Biotyper OC.

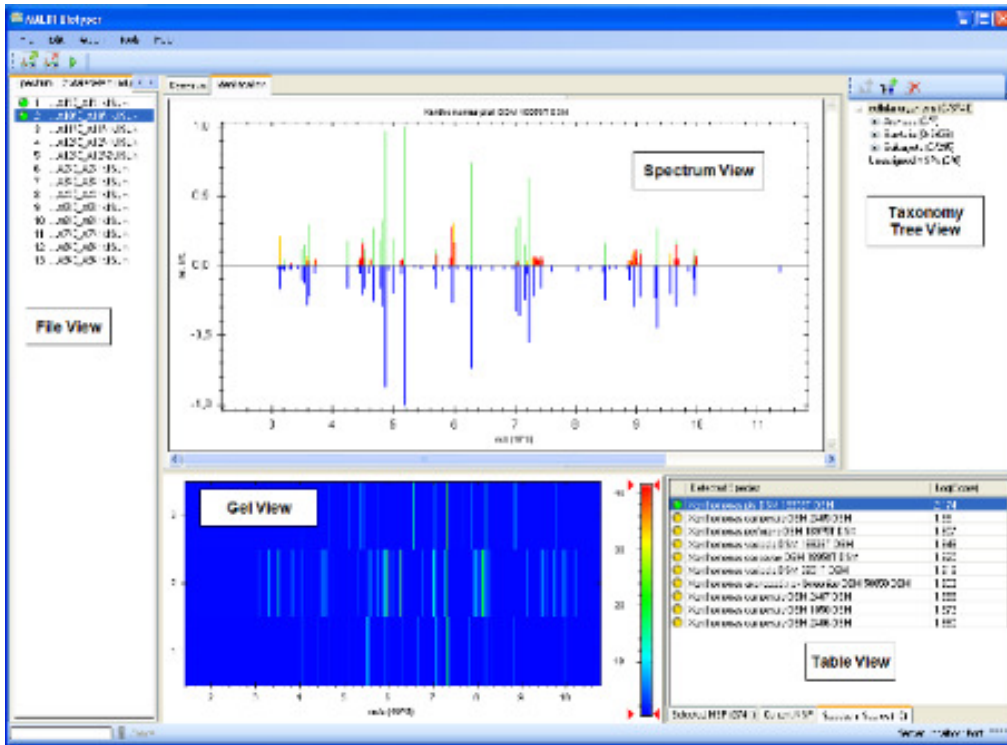
▶▶ Start programu MALDI Biotyper

1. Zvolte nabídku  **Start** > **Programs** > **Bruker Daltonics** > **MALDI Biotyper** anebo dvakrát klikněte na ikonu desktopu.
2. Nebyl-li program MALDI Biotyper OC licencován, vložte do počítače platnou licenci (viz část C.3).

3.2 MALDI Biotyper OC – Uživatelské rozhraní

Uživatelské rozhraní programu MALDI Biotyper OC má pět samostatných částí:

- Náhled souboru (**File View**)
- Náhled spektra (**Spectrum View**)
- Náhled taxonomického dendrogramu (**Taxonomy Tree View**)
- Náhled gelu (**Gel View**)
- Náhled tabulky (**Table View**)



3.2.1 Náhled souboru

Oblast **Náhled souboru** podává přehled uložených hrubých spekter nebo MSA ve dvou samostatných tabulkách:

- Spektrum
- MSP

Po kliknutí se tabulka přesune do popředí náhledu. Momentálně aktivní tabulka má nahoře oranžový proužek (při použití standardních Windows). Spektra anebo MSP jsou číslována a uvedena v tom pořadí, v němž byla do náhledu natažena (vložena).

Náhled souboru se používá k výběru nabídky určitého spektra anebo MSP pro zpracování. V náhledu spektra je zobrazeno poslední vybrané spektrum.

Kliknete-li pravým tlačítkem myši na kteroukoli část tabulek **Spectrum** nebo **MSP**, otevřete kontextové menu. Tabulka hlavních spekter (MSP) obsahuje jako podsoubor příkazy kontextového menu tabulky Spektrum.

3.2.1.1 Náhled souboru kontextového menu

| Příkaz | Funkce |
|---|---|
| Start Identification (Identifikace startu) | Zahajuje klasifikaci neznámého vzorku pomocí jeho spektra/MSP (viz část 3.4) |
| View PCA Dendrogram (Náhled PCA dendrogramu) | Generuje a zobrazuje PCA dendrogram (viz část 3.7.3.2) |
| View PCA Clustering (Náhled PCA klastrování) | Provádí klastrování na spektrech PCA (viz část 3.7.2) |
| Match Composite Correlation Index... | Porovnává neznámý vzorek s CCI matrix (viz část 3.8.3) |
| Create MSP (Vytvoř MSP) | Z vybraných hrubých spekter vytváří referenční spektrum (viz část 3.3.5.1) |
| Create MSP Series (Vytvoř sérii MSP) | Z vybraných hrubých spekter vytváří sérii referenčních spekter (viz část 3.3.5.1) |
| Remove Selected Spectra/MSPs (Odstraň vybraná spektra/MSP) | Odstraňuje vybraná spektra/MSP z náhledu souboru |
| Clear All Spektra/MSPs | Z náhledu souboru vymazává všechna spektra/MSP |

| <u>Příkaz</u> | <u>Funkce</u> |
|---|--|
| (Vymaž všechna spektra/MSP) | |
| Create Report (Vytvoř zprávu) | Vytváří zprávu o výsledcích klasifikace zvolených a oklasifikovaných spekter/MSP (viz část 2.17.1) |
| Properties... (Vlastnosti...) | Zobrazuje vlastnosti souboru spekter (tato funkce je aktivní pouze pro jeden soubor) |
| Show Spektra in Gel View (Zobraz spektra v náhledu gelu) | V náhledu gelu zobrazuje vybraná spektra (viz část 3.2.4) |
| Show Normalized Spektra in Gel View (Zobraz normalizovaná spektra v náhledu gelu) | V náhledu gelu normalizuje a zobrazuje zvolená spektra (viz část 3.2.4) |
| Show Selection in Spektra View (Zobraz výběr v náhledu spekter) | V náhledu spekter zobrazuje vybraná spektra (viz část 3.2.2) |

3.2.2 Náhled spektra

Tato funkce zobrazí hrubá a zpracovaná spektra a přehled píků ve dvou tabulkách. Kliknutím na požadovanou tabulku ji přesunete do popředí náhledu. Při použití standardních Windows má momentálně aktivní tabulka nahoře taktéž oranžový proužek.

Tabulka Spektrum

Tabulka **Spektrum** zobrazuje hodnoty m/z (osa x) proti intenzitě (osa y).

Při zobrazování souborů s jednotlivými spektry mohou být na displeji dvě spektra současně:

- Hrubé spektrum (výrobní nastavení v černé barvě)
- Předběžně zpracované (připravené) spektrum (jeho výrobní nastavení je v barvě modré)

Při zobrazení MSP souborů je zobrazeno spektrum se seznamu píků (jeho výrobní nastavení je černé barvě).

Identifikační tabulka

Tato tabulka zachycuje grafické zobrazení těch výsledků klasifikace, které byly získány porovnáním neznámého vzorku s referenčním MSP. V její horní polovině je zobrazeno normalizované spektrum píků neznámého vzorku a v její dolní části se nachází spektrum píků těch hlavních spekter (MSP), která jsou momentálně vybrána v tabulce obsahující jejich bodové hodnocení v Náhledu tabulky (tyto údaje jsou zobrazeny pomocí barevné stupnice s inverzní intenzitou). Barva každého píku vyjadřuje míru shody s referenčním MSP (zelená = plná shoda, žlutá = částečná shoda, červená = žádná shoda).

3.2.2.1 Změna grafické úpravy náhledu

Kliknutím pravého tlačítka myši otevřete kontextové menu, které lze použít buď ke změně anebo k uložení grafické úpravy náhledu.

| Příkaz | Funkce |
|--|---|
| Peak line width (Tloušťka píkové čáry) | V náhledu nastaví sílu čáry (tenká/střední/silná) |
| Copy (Zkopíruj) | Zkopíruje obsah náhledu do vyrovnávací paměti (clipboardu) |
| Save Image As... (Ulož obrázek jako...) | Uloží obsah náhledu jako grafický soubor (Emf/PNG/Gif/Jpeg/Tiff/Bmp) |
| Page Setup... (Nastavení stránky) | Nastaví vlastnosti stránky pro tisk |
| Print... (Tisk) | Zahájí tiskový dialog |
| Show Point Values (Ukaž bodové hodnocení) | Změní zobrazení koordinát kurzoru v ToolTipu |
| Remove Selected Spectra (Odstraň zvolená spektra) | Odstraní spektra vybraná z náhledu souboru (File View) |
| Un-Zoom (Změň zoom) | Vrátí transfokaci o jeden krok zpět |
| Undo All Zoom/Pan (Zruš všechny zoom akce) | Zruší všechny transfokační (zoom/pan) akce (= resetuje náhled) |
| Set Scale to Default | Použije výrobní nastavení stupnice |

| <u>Příkaz</u> | <u>Funkce</u> |
|--------------------------------------|---------------|
| (Nastav stupnici na výrobní hodnoty) | |

Změna velikosti (transfokace)

Zvětšování a zmenšování velikosti se provádí otáčením středového kolečka myši.

3.2.3 Náhled taxonomického dendrogramu

Funkce Náhled taxonomického dendrogramu zobrazí momentálně zvolený dendrogram, jeho taxonové uzly a hlavní spektra (MSP) přiřazená ke každému uzlu. Dvě číslice za názvem každého nodu jsou jednak číslem MSP, které je k příslušnému uzlu přiřazeno a jednak vyjadřují celkový počet těch MSP, jež jsou přiřazeny jak k příslušnému uzlu, tak také ke všem jeho uzlům podřazeným (subnodes).

Jak dendrogram, tak také počet uzlů lze rozšiřovat či zužovat klikáním na symboly '+' a '-', které se nacházejí před názvy uzlů; druhou možností je použít odpovídající příkaz obsažený v kontextovém menu.

Po kliknutí pravého tlačítka myši do náhledu taxonomického dendrogramu se otevře kontextové menu, které obsahuje následující příkazy.

| <u>Příkaz</u> | <u>Funkce</u> |
|---|---|
| View in Browser (Náhled do browseru) | Otevře tu stránku NCBI databáze taxonů, která odpovídá zvolenému funkčnímu nodu ve standardním browseru (nutné je mít přístup na Internet). |
| Search MSP... (Hledej MSP) | Vyhledá funkční dendrogram pro specifikované MSP. |
| Start Taxonomy Tree Editor... (Spust' editor taxonomického dendrogramu) | Otevře editor taxonomického dendrogramu (MALDI Biotyper Taxonomy Tree Editor). |
| Add to MSP Selection (Přidej do výběru MSP) | Přidá jedno vybrané MSP do tabulky vybraných MSP. |
| Add Hierarchy to MSP Selection (Přidej hierarchii do výběru) | Přidá MSP nacházející se ve vybraném nodu (a také ve všech jeho dceřinných uzlech) do tabulky vybraných MSP. |

| <u>Příkaz</u> | <u>Funkce</u> |
|--|--|
| MSP) | |
| Clear MSP Selection (Vyčisti výběr MSP) | Vyprázdní tabulku vybraných MSP. |
| Add MSPs for Identification (Přidej MSP pro identifikaci) | Přidá vybraná MSP do tabulky náhledu souborů MSP. |
| Add Hierarchy for Identification (Přidej hierarchii pro identifikaci) | Přidá MSP nacházející se ve vybraném nodu (a také ve všech jeho dceřinných uzlech) do tabulky náhledu souborů MSP. |

3.2.4 Náhled gelu

Funkce Náhled gelu zobrazuje pseudogelovou reprezentaci hrubých nebo normalizovaných spekter.

Chcete-li v Náhledu gelu některé spektrum zobrazit:

1. Natáhněte a zvýrazněte požadovaná hrubá spektra v souboru Náhled spekter (viz část 3.3.2).
2. Klikněte pravým tlačítkem na zvýrazněná spektra a zvolte buď nabídku:
 - a. **Show Spectra in Gel View (Zobraz spektra v náhledu gelu)**

ANEBO

 - b. **Show Normalized Spectra in Gel View (Zobraz v náhledu gelu normalizovaná spektra).**

***Tip** K přepínání mezi zobrazením hrubých a normalizovaných spekter použijte zkrácené příkazy **Ctrl+G** a **Ctrl+N**.*

3.2.4.1 Změna vzhledu displeje Náhled gelů

Na ose x jsou zobrazeny hodnoty m/z a na ose y vlevo se nachází číslo příslušného spektra.. Na pravé straně osy y je uvedena intenzita použitých barevných píků, a to podle jejich intenzity v gelu.

Po kliknutí pravým tlačítkem myši do kterékoli části náhledu gelu se otevře kontextové menu, které lze použít buď ke změně vzhledu tohoto náhledu anebo k jeho uložení.

| Příkaz | Funkce |
|--|--|
| Color Scheme (Barevné schéma) | Nastaví typ zobrazení gelu (Oranžová stupnice /Horká mapa /Černá stupnice /Modrá stupnice /Fialová až modrozelená). |
| Invert Background (Invertuj pozadí) | Invertuje barevnou stupnici. |
| Copy (Kopíruj) | Zkopíruje obsah náhledu do vyrovnávací paměti. |
| Save Image As... (Ulož obrázek jako...) | Uloží obsah náhledu jako grafický soubor (Emf/PNG/Gif/Jpeg/Tiff/Bmp). |
| Page Setup... (Nastavení stránky...) | Nastaví rozvržení stránky pro tisk. |
| Print... (Tisk...) | Otevře tiskový dialog. |
| Un-Zoom (Změň zoom) | Vrátí zpět poslední transfokaci (zoom action). |
| Undo All Zoom/Pan (Zruš všechny zoom/pan akce) | Zruší všechny zoom/pan akce (= resetuje náhled). |
| Set Scale to Default (Nastav stupnici na výrobní hodnoty) | Použije výrobní nastavení stupnice. |

3.2.5 Náhled tabulky

Náhled tabulky může obsahovat až šest jednotlivých tabulek. Ne všechny tabulky jsou ale vždy zobrazeny. Číslo za označením tabulky indikuje počet vstupů do příslušné tabulky.

Zvolte nabídku MSP

Tato tabulka obsahuje seznam těch MSP, která lze použít buď ke klasifikaci anebo k vytvoření MSP dendrogramu. Příkazy kontextového menu umožňují buď přidávat, odstraňovat a ukládat MSP do knihovny MSP anebo vytvořit jejich dendrogram. Další příkazy umožňují editaci seznamu MSP píků a metadat.

Aktuální MSP

Tabulka aktuálních MSP přináší informace o těch MSP, jež jsou přiřazena k tomu taxonovému uzlu, který je právě vybrán v náhledu taxonomického dendrogramu.

Skóre spektra

Tabulka Skóre spektra sumarizuje výsledky klasifikace neznámého spektra. Přináší seznam těch MSP, u nichž existuje nejužší shoda se spektrem neznámého vzorku; nejvyšší shoda je přitom uvedena v horní části tohoto seznamu.

Kódování podle dopravních barevných signálů indikuje míru shody (zelená = plná shoda, žlutá = částečná shoda, červená = žádná shoda).

Skóre MSP

Tato tabulka sumarizuje výsledky klasifikace určitého MSP spektra na základě MSP standardu. Obsahuje seznam těch MSP, u nichž existuje nejužší shoda s MSP neznámého vzorku; nejvyšší míra shody je uvedena v horní části tohoto seznamu. Kódování podle dopravních barevných signálů indikuje míru shody (zelená = plná shoda, žlutá = částečná shoda, červená = žádná shoda).

Skóre MSP podsouborů

Tato tabulka sumarizuje výsledky klasifikace neznámého MSP spektra na základě subtypizace MSP. Obsahuje pořadí těch MSP, u nichž je shoda s neznámým MSP největší, přičemž nejvyšší míra shody je uvedena v horní části tohoto seznamu.

Kódování podle dopravních barevných signálů indikuje míru shody (zelená = plná shoda, žlutá = částečná shoda, červená = žádná shoda).

Skóre CCI

Tabulka CCI Scores sumarizuje výsledky klasifikace neznámého spektra na základě použití CCI matrix. Tato tabulka řadí spektra do skupin, jež se vyznačují nejvyšší mírou shody se spektrem neznámého vzorku; nejvyšší míra shody je přitom uvedena v horní části tohoto seznamu.

Kódování podle dopravních barevných signálů indikuje míru shody (zelená = plná shoda, žlutá = částečná shoda, červená = žádná shoda).

3.2.5.1 Zobrazování a skrývání informací obsažených v tabulkách

Po kliknutí se příslušná tabulka přesune do popředí náhledu. Momentálně aktivní tabulka má (při použití standardních Windows) nahoře oranžový proužek.

Tabulky lze třídit podle hodnot uvedených v určitém sloupci tak, že klikneme na jeho záhlaví. Opakovaným kliknutím se zobrazený výsledek třídění změní (buď ve směru shora dolů anebo zdola nahoru). Sloupec a způsob třídění, jež jsou v tomto případě použity, je označen černým trojúhelníčkem, který v se nachází v záhlaví příslušného sloupce (▼ nebo ▲).

Informace zobrazené v každé tabulce lze definovat pomocí sloupce nacházejícího se v záhlaví kontextového menu. Chcete-li sloupec zobrazit anebo skrýt, zvolte anebo vymažte příslušnou nabídku.

Některé sloupce jsou nastaveny již výrobcem a skrýt je nelze.

3.2.5.2 Náhled tabulky kontextových menu











Po kliknutí pravým tlačítkem myši dovnitř náhledu tabulky se otevře kontextové menu. Ne všechny příkazy však jsou v tabulkách dostupné. Některé z nich jsou dostupné pouze po zvýraznění jednotlivých tabulkových údajů (table entries), zatímco u jiných je třeba zvýraznit údajů více.





| <u>Příkaz</u> | <u>Funkce</u> |
|--|--|
| Locate MSP in Taxonomy Tree (Lokalizuj MSP v taxonomickém dendrogramu) | Otevře taxonomický dendrogram v uzlu, který obsahuje zvolené MSP. |
| View MSP Dendrogram (Náhled MSP dendrogramu) | Vytváří dendrogram ze tří nebo více zvýrazněných MSP (viz část 3.6.1). |
| View Sub-Scoring (Náhled skóre podsouborů) | Vytváří tabulku Sub-MSP Scores table for '+'-labelled Výsledky MSP klasifikace (viz část 3.4.4). |
| Remove Selected MSPs (Odstraň zvolené MSP) | Odstraňuje z tabulky zvýrazněná MSP. |
| Clear All MSPs (Vymaž všechna MSP) | Odstraňuje z tabulky všechna MSP. |
| Load MSP Library (Natáhni MSP) | Otevře dialog Load MSP Library (Natáhni knihovnu MSP). |
| Save knihovnu MSP) | Otevře dialog Save MSP Library (Ulož knihovnu MSP). |
| Create Subtyping MSPs (Vytvoř subtypizaci MSP) | Otevře editor MALDI Biotyper Subtyping MSP Editor (viz část 3.3.5.4). |
| Add to MSP Selection (Přidej MSP do výběru) | Přidává zvýrazněná MSP do tabulky vybraných MSP. |
| Add MSPs for Identification (Přidej MSP pro identifikaci) | Přidává zvýrazněná MSP do tabulky Náhledu souboru MSP. |
| View Preprocessing Method (Zobraz metodu přípravy) | Zobrazuje metodu přípravy zvoleného MSP. |
| View MSP Creation Method (Zobraz metodu vytvoření MSP) | Zobrazuje metodu vytvoření zvoleného MSP. |
| View MSP Peak List (Zobraz seznam MSP píků) | Otevře editor seznamu MSP píků (viz část 3.3.5.2) |
| View/Edit MSP Metadata | Otevře editor MSP metadat (viz část 3.3.5.2) |

| <u>Příkaz</u> | <u>Funkce</u> |
|------------------------------|---------------|
| (Zobraz/edituj MSP metadata) | |

3.2.6 Panely nástrojů

Nabídka **Panely nástrojů** obsahuje tlačítka, která nabízejí příkazy umožňující zkrácené provádění jednotlivých operací a procesů. Ve sloupci ToolTips je uveden stručný popis funkce každého tlačítka.

| <u>Toolbar</u> | <u>ToolTip</u> | <u>Funkce</u> |
|---|--|---|
| Main toolbar (Hlavní panel nástrojů) | | |
|  | Přidá spektrum | Otevření okna Spektrum Browser. |
|  | Zavře všechna spektra / Vyčistí MSP pro identifikaci | Zavření všech uložených souborů spekter/MSP. |
|  | Spustí identifikaci | Spustí klasifikaci spektra nebo MSP. |
| Table View toolbar (Náhled tabulkového panelu nástrojů) | | |
|  | Uloží knihovny MSP | Uložení knihovny MSP do externího souboru. |
|  | Uloží knihovny MSP | Uložení knihovny MSP z externího souboru. |
|  | Odstraní vybraná MSP | Odstranění zvýrazněných MSP. |
|  | Odstraní všechna MSP z tabulky výběru | Odstranění všech MSP z tabulky. |
|  | Zobrazí dendrogram MSP | Vytvoření dendrogramu MSP ze zvýrazněných MSP. |
|  | Zobrazí seznam MSP píků | Spuštění editoru seznamu MSP píků. |
|  | Nahrávání | Nahrání zvolených MSP do rychlé vyrovnávací paměti MBT serveru |
| Taxonomy Tree View (Náhled | | |

| taxonomického dendrogramu) | | |
|---|---|---|
|  | Přidá MSP do výběru | Přidání zvýrazněné MSP do tabulky vybraných MSP. |
|  | Vymaže zvolené MSP | Vyčištění zvolené tabulky MSP. |
|  | Přidá hierarchii do vybrané MSP | Přidá MSP do zvoleného nodu a dceřinné nody do tabulky vybraných MSP. |
|  | Spustí editor taxonomického dendrogramu | Otevření editoru taxonomického dendrogramu programu MALDI Biotyper. |

3.2.6.1 Stavová lišta

Stavová lišta v dolní části okna programu MALDI Biotyper poskytuje informace o momentálně probíhajících procesech, nastavení klávesnice, uživateli (v compliance modu) a pozici kurzoru.

3.2.7 Online pomoc

Online pomoc programu MALDI Biotyper poskytuje detailní popis všech softwarových funkcí, všech menu a všech příkazů. Online pomoc se spouští buď pomocí příkazů **Help > Help Topics** anebo stisknutím klávesy **F1**.

Obrázky jsou uloženy jako miniatury. Chcete-li obrázek zvětšit, přejeďte kurzorem po jeho zmenšenině.

3.3 Práce s programem MALDI Biotyper OC

Program MALDI Biotyper může být použit ke:

- klasifikaci neznámých organismů pomocí:
 - o hrubého spektra nebo MSP (viz část 3.4)
 - o matrix CCI (viz část 3.8.3)
- zpřesnění klasifikací úzce příbuzných mikroorganismů pomocí subtypizace MSP (viz část 3.4.4)
- uspořádání spekter charakterizovaných organismů do taxonomických dendrogramů a MSP knihoven (viz část 3.5)
- studiu vztahů mezi mikroorganismy pomocí:
 - o PCA dendrogramů a tabulek skóre a natahování (Scores and Loadings tables) (viz část 3.7)
 - o MSP dendrogramů (viz část 3.6)
 - o CCI matrix (viz část 3.8.1)

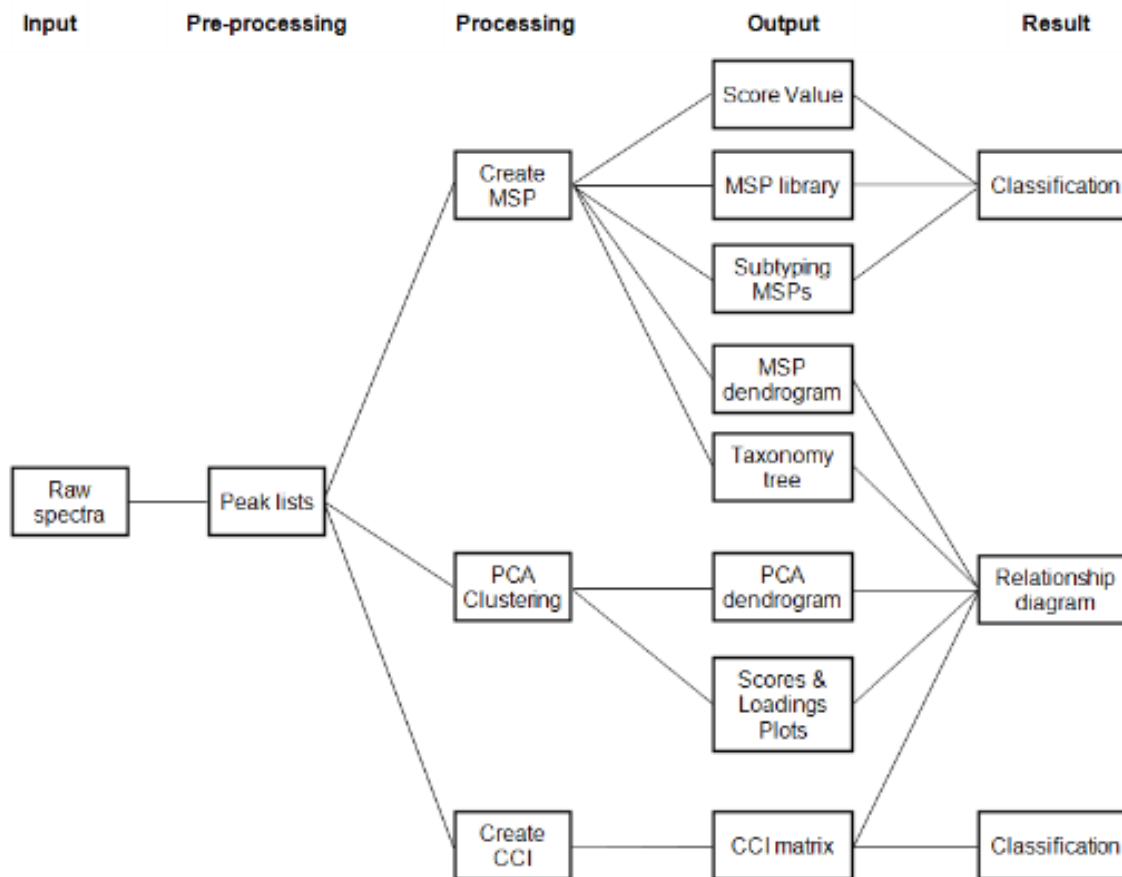
3.3.1 Hrubá spektra a hlavní spektrum (MSP)

Základním vstupem pracovních postupů při užívání programu MALDI Biotyper jsou hrubá spektra, a to buď neznámých anebo již charakterizovaných mikroorganismů. Před zahájením přípravy je třeba tato hrubá spektra vybrat a uložit do programu MALDI Biotyper (viz část 3.3.2)

Metody předběžné přípravy (viz část 3.3.4) slouží ke kontrole transformace hrubých spekter do seznamů píků. Metody dalšího zpracování (viz část 3.3.3) slouží ke kontrole vygenerovaných seznamů píků a algoritmů použitých ke generování výsledků.

Některé z procesů programu MALDI Biotyper potřebují mít hlavní spektra (MSPs) jako východisko. Tato MSP jsou vytvářena z hrubých spekter pomocí standardních metod předběžného zpracování (přípravy) a metod vytváření MSP. Po vytvoření jsou MSP uložena do databáze a dále se s nimi pracuje v tabulkovém náhledu (viz část 3.2.5).

Processing Schema in MALDI Biotyper Offline Classification

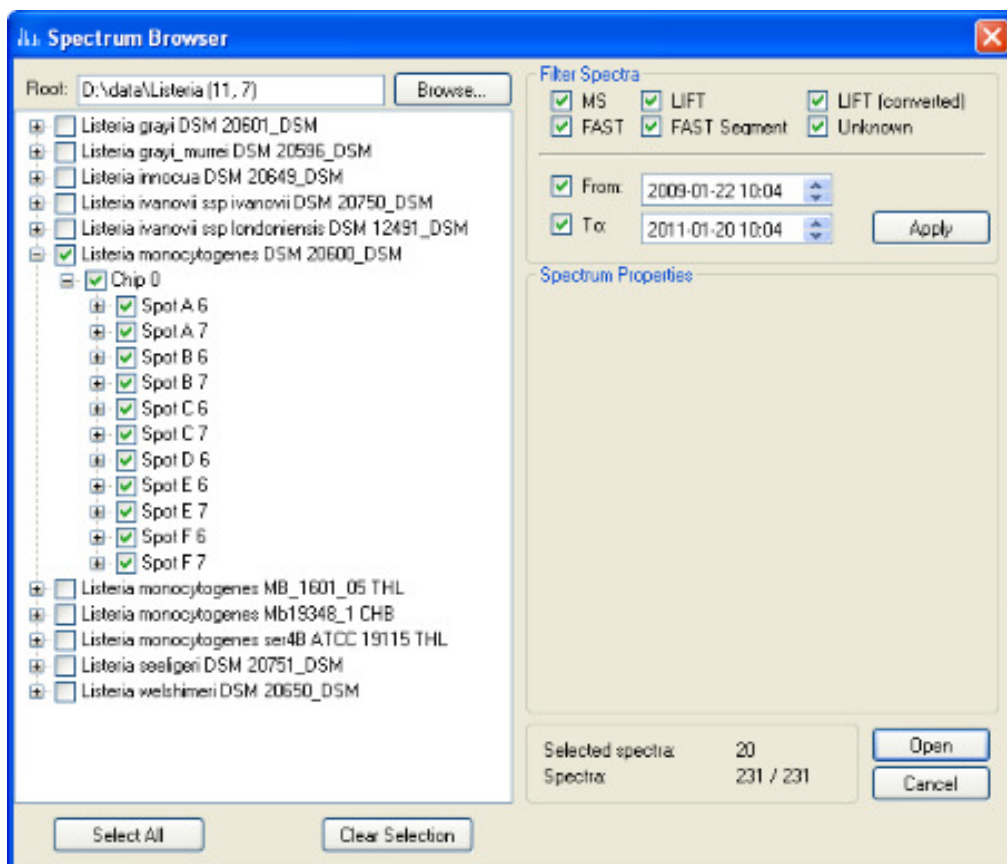


3.3.2 Vkládání spekter a MSP do Náhledu souboru


3.3.2.1 Práce se spektry

Před tím, než začnou být soubory hrubých spekter zpracovávány (např. při vytváření MSP anebo při klastrování PCA), musí být hrubá spektra vložena pomocí prohlížeče spekter (**Spectrum Browser**) do náhledu souboru (**File View**).

Použití prohlížeče spekter (Spectrum Browser)



Prohlížeč spekter zobrazuje dendrogram, v němž se vyskytují všechna spektra, která se nacházejí se ve zvoleném kořenovém adresáři (**Root folder**) a která odpovídají zvoleným filtračním kritériím.

Podle výrobního nastavení lze adresáře uzlů zavírat a čistit. Kliknutím na  lze adresáře rozšířit. Výběrem boxu nacházejícího se vedle názvu adresáře lze dosáhnout importu spektra.

Kliknutím na nabídku **Select All** vyberete všechny boxy v nabídce. Kliknutím na nabídku **Clear Selection** všechny boxy vyčistíte.

Filtrování spekter

Výběr možností v oblasti **Filter Spectra** prohlížeče spekter umožňuje spektra filtrovat podle následujících kritérií:

- buď podle typu (**MS**, **LIFT**, **LIFT (converted)**, **FAST**, **FAST Segment**, **Unknown**) anebo
- podle data akvizice (**From**, **To**).

Výběrem/vyčištěním nabídky typu **Spectra** je dendrogram spekter automaticky aktualizován.

Chcete-li k fultrování použít data akvizice, zvolte požadovaný adresář a klikněte na příkaz **Apply**.


V souladu s výrobním nastavením jsou pak vybrány všechny typy spekter a vymazány všechny datové filtry, takže k žádné filtraci nedochází.

Oblast označená jako Vlastnosti spektra (**Spectrum Properties**) zobrazuje vlastnosti toho spektra, které je momentálně vybráno v dendrogramu spekter.

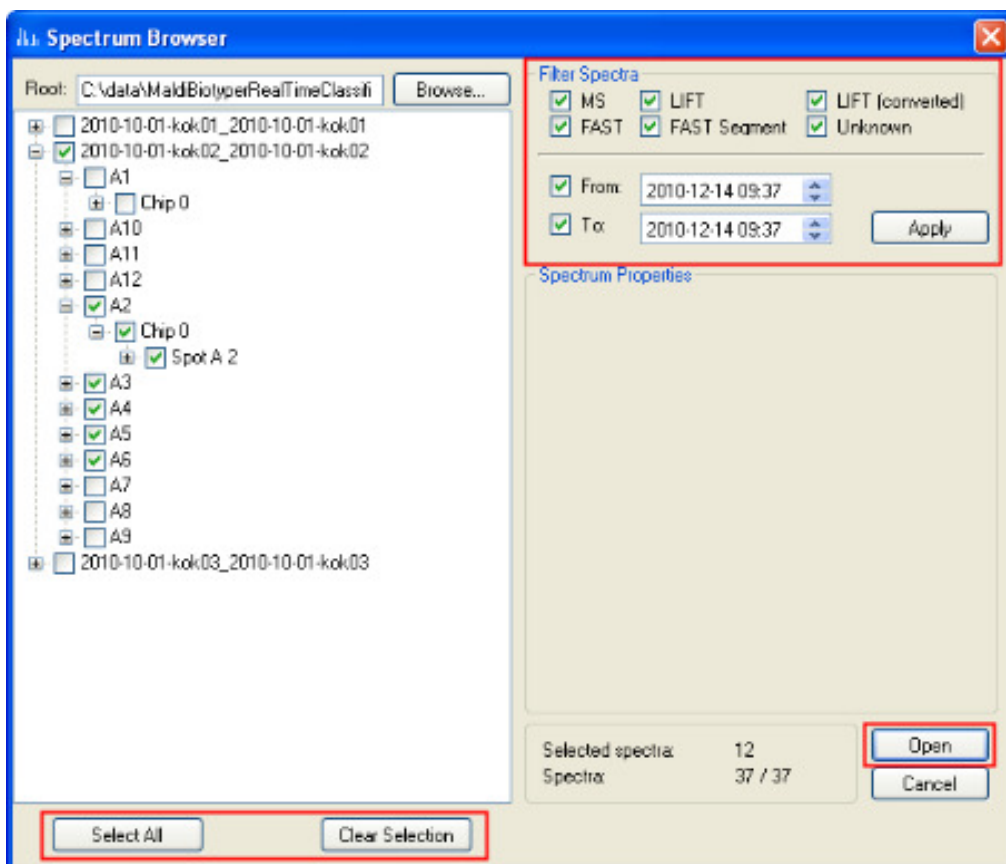
Funkce Zvolená spektra (**Selected spectra**) zobrazuje počet spekter zachycených v jejich dendrogramu.

Nabídka **Spectra** zobrazuje počet spekter odfiltrovaných a uvedených v tom pořadí, jak jsou zachycena v dendrogramu; poté následuje celkový počet spekter obsažených v adresáři vybraných spekter.

Uložení spekter do náhledu souborů (File View)

1. Otevře okno prohlížeče spekter (**Spectrum Browser**) buď pomocí nabídek **Select File > Add Spectra** anebo kliknutím na nabídku 
2. **Browse...** Pak přejděte v adresáři na požadované spektrum a klikněte na **OK**.


V okně se objeví ty adresáře a podadresáře, které požadovaná spektra obsahují. Ke zpřesnění výběru použijte filtry.



3. Pomocí nabídky **Select** vyberte adresáře obsahující požadovaná spektra a klikněte na příkaz **Open**, čímž je uložíte do náhledu souborů (File View).

Kliknutím na nabídku **Select All** vyberete všechny boxy v dendrogramu. Kliknutím na **Clear Selection** naopak všechny boxy vyčistíte.

Odstranění spekter z náhledu souborů (File View)

1. Nežádoucí spektra zvýrazněte.
2. Kliknutím pravého tlačítka na zvýrazněná spektra a použitím příkazu **Remove Selected Spectra** tato spektra z kontextového menu odstraníte.
3. Chcete-li z náhledu souborů (File View) odstranit všechna spektra, použijte buď příkazů **Select File > Clear All Spectra** anebo klikněte na .

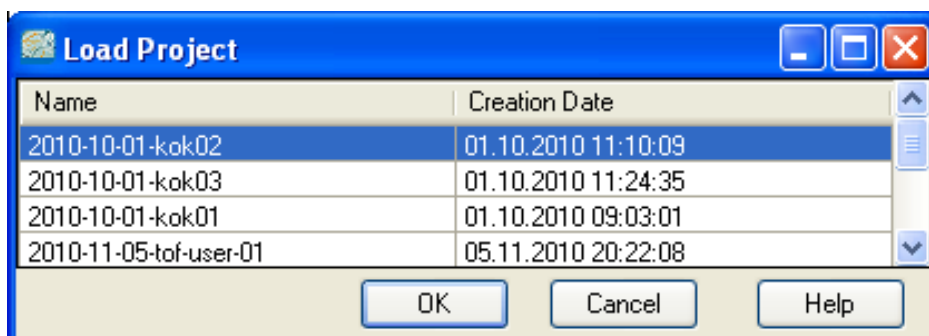
3.3.2.2 Ukládání spekter z projektů programu MALDI Biotyper RTC

Z projektů programu MALDI Biotyper RTC lze spektra pro další analýzu nebo pro zpracování (např. PCA, subtypizaci anebo vytváření MSP) ukládat přímo.

Při ukládání projektu MALDI Biotyper RTC

1. Zvolte příkazy **Action > Open Realtime Classification Project**.

Příkazem **Load Project** se zahájí potřebný dialog.



2. **Zvolte** požadovaný projekt a klikněte na **OK**.

Soubory spekter projektu jsou takto uloženy do tabulky Náhled souborů spekter (**File View Spectrum**). Hrubé spektrum a výsledky klasifikace momentálně zvýrazněného spektra jsou pak společně zobrazeny v náhledu (**Spectrum View**) a v tabulce **Spectrum Scores**.

{b}Poznámka{/b} V tomto případě je zapotřebí, aby soubory hrubých spekter byly v lokálním počítači dostupné.

3.3.2.3 Zacházení s hlavními spektry (MSPs)

Pro účely klasifikace lze hlavní spektra přidat do tabulky File View MSP.

Uložení MSP do náhledu souborů (File View)

1. Přeneste požadovaná hlavní spektra do tabulky **Current MSP** anebo do tabulky **Selected MSP**.
2. Příslušné MSP zvýrazněte kliknutím pravého tlačítka myši a v kontextovém menu vyberte nabídku **Add MSPs for Identification**.

Odstranění MSP z náhledu souborů (File View)

1. MSP zvýrazněte kliknutím pravého tlačítka myši a v kontextovém menu vyberte nabídku **Remove Selected MSPs**.

Chcete-li z náhledu souborů odstranit všechna hlavní spektra, použijte buď příkazy

Select File > Clear All MSPs anebo klikněte na .

3.3.2.4 Výběr spekter a MSP pro zpracování

Zvýraznění spekter a MSP určených ke zpracování

U některých pracovních postupů (manuální předběžná příprava, klasifikace, tvorba MSP), je třeba příslušná spektra nebo hlavní spektra (MSP) v náhledu souborů (**File View**) před zpracováním zvýraznit.

- Jednotlivá spektra / MSP lze zvýraznit kliknutím levého tlačítka myši.
- Chcete-li zvýraznit několik po sobě následujících spekter / MSP, podržte klávesnici **Shift** a klikněte na první a poslední spektrum celé série.
- Chcete-li zvýraznit několik po sobě nenásledujících spekter / MSP, podržte klávesnici **Ctrl** a klikněte požadovaná spektra / MSP.
- Pozadí zvýrazněných spekter / MSP je modré.

3.3.3 Tvorba, editování a výběr metod zpracování

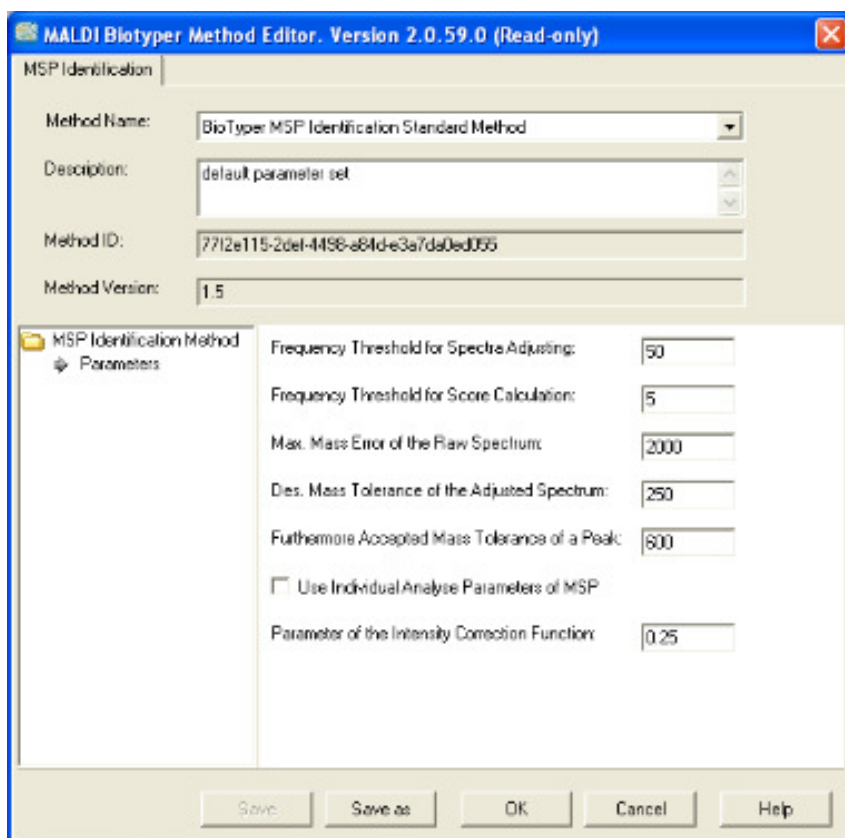
Pracovní procesy programu MALDI Biotyper jsou kontrolovány metodami zpracování spekter.

- Metody předběžného zpracování slouží k vytvoření seznamu píků na základě hrubých spekter.
- Metody identifikace MSP slouží k identifikaci vzorku, z něhož bylo spektrum získáno.
- Metody tvorby MSP jsou používány k vytvoření hlavního spektra ze souboru vybraných spekter.
- Metody subtypizace tvorby MSP se používají k vytvoření subtypu MSP z některého spektra hlavního MSP.

- Metody tvorby PCA slouží k provedení analýzy hlavních komponent (**Principal Component Analysis**) spekter předběžně zpracovaných.
- Metody klastrování PCA slouží ke klastrování předběžně zpracovaných spekter na základě výsledků PCA.
- Metody tvorby dendrogramů MSP se používají k vytvoření dendrogramu na základě některého ze zvolených MSP.
- Metody CCI (**Composite Correlation Index**) slouží k výpočtu CCI matrix.

3.3.3.1 Editor metody programu MALDI Biotyper

Tento editor umožňuje uživateli zobrazovat, vytvářet a editovat metody zpracování vzorků. Editor se z příslušného top-level menu spouští buď příkazy **Edit > Method > [method type]** anebo příkazy **Action > [method type] > Edit Method**.



Momentálně aktivní metoda je zobrazena v poli název metody (**Method Name**). Každá instalace softwaru MALDI Biotyper obsahuje výrobcem nastavené soubory parametrů pro každý proces (**Biotyper [method type] Standard Method**). Tyto parametry jsou určeny pouze pro čtení.

Editor také zobrazuje opční popis (**Description**) metody a specifická (unique) **ID** zvolené metody (**Method ID**) a její verze (**Method Version**). Toto nastavení nelze měnit.

Hlavní část editoru zobrazuje parametry a momentální nastavení pro příslušný typ metody.

Chcete-li zobrazit momentálně aktivní metody zpracování a jejich parametry,

1. použijte příkazy **Edit > Method > [method type]**, čímž editor metody (**MALDI Biotyper Method**) spustíte .

Poté se zobrazí momentálně aktivní metoda zpracování a její parametry.

2. Editor zavřete kliknutím na **OK**.

Tabulka 3-2 Metody zpracování vzorků (MALDI Biotyper processing methods)

| Typ metody | Input | Output |
|--|---|----------------------------|
| Preprocessing (Předběžné zpracování/příprava) | Hrubá spektra | Seznamy píků |
| MSP Identification (Identifikace MSP) | Hrubá spektra anebo MSP | Klasifikace mikroorganismů |
| MSP Creation (Tvorba MSP) | Seznamy píků předběžně zpracovaných spekter | MSP (referenční spektrum) |
| Subtypizace tvorby MSP Creation | MSP | Subtypizace MSP |
| PCA Creation (Tvorba PCA) | Předběžně zpracovaná spektra | Základní analýza komponent |
| PCA Clustering (Klastrování PCA) | Předběžně zpracovaná spektra + PCA | Klastrový diagram PCA |
| MSP Dendrogram Creation (Tvorba dendrogramu MSP) | MSP | Dendrogram MSP |
| Composite Correlation Index Calculation (Výpočet CCI) | Předběžně zpracovaná spektra | CCI matrix |

3.3.3.2 Vytváření a editování uživatelských metod zpracování vzorků (Custom Processing Methods)


Uživatelské metody zpracování vzorků se vytvářejí editováním kopie výrobně nastavené metody uložené pod odlišným názvem.

Chcete-li metodu zpracování vytvořit

1. použijte příkazy **Edit > Method > [method type]**, čímž editor spustíte.

Možnost: Popis nové metody vložte do inputového pole **Description**.

2. Parametry podle potřeby upravte.

Poznámka: Parametry metod předběžného zpracování jsou rozděleny do skupin (**Mass Adjustment, Smoothing** atd.). Momentálně zobrazená skupina je označena šedou šipkou .

3. Klikněte na **Save As** a nový název metody vložte do dialogu **Insert New [method type]**.

Tato metoda bude uložena s novým ID a s vlastním číslem její verze (new **Method ID** and **Method Version**).

4. Kliknutím na **OK** se editor zavře a dojde k aktivaci nové metody.

Tato nová metoda bude aktivní až do okamžiku vybrání jiné metody ze seznamu názvů metod (**Method Name drop-down list**) a po kliknutí na tlačítko **OK**.

Chcete-li editovat uživatelskou metodu zpracování:

1. použijte příkazy **Edit > Method > [method type]**; tím editor spustíte.
2. Metodu, která má být editována, vyberte v seznamu názvů metod (**Method Name drop-down list**).
3. Podle potřeby parametry upravte.
4. Klikněte na příkaz **Save**.

Metoda bude uložena pod stejným jménem a s novým ID (**Method Name** with a new **Method ID**).

5. Editor programu **MALDI Biotyper Method** zavřete a novou metodu aktivujete kliknutím na **OK**.

3.3.3.3 Výběr metod zpracování

Chcete-li vybrat metodu zpracování vzorků

1. Editor programu **MALDI Biotyper Method Editor** otevřete kliknutím na nabídky **Edit > Method > [method type]**.
2. V seznamu názvů metod (**Method Name drop-down list**) vyberte požadovanou metodu.
3. Editor **MALDI Biotyper Method** zavřete a vybranou metodu aktivujete kliknutím na **OK**.

3.3.4 Předběžné zpracování spekter

Metody předběžného zpracování se používají k vytvoření seznamu píků na základě hrubých spekter. Vzhledem k tomu, že množství informací potřebných pro každý z pracovních postupů se případ o případu různí, lze metody předběžného zpracování optimalizovat, čímž se proces analýzy urychlí a velikost souboru dat zmenší.

3.3.4.1 Výrobce nastavené metody předběžného zpracování

Každá instalace softwaru MALDI Biotyper obsahuje tři metody předběžného zpracování; tyto metody jsou určeny pouze ke čtení a používají se při klasifikaci, tvorbě MSP, klastrování PCA a výpočtu CCI.

| <u>Workflow</u> (Pracovní postup) | <u>Doporučená metoda předběžného zpracování spekter</u> |
|--|--|
| Classification (Klasifikace) | Standardní metoda předběžného zpracování v programu BioTyper |
| MSP creation (Tvorba MSP) | Standardní metoda předběžného zpracování v programu BioTyper |
| PCA clustering (Klastrování PCA) | Standardní PCA metoda předběžného zpracování v programu BioTyper |
| CCI calculation (Výpočet CCI) | Standardní CCI metoda předběžného zpracování v programu BioTyper |

3.3.4.2 Uživatelské metody předběžného zpracování

Uživatelé si mohou vytvořit své vlastní metody předběžného zpracování pomocí postupné optimalizace jednotlivých parametrů metod předběžného zpracování, které jsou v editoru metod uvedeny v tabulkách předběžného zpracování.

Chcete-li si vytvořit vlastní metodu předběžného zpracování

1. Spustíte MALDI Biotyper Method Editor příkazem **Select Edit > Method > Preprocessing....**

Možnost: Popis nové metody vložte do inputového pole **Description**.

2. Podle potřeby parametry upravte.

Metody předběžného zpracování jsou rozděleny do skupin. Momentálně zobrazená skupina parametrů je označena šedou šipkou ➔.

3. Klikněte na nabídku **Save As** a nový název metody (**Method Name**) vložte do dialogu **Insert New Preprocessing Method Name**.

Tato metoda bude uložena s novým ID a jako číslovaná nová verze (**Method ID and Method Version**).

4. Editor **MALDI Biotyper Method** zavřete a vybranou metodu aktivujete kliknutím na **OK**.

Tato nová metoda bude aktivní až do okamžiku vybrání jiné metody ze seznamu názvů metod (**Method Name drop-down list**) a po kliknutí na tlačítko **OK**.

Úprava hmotnosti

Parametry úpravy hmotnosti (**Mass Adjustment parameters**) definují zda a jak je třeba během předběžného zpracování ve spektrech údaje o hmotnosti upravit.

Vyhlazení šumu (Smoothing)

Parametry vyhlazování šumu z měření (**Smoothing**) určují zda a do jaké míry je během předběžného zpracování třeba spektra shladit. V programu MALDI Biotyper se používá Savitsky-Golay metoda vyhlazení šumu.

Odečet od základny (Baseline Subtraction)

Parametry tohoto odečtu (**Baseline Subtraction**) určují zda a do jaké míry je třeba povést během předběžného zpracování odečet od základní linie. V programu MALDI Biotyper se používají metody Multipolygon, Minimum, Penalized Least Squares a Penalized B-Spline baseline subtraction.

Normalizace

Parametry **Normalization** definují způsob, jímž lze spektra během přípravy/předběžného zpracování normalizovat. V programu MALDI Biotyper jsou použity metody Maximum Norm a P-Norm normalization.

Parametry Peak Picking

Parametry **Peak Picking** definují způsob zachycování píků během předběžného zpracování. Program MALDI Biotyper používá metody Spektra Differentiation, Peak Fitting a Local Maximum peak picking.

Kontrola vlivu metody předběžného zpracování na hrubá spektra

Optimalizace lze dosáhnout použitím příkazů **Action > Preprocessing**. Výběrem těchto příkazů příslušné aktivní parametry aplikujete k hrubým spektrům a zobrazíte výsledná zpracovaná spektra v Náhledu spekter (**Spectrum View**).

1. Požadovaná spektra vložte a zvýrazněte (viz část 3.3.2).

V náhledu Spectrum View mají zvýrazněná spektra modrou barvu.

2. Zvolte příkazy **Edit > Method > Preprocessing**. V seznamu názvů metod (**Method Name drop-down list**), který se nachází v editoru metod vyberte požadovanou metody a klikněte na **OK**.
3. Vliv jednotlivých parametrů prověřte následujícím způsobem:
 - a. Příkazy **Action > Preprocessing > Adjust Mass**.

Pro všechna zvýrazněná spektra se vygeneruje spektrum hmotnostně upravené, které pak v oranžovém zabarvení překryje spektrum hrubé.

b. Příkazy **Action > Preprocessing > Smooth**.

Pro všechna zvýrazněná spektra se vygeneruje spektrum hmotnostně upravené, které pak v purpurovém zabarvení překryje spektrum hrubé.

c. Příkazy **Action > Preprocessing > Subtract Baseline**.

Pro všechna zvýrazněná spektra se vygeneruje spektrum hmotnostně upravené, vyhlazené, a odečtené od základny (baseline-subtracted), které pak v modrozeleném zabarvení překryje spektrum hrubé.

d. Příkazy **Preprocessing > Normalize**.

Pro všechna zvýrazněná spektra se vygeneruje spektrum hmotnostně upravené, vyhlazené, a odečtené od základny, které pak v zeleném zabarvení překryje spektrum hrubé.

e. Příkazy **Selecting Action > Preprocessing > Pick Peaks**.

Pro všechna zvýrazněná spektra se vygeneruje výsledný pík (peak picking result) a ten se zobrazí v barvě červené (při použití inverzní stupnice intenzity) pod předem zpracovaným (předpřipraveným) spektrem.

f. Příkazy **Action > Preprocessing > Batch Processing**.

Výše uvedené kroky a – e lze také provést jediným příkazem **Batch Processing**, kterým se vygeneruje výsledný pík pro všechna zvýrazněná spektra.

3.3.5 Standardní a subtypizovaná hlavní spektra

Při použití přístroje MALDI Biotyper je základem klasifikace hlavní spektrum (MSP). Toto spektrum je spektrem referenčním (nebo přesněji řečeno referenčním seznamem píků), které pak je přiřazeno (assigned) k určitému druhu nebo kmenu mikroorganismů.

Při klasifikačním postupu jsou profily píků (peak patterns) neznámých vzorků porovnávány s údaji uloženými v knihovně MSP. Získané skóre shody (matching score) je pak měřítkem pravděpodobnosti správné klasifikace.

Hlavní spektra jsou vytvořena pomocí analýzy velkého počtu spekter získaných u dobře charakterizovaných vzorků kultivovaných v příznivých podmínkách. Jedno MSP je obvykle vytvořeno na základě 20 takovýchto spekter. Na základě celého souboru dat je softwarem vygenerován seznam píků a příslušné MSP pak je vytvořeno na základě informací o hmotnostní píků (peak mass), o jejich frekvenci (peak frequency) a intenzitě jejich distribuce (intensity distribution).


Místo hrubých spekter lze ke klasifikaci vzorků použít také spektra hlavní.

Subtypizovaná MSP se používají při rozlišování úzce příbuzných druhů. Kromě informací o frekvenci píků a intenzitě jejich distribuce se při tvorbě sbtypizovaných MSP používá i dodatečné zvážení rozlišovacích píků (additional weighting to distinguishing peaks).

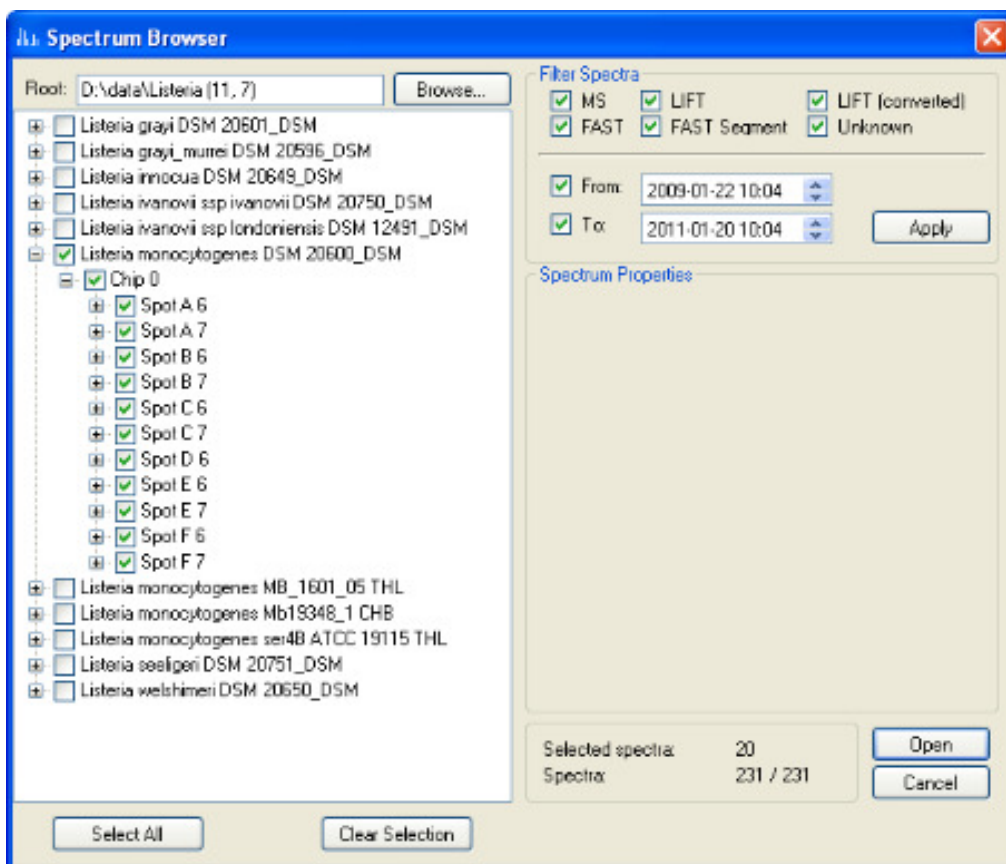
Subtypizovaná MSP se používají při klasifikaci těch vzorků, které při použití standardních MSP nedávají jednoznačné výsledky.

3.3.5.1 Tvorba standardních MSP

Standardní hlavní spektrum (MSP) se vytvoří takto:

1. Okno prohlížeče spekter otevřete buď příkazy **Select File > Add Spektra** anebo kliknutím na .
2. Kliknutím na **Browse...** pak naleznete adresu souboru požadovaného spektra a kliknete na **OK**.

Adresáře a podadresáře obsahující jednotlivá spektra se pak objeví v hlavní části (main body) okna. Toto vyhledávání zkrátíte použitím filtrů



3. Zkontrolujte zda jsou požadovaná spektra v adresářích obsažena a kliknutím na nabídku **Open** je vložte do náhledu souboru (File View).

Všechny boxy dendrogramu vyberete kliknutím na nabídku **Select All**. Kliknutím na nabídku **Clear Selection** všechny boxy vyprázdníte.

K vytvoření standardního MSP je zapotřebí nejméně dvaceti spekter.

Možnost: Během výběru definujte metodu použitou při předběžném zpracování buď pomocí příkazů:

- a. **Action > Preprocessing > Edit Method** nebo příkazů
- b. **Edit > Method > Preprocessing**.

Doporučenou metodou předběžného zpracování vzorků je standardní metoda zvaná **Biotyper Preprocessing Standard Method**.

Možnost: Metodu tvorby MSP lze definovat buď pomocí příkazů:

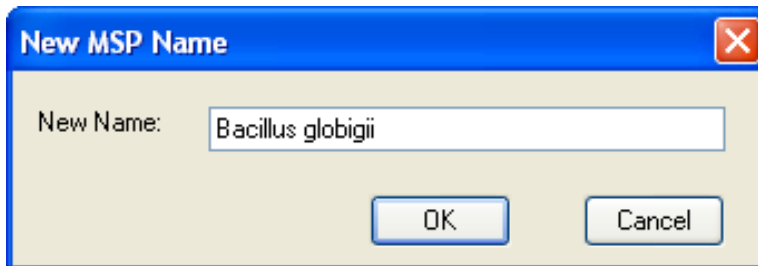
- a. **Action > MSP Creation > Edit Method** anebo
- b. **Edit > Method > MSP Creation.**

Doporučenou metodou tvorby MSP je standardní metoda zvaná **Biotyper MSP Creation Standard Method**.

4. Ty soubory spekter, které mají být použity k tvorbě MSP, je třeba v kontextovém menu náhledu souboru (File View) zvýraznit buď příkazy :
 - a. **Select Action > MSP Creation > Create** či **Create MSP**, čímž se z hrubých spekter jednoho mikroorganismu vytvoří jediné MSP)
ANEBO příkazy
 - b. **Select Action > MSP Creation > Create Series** či **Create MSP Series**, čímž se z hrubých spekter různých mikroorganismů vytvoří vícenásobná MSP. Názvy těchto MSP jsou vygenerovány na základě použití nejnižší úrovně názvů nejednoznačných adresářů obsahujících příslušná spektra. Tak např. sérii hlavních spekter vytvořených ze spekter nacházejících se adresářích
D:\data\MALDI_Biotyper_data\Acinetobacter\Acinetobacter baylyi a
D:\data\MALDI_Biotyper_data\Acinetobacter\Acinetobacter grimontii budou přiřazeny názvy hlavních spekter (MSP) druhů *Acinetobacter baylyi* a *Acinetobacter grimontii*.

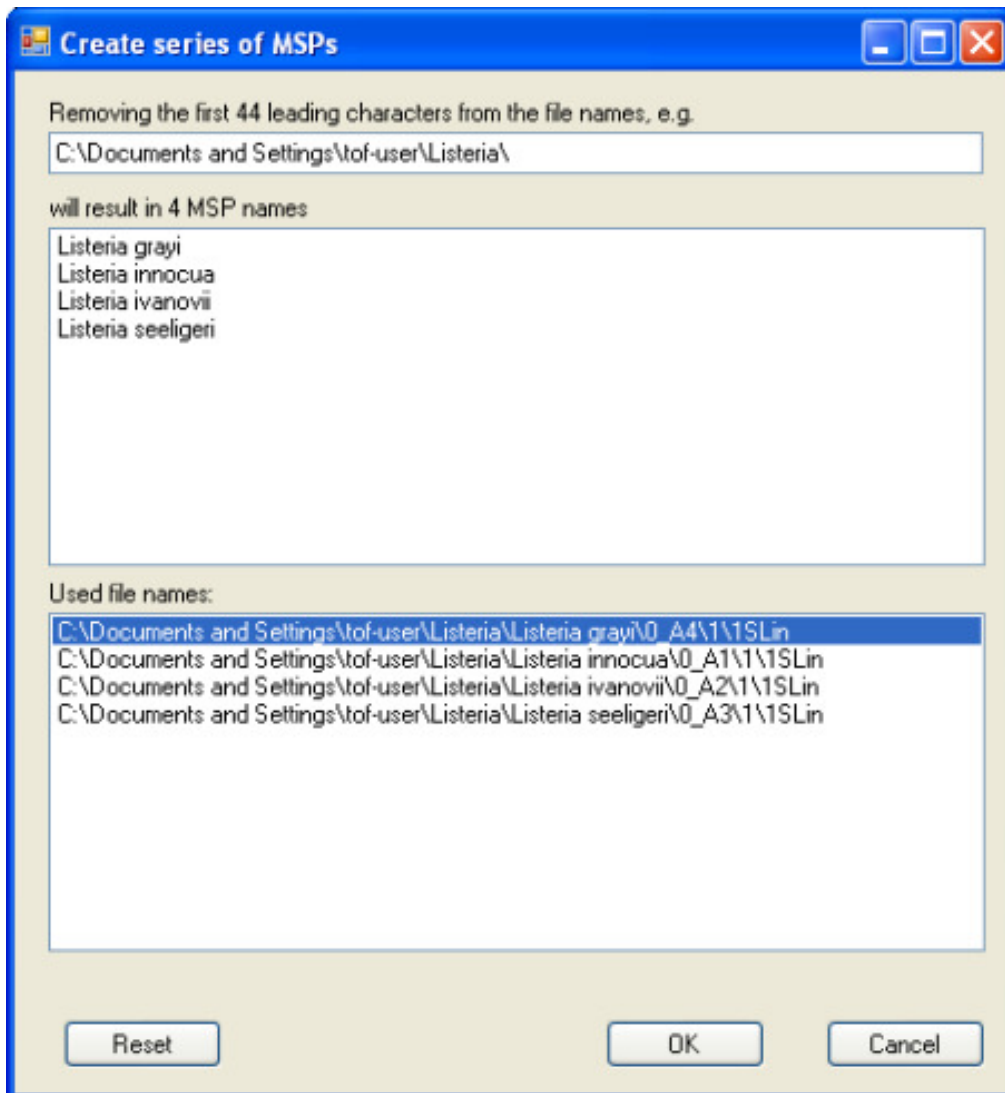
Poznámka: Přesvědčte se, zda se všechna spektra použitá k tvorbě MSP jednoho druhu mikroorganismů nacházejí v jednom a tomtéž adresáři.

6. Jinou možnost představuje následující postup:
 - a. Buď vložte jméno nového MSP (**Create MSP**) a klikněte na **OK**.



ANEBO

- b. Klikněte na **OK**, čímž akceptujete přiřazené (assigned) názvy MSP (**Create Series of MSPs**).




Názvy MSP by se měly skládat z rodového a druhového jména příslušného mikroorganismu; nově vytvořená MSP jsou v dendrogramu přidávána do uzlu **Unassigned MSPs**.

3.3.5.2 Zobrazení a editování seznamů standardních MSP píků a metadat

Zobrazení a editování seznamu píků určitého MSP

Seznam hodnot m/z, intenzity a hmotnosti (weightings) MSP píků lze editovat pomocí editoru MALDI Biotyper MSP Peak List Editor.

1. Požadované MSP přesuňte buď to tabulky **Current MSP** anebo **Selected MSP**.
2. Pravým tlačítkem myši klikněte na tabulku MSP (**table entry**) a v kontextovém menu vyberte příkaz **View MSP Peak List**. Jinou možností představuje, kliknutí na  (pouze u vybrané tabulky MSP).

Tím se otevře editor seznamu píků (**MALDI Biotyper MSP Peak List**).

Hodnoty m/z a intenzity jsou zobrazeny s přesností na 2 desetinná místa. Kliknutím na příslušnou buňku zobrazíte přesnou hodnotu v ní obsaženou.

Seznamy lze třídit podle hodnot uvedených v jednotlivých sloupcích, a to tak, že na záhlaví příslušného sloupce kliknete. Opakovaným kliknutím se směr třídění změní (buď zdola nahoru nebo naopak). Sloupec a pořadí použité pro třídění jsou indikovány šipkou, která se nachází vedle záhlaví příslušného sloupce (▼ nebo ▲).

Jednotlivé píky lze vybírat kliknutím na šedé políčko nacházející se vlevo od řádku příslušného píku. Chcete-li vybrat větší počet po sobě následujících píků, podržte klávesu **Shift** a klikněte na první a poslední pík dané série. Chcete-li vybrat větší počet po sobě nenásledujících píků, podržte klávesu **Ctrl** a klikněte na požadované píky. Kliknutí pravým tlačítkem myši na vybrané řádky otevírá kontextové menu, které obsahuje příkazy **Cut**, **Copy** a **Paste** (vyjmi, zkopíruj a vlož).

Poznámka: Informace vybrané nebo zkopírované z určitého seznamu píků nelze do jiných seznamů vkládat.

| m/z [Da] | Intensity [%] | Weight [%] | Frequency [%] | In Peak Lists |
|----------|---------------|------------|---------------|---------------|
| 3079.31 | 8.51 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3137.50 | 1.49 | 100.00 | 94.4 | 17 |
| 3156.91 | 13.04 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3237.54 | 1.85 | 100.00 | 88.9 | 16 |
| 3280.23 | 1.91 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3319.63 | 6.58 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3435.65 | 3.31 | 100.00 | 94.4 | 17 |
| 3450.24 | 11.15 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3542.52 | 1.48 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3638.92 | 5.15 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 3767.11 | 1.31 | 100.00 | 94.4 | 17 |
| 3931.93 | 1.95 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4033.57 | 3.24 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4123.68 | 4.31 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4250.56 | 1.78 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4268.03 | 12.54 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4348.86 | 2.11 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4386.87 | 1.57 | 100.00 | 94.4 | 17 |
| 4532.81 | 3.24 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4669.04 | 5.17 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4692.23 | 12.96 | 100.00 | 100.0 | 18 |
| 4710.75 | 100.00 | 100.00 | 100.0 | 18 |

3. Změny údajů obsažených v seznamech píků lze provést kliknutím na příslušnou buňku a vložením požadované informace.
4. Editor uzavřete a provedené změny uložíte kliknutím na **OK**.

Zobrazení a editování metadat určitého MSP

{b}Poznámka{/b} MSP metadata zahrnují název a kmen mikroorganismu a údaje o jeho původu, kultivačních podmínkách a způsobu zpracování vzorku. Všechny tyto údaje jsou nepovinné a slouží pouze pro informaci. Tato metadata jsou uložena do databáze programu MALDI Biotyper.

1. Požadované MSP přesuňte buď do tabulky **Current MSP** anebo do tabulky **Selected MSP**.
2. Pravým tlačítkem myši klikněte na tabulku MSP a v kontextovém menu vyberte příkazy **Select View / Edit MSP Metadata**.

Tím se otevře editor MALDI Biotyper MSP Metadata.

MALDI Biotyper MSP Metadata Editor. Version: 3...

Acholeplasma laidlawii FLR (24 Spectra)

Organism:

Strain:

Provided by:

Determined by:

Conserved:

Extraction Method:

Matrix:

Growing Conditions:

Comment:

3. Kliknutím na  se provedou požadované změny metadat.

| Field (Pole) | Funkce |
|---------------------------------------|---|
| Organism (Organismus) | Zápis rodového a druhového jména |
| Strain (Kmen) | Zápis názvu kmene |
| Provided by (Původ vzorku) | Identifikátor zdroje vzorku. identifikátor lze vytvořit/editovat kliknutím na nabídky New.../Edit... |
| Determined by | Identifikátor metody stanovení ID vzorku. Tento identifikátor lze |

| <u>Field</u> (Pole) | <u>Funkce</u> |
|---|--|
| (Stanoveno pomocí) | vytvořit kliknutím na nabídky New.../Edit... Hodnota 'Typ kmene' (Type strain) je speciální hodnotou, která označuje tu hodnotu, která označuje, že příslušný kmen je uložen v typové kolekci (např.v ATCC nebo v DSM) a že ho 'poskytovatel' vzorku z této typové kolekce získal. |
| Conserved (Zakonzervováno) | Kontrola toho, zda je vzorek zakonzervován. |
| Extraction Method (Metoda extrakce) | Extrakční metoda použitá ke zpracování vzorku. Vytvoří se kliknutím na New... |
| Matrix | MALDI matrix použitá ke generování spektra. Vytvoří se kliknutím na New... |
| Growth Conditions (Kultivační podmínky) | Záznam o kultivačních podmínkách vzorku. |
| Comment (Poznámka) | Případné poznámky. |

4. Kliknutím na **OK** editor zavřete a změny uložíte.

Zobrazení detailů o MSP

- Požadované MSP přesuňte do tabulky **Current MSP** nebo **Selected MSP**.
- Pravým tlačítkem myši klikněte na MSP a v kontextovém menu vyberte buď zobrazení metody předběžného zpracování (**View Preprocessing Method**) anebo metody tvorby MSP (**View MSP Creation Method**).


Tím se otevře editor programu **MALDI Biotyper** a zobrazí se příslušná metoda zpracování vzorku (určeno pouze ke čtení).

3. Kliknutím na **OK** se editor uzavře.

3.3.5.3 Vymazání nepřirazených MSP

Nepřirazená MSP lze vymazat pomocí editoru taxonomického dendrogramu.

Vymazání nepřřazeného MSP

1. Klikněte pravým tlačítkem myši na taxonový uzel náhledu taxonomického dendrogramu a vyberte buď příkaz **Start Taxonomy Tree Editor** anebo klikněte na .

Tím se editor taxonomického dendrogramu otevře.

V tabulce nepřřazených MSP, klikněte na MSP a zvolte příkaz **Delete MSP**.


2. Vymazání potvrďte a editor zavřete kliknutím na **OK**.

3.3.5.4 Vytvoření, zobrazení a editace subtypizovaných MSP

Subtypizovaná MSP jsou vázána na svá rodičovská standardní MSP, jež se nacházejí v databázi a jsou zpracovávána společně s nimi.

Poznámka Vytváření subtypizovaných MSP si vyžaduje expertní znalost příslušných mikroorganismů a mělo by být prováděno pouze vyspělými uživateli.

Vytváření subtypizovaných MSP

1. Příslušné MSP přesuňte do tabulky vybraných MSP. Pak klikněte pravým tlačítkem myši na název MSP v tabulce **Current MSP** a buď vyberte příkaz **Add to MSP Selection** nebo klikněte na .

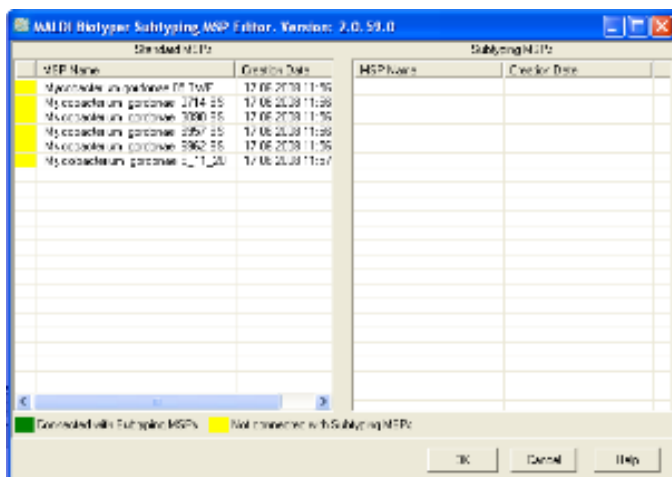
Do tabulky vybraných MSP musí být vložena nejméně dvě MSP.

Jiná možnost: Metodu tvorby subtypizovaného MSP definujte pomocí příkazů :

- a. **Action > MSP Creation > Edit Subtyping Method** anebo příkazů
 - b. **Edit > Method > Subtyping MSP Creation** .
2. V tabulce **Selected MSP** zvýrazněte požadované MSP. Pravým tlačítkem myši klikněte na zvýrazněná MSP a v kontextovém menu zvolte příkaz **Create Subtyping MSPs**.

Tím se otevře editor programu **MALDI Biotyper Subtyping MSP**. Zvýrazněná MSP jsou pak zobrazena v tabulce standardních MSP editoru.

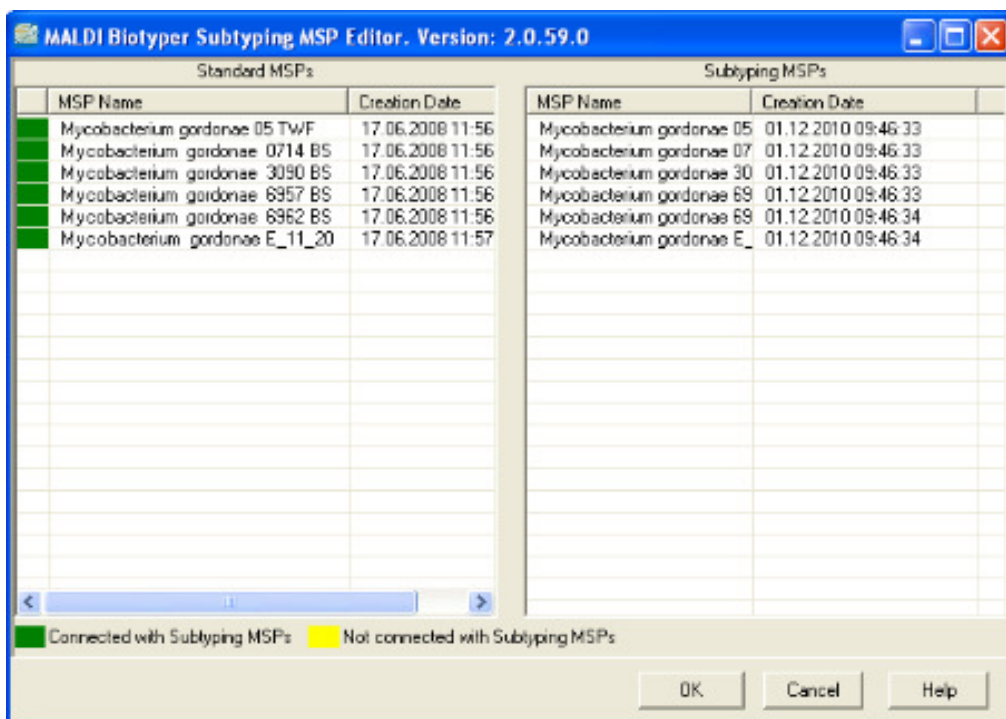
Nežádoucí MSP se ze seznamu standardních MSP odstraní zvýrazněním, kliknutím pravého tlačítka myši a vybráním příkazu **Remove MSP from List** v kontextovém menu.



- Pravým tlačítkem myši klikněte tabulku standardních MSP a v kontextovém menu zvolte příkaz **Create Subtyping MSPs**.

Poté, co jsou subtypizovaná MSP vytvořena, dojde v editoru k jejich zanesení do tabulky subtypizovaných MSP. Zelené označení v tabulce standardních MSP indikuje, že označená MSP jsou se svými subtypizovanými MSP propojena.


Seznam subtypizovaných MSP lze editovat zvýrazněním příslušného údaje v seznamu subtypizovaných MSP, kliknutím pravého tlačítka myši a výběrem příkazu **Edit MSP Peak List** v kontextovém menu.



4. Kliknutím na **OK** editor zavřete a subtypizovaná MSP uložíte do databáze.

Zobrazení/editování seznamu píků subtypizovaných MSP

Seznam píků subtypizovaných MSP má stejné hodnoty m/z, stejné intenzity a stejné frekvence jako jejich výchozí (parent) standardní MSP; píkové hmotnosti (peak weightings) však jsou odlišné. Podobně jako u standardních MSP lze hodnoty m/z, intenzity a hmotností editovat.

1. Výchozí standardní MSP přesuňte do tabulky vybraných hlavních spekter kliknutím pravého tlačítka myši na název MSP v tabulce aktuálních hlavních spekter (**Current MSP**) a volbou příkazu **Add to MSP Selection** nebo kliknutím na .
2. Zvolte příkazy **MSP Creation > Create Subtyping MSPs**.

Tím se otevře editor **MALDI Biotyper Subtyping MSP**. Subtypizovaná MSP jsou uvedena v tabulce Subtyping MSPs editoru.

3. Pravým tlačítkem myši klikněte na požadované subtypizované MSP a v kontextovém menu zvolte příkaz **Edit MSP Peak List**.

Tím se otevře editor **MALDI Biotyper Peak List**.


4. V seznamu píků pak provedte požadované změny.

Editovat lze i hodnoty m/z, intenzity a hmotnosti. Doporučuje se však měnit pouze píkové hmotnosti.

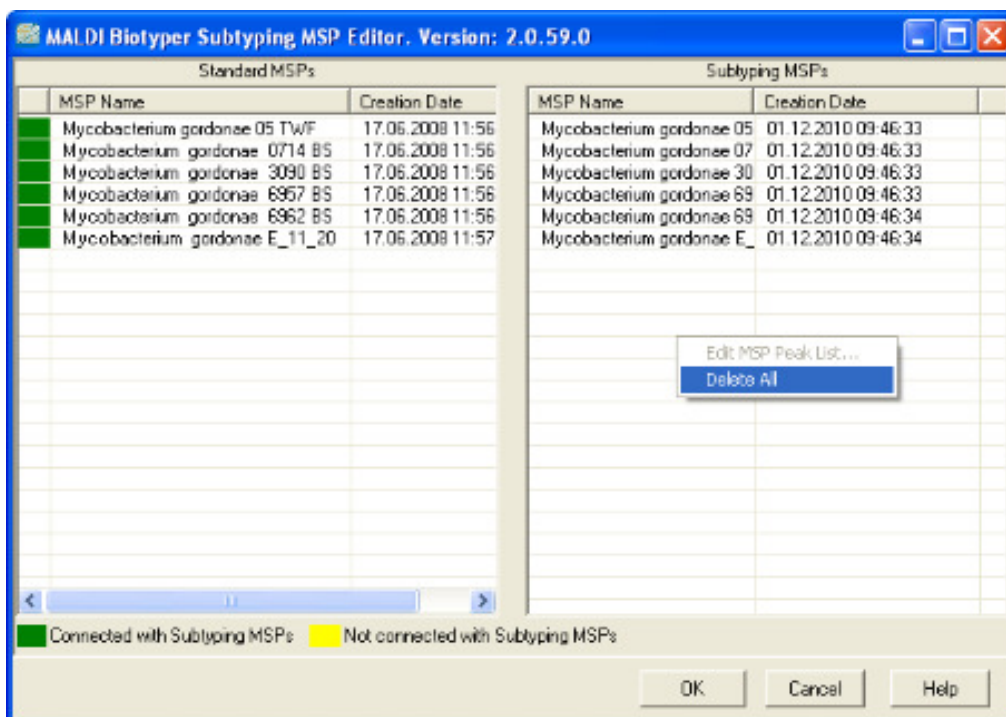
5. Kliknutím na **OK** editor uzavřete a změny uložíte.

3.3.5.5 Vymazávání subtypizovaných MSP

Kolekci subtypizovaných MSP lze vymazat následujícím způsobem:

1. Kliknutím pravého tlačítka myši na jméno MSP uvedené v tabulce **Current MSP** přesuňte výchozí standardní MSP spolu s navazující kolekcí subtypizovaných MSP do tabulky **Selected MSP** a buď zvolte příkaz **Add to MSP Selection** nebo klikněte na .
2. Zvolte příkazy **MSP Creation > Create Subtyping MSPs**.

Tím se otevře editor **MALDI Biotyper Subtyping MSP**. Seznam subtypizovaných MSP je uveden v tabulce **Subtyping MSPs** tohoto editoru.



3. Pravým tlačítkem myši klikněte na tabulku subtypizovaných MSP a v kontextovém menu zvolte příkaz **Delete All**.
4. Kliknutím na **OK** se editor zavře.

3.4 Klasifikace neznámých vzorků porovnáním jejich spekter anebo hlavních spekter

Analýza programem **MALDI Biotyper** generuje charakteristickou hmotnost a intenzitu distribuce proteinů určitého vzorku. Vzhledem k tomu, že toto spektrum je pro velký počet mikroorganismů druhově specifické, představuje jejich molekulární identifikátor ('**molecular fingerprint**'). Neznámé mikroorganismy lze identifikovat porovnáním jejich identifikátoru ('fingerprint') s tisíci předloh (MSP), které se nacházejí v referenční databázi. Těsnost shody identifikovaného neznámého vzorku s referenčním hlavním spektrem (MSP) se přitom odráží v hodnotě skóre vypočteného přímo v průběhu procesu tohoto porovnávání (viz část 3.4.1).

Subtypizační identifikační proces (pomocí subtypizovaných MSP) umožňuje přesnou klasifikaci úzce příbuzných druhů.

3.4.1 Výpočet hodnoty skóre

Při zpracování dat je v tomto případě prvním krokem převod hrubých hmotnostních spekter do seznamu píků. Ve druhém kroku pak jsou tyto seznamy píků porovnávány se specifickým podsouborem předloh uložených v referenční databázi.

Srovnávací algoritmus přitom vypočítává tři samostatné hodnoty tří základních charakteristik identifikovaného vzorku a spekter referenčních.

1. Nejprve se vypočte počet těch signálů v referenčním spektru, které se velmi blíží hodnotám zjištěným u neznámého spektra. Nulová shoda je hodnocena známkou 0, úplná shoda známkou 1.
2. Poté se stanoví počet těch signálů neznámého spektra, které se velmi blíží hodnotám spektra referenčního. I v tomto případě je nulová shoda hodnocena známkou 0 a úplná shoda známkou 1.
3. Naskonec se vypočte symetrie shody signálních párů. Shodují-li se vysoce intenzivní signály neznámého spektra s vysoce intenzivními signály spektra referenčního a jestliže spolu korespondují i signály nízko intenzivní, získáváme

vysokou hodnotu symetrie a tzv. korelační matrix skýtá hodnotu, která se blíží k 1. Jestliže srovnávané páry signálů nevykazují vůbec žádnou symetrii, má konečný výsledek hodnotu blízkou 0.

Tyto tři výsledné hodnoty se potom navzájem vynásobí a výsledek je normalizován na 1000. Hodnota skóre je logaritmem tohoto výsledku. Maximální dosažitelné skóre tedy má hodnotu 3 (= log 1000).

Následné seřazení hodnot skóre uvádí nejlepší souvztažnosti v horní části jejich konečného seznamu. Čím je hodnota skóre vyšší, tím je klasifikace druhu pravděpodobnější. Barevně zvýrazněná hodnota skóre přitom umožňuje rychlé vyhodnocení konečného výsledku.

Hodnoty skóre ≥ 2.0 lze považovat za pravděpodobnou klasifikaci.

Poznámka: Důležité je uvědomit si, že skóre vygenerované programem **MALDI Biotyper** vyjadřuje pravděpodobnost toho, že neznámý mikroorganismus patří do některého specifického podsouboru databáze tohoto programu.


3.4.2 Provádění klasifikace

Neznámý vzorek lze klasifikovat na základě porovnání jeho spektra nebo MSP s referenčním seznamem píků, který je uložen v databázi MSP.

Chcete-li provést klasifikaci neznámého vzorku

1. Vložte MSP určené pro porovnání se vzorkem následujícím způsobem:
 - a. Buď určitý taxonomický uzel v náhledu taxonomického dendrogramu zvýrazníte, kliknete na něj pravým tlačítkem myši a v kontextovém menu pak vyberte příkaz **Add Hierarchy to MSP Selection**.

ANEBO

- b. taxonomický uzel v náhledu taxonomického dendrogramu zvýrazněte a klikněte na .

ANEBO

c. vložíte/natáhnete knihovnu MSP (viz část 3.5.4)

Vybraná MSP pak jsou přidána do tabulky **Selected MSPs**, která se nachází v okně Náhled tabulky (**Table View**).

2. Zvýrazněte spektrum nebo MSP neznámého vzorku a uložte je do Náhledu souboru (viz část 3.3.2).

Možnost: Metodu předběžného zpracování definujte během klasifikace vybráním těchto příkazů:


- a. buď zvolte příkazy **Action > Preprocessing > Edit Method**
anebo příkazy
Edit > Method > Preprocessing.

Doporučenou metodou předběžného zpracování je v tomto případě standardní metoda předběžné přípravy vzorku (**BioTyper Preprocessing Standard Method**).

Možnost: Metodu identifikace MSP definujte během klasifikace buď vybráním příkazů:

- a. **Action > Identification > Edit Method** anebo příkazů
Edit > Method > MSP Identification.

Doporučenou metodou identifikace je v tomto případě standardní metoda identifikace vzorku (**BioTyper MSP Identification Standard Method**).

3. Klasifikaci zahajte buď volbou příkazů **Identification > Start Identification** anebo kliknutím na .

Indikační lišta v dolní části okna programu **MALDI Biotyper** indikuje momentální stav klasifikace .













Možnost: Kliknutím na  klasifikaci přerušíte.

V závislosti na tom, jak dalece jsou vzorky klasifikovány, se vedle názvu souboru spektra/názvu MSP objeví v Náhledu souboru dopravní světelné signály, které indikují kvalitu shody porovnávaných souborů s předlohou.

3.4.3 Zobrazení výsledků klasifikace MSP

Deset³ nejpřesnějších výsledků klasifikace je spolu s jejich příslušnými skóre zobrazeno v tabulce **Spectrum / MSP Scores**. Kódování v barvách dopravních signálů indikuje míru shody (zelená = dobrá shoda, červená = špatná shoda)⁴.

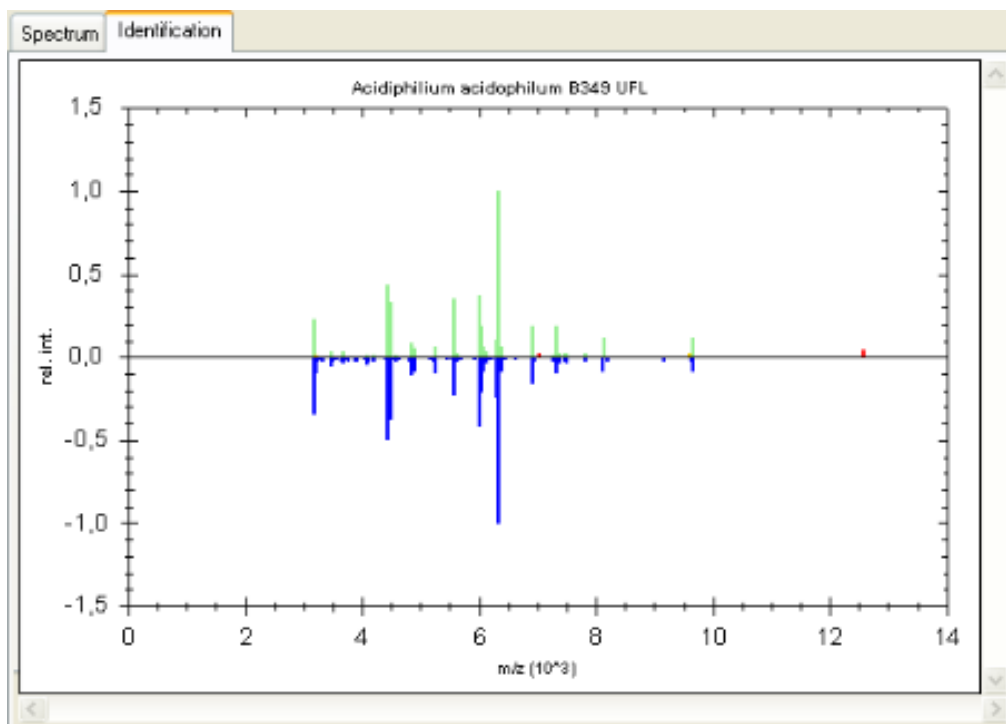
| Detected Species | Log(Score) |
|--|------------|
|  Methylobacterium rhodesianum B237 UFL | 2,527 |
|  Methylobacterium rhodesianum MB92 UFL | 1,786 |
|  Hyphomicrobium sp MB61 UFL | 1,583 |
|  Methylobacterium rhodesianum B237 UFL | 1,504 |
|  Methylobacterium rhodinum MB161 UFL | 1,42 |
|  Lactobacillus saerimneri DSM 16027 DSM | 1,32 |
|  Nocardioides simplex DSM 20130T DSM | 1,245 |
|  Staphylococcus fleurettii DSM 13212T DSM | 1,157 |
|  Lactobacillus suebicus DSM 5007T DSM | 1,125 |
|  Escherichia coli ESBL EA RSS 1528T CHB | 1,075 |

Doplňující informace o skóre lze zobrazit kliknutím pravého tlačítka myši na záhlaví tabulky **Spektrum Scores** a výběrem požadované možnosti v kontextovém menu.

Grafické zobrazení míry shody mezi vzorkem a zvýrazněným seznamem referenčních píků lze nalézt v okně **Identification View**.

³Maximální počet zobrazených případů shody lze změnit pomocí příkazů **Tools > Options > General Settings > Result Display** a vybráním požadovaného maximálního počtu nalezených skóre (**Maximum Number of Scores Retrieved after Match**).

⁴Prahové hodnoty barevného kódování skóre lze uživatelsky nastavit pomocí příkazů **Tools > Options > General Settings > Result Display > MSP Identification > Result Thresholds**.













Seznam píků spektra neznámého vzorku je zobrazen v horní polovině tohoto grafu. Zbarvení těchto píků odráží míru jejich shody s referenčním MSP (zelená = plná shoda, žlutá = částečná shoda, červená = žádná shoda).




V dolní polovině grafu je v modré barvě zobrazen seznam píků příslušného referenčního MSP (invertní stupnice barevné intenzity).

3.4.4 Subtypizace úzce příbuzných mikroorganismů

Subtypizace uživatelům umožňuje rozlišit úzce příbuzné mikroorganismy (např. jednotlivé kmeny v rámci stejného druhu). Subtypizaci lze provést pouze tehdy, jsou-li k dispozici subtypizační hlavní spektra (MSPs) (viz část 3.3.5.4).

Znaménko plus u markeru kódování v barvách dopravních signálů indikuje, že pro porovnání shody lze tuto subtypizační klasifikaci provést.











| Detected Species | Log(Score) |
|--|------------|
|  Acetobacter pasteurianus B208 UFL | 3 |
|  Acetobacter pasteurianus ssp pasteurianus B214 UFL | 2,272 |
|  Burkholderia cepacia DSM-7288T HAM | 1,468 |
|  Burkholderia cepacia ATCC 254 | |
|  Burkholderia cepacia MB 7544 | |
|  Candida lusitanae[ana] [Clavisp | |
|  Burkholderia cepacia LMG 2161 | |
|  Sphingobacterium spiritivorum DS | |
|  Burkholderia tuberum LMG-2144 | |
|  Burkholderia cepacia group 1887 | |

| |
|--|
|  Acetobacter pasteurianus |
|  Acetobacter pasteurianus |
|  Burkholderia cepacia DSM |

Subtypizační klasifikaci lze zahájit buď opalovaným kliknutím na výsledek uvedený v tabulce obsahující skóre hodnocení spekter/MSP anebo výběrem příkazu **View Sub-Scoring** z kontextového menu.

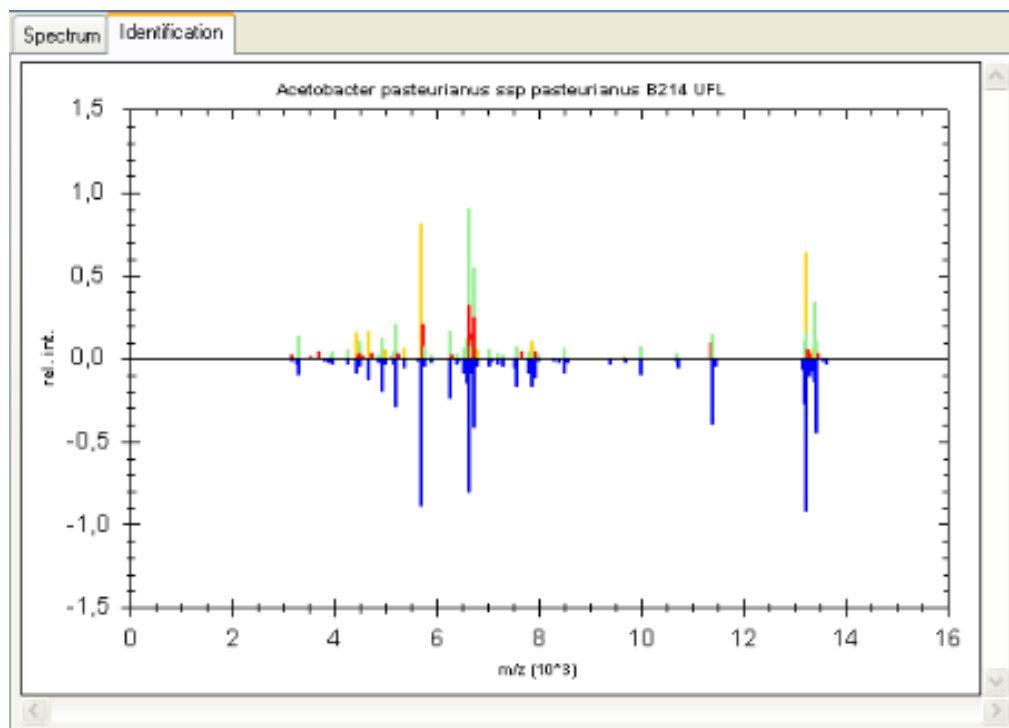
Při subtypizaci se v datových souborech úzce příbuzných organismů hmotnosti rozlišovacích píků zvyšují zatímco hmotnosti společných píků klesají.

Výsledek subtypizační klasifikace je zobrazen v tabulce **Sub-MSP Scores**.

| Detected Species | Log(Score) |
|---|------------|
|  Listeria welshimeri DSM 20650T DSM | 2,374 |
|  Listeria monocytogenes ser48 ATCC 19115 THL | 1,883 |
|  Listeria monocytogenes MB 1601 05 THL | 1,635 |
|  Listeria ivanovii ssp londoniensis DSM 12491T DSM | 1,606 |
|  Listeria monocytogenes DSM 20600T DSM | 1,549 |
|  Listeria monocytogenes Mb19348 1 CHB | 1,459 |
|  Listeria ivanovii ssp ivanovii DSM 20750T DSM | 1,383 |
|  Listeria seeligeri DSM 20751T DSM | 1,119 |
|  Listeria innocua DSM 20649T DSM | 0,951 |
|  Listeria grayi DSM 20596 DSM | <0 |

| | | | |
|---------------------|-------------|----------------------|---------------------|
| Selected MSP (3741) | Current MSP | Spectrum Scores (10) | Sub-MSP Scores (10) |
|---------------------|-------------|----------------------|---------------------|

Identifikační náhled zobrazuje shodu (familial match) mezi vzorkem a seznamem referenčních píků.



3.4.5 Generování zprávy o výsledcích klasifikace

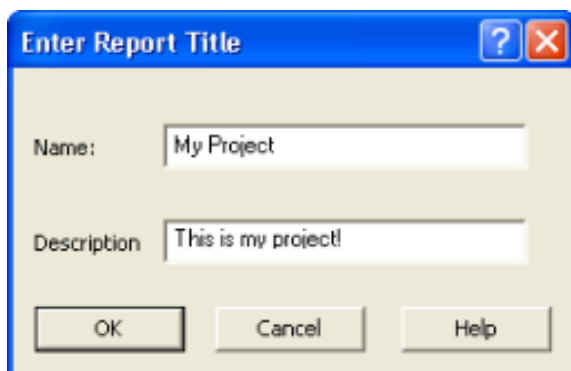
Podrobnou zprávu o výsledcích klasifikace lze vygenerovat po každé dílčí klasifikaci.

Tato zpráva obsahuje stejné informace jako ty, které jsou vygenerovány při použití programu **MALDI Biotyper RTC** (viz část 2.17).

Chcete-li vygenerovat zprávu o výsledcích klasifikace:

1. V náhledu souboru (**File View**) klikněte pravým tlačítkem myši na požadovaná spektra / MSP a v kontextovém menu zvolte příkaz **Create Report**.

Tím se otevře dialog **Enter Report Title**.



2. Použijte příkazy **Name** a **Description** (nepovinné).
3. Kliknutím na **OK** zprávu vytvoříte a otevřete ji ve standardním prohlížeči.

Na lokálním pevném disku jsou klasifikační zprávy uloženy jako <projectname>.html následujícím způsobem:

```
C:\Documents and Settings\\Application Data\Bruker  
Daltonik\MALDIBiotyperAutomationControl\HtmpResults
```

Při každém vytvoření nové zprávy je stávající HTML soubor přepsán.

3.5 Taxonomické dendrogramy a knihovny MSP

V programu **MALDI Biotyper** mohou být hlavní spektra sdružována pomocí dvou odlišných struktur:

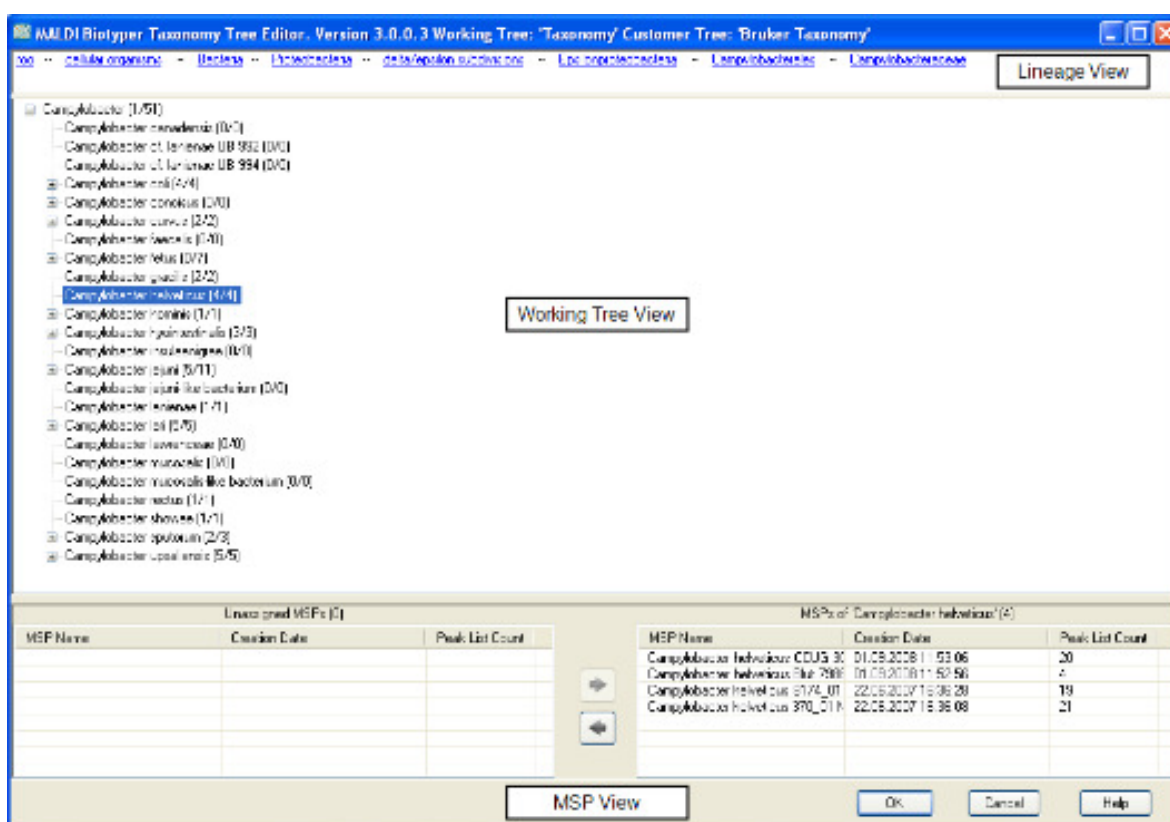
- **Taxonomické dendrogramy** jsou kolekcemi těch MSP, která lze přiřadit k těm hierarchicky seřazeným taxonovým uzlům, jejichž uspořádání a názvy jsou odvozeny od taxonomického dendrogramu NCBI. Každá instalace softwaru **MALDI Biotyper** poskytuje dva taxonomické dendrogramy:
 - o Taxonomický — tento dendrogram je určen pouze pro čtení a obsahuje všechny uzly taxonomického dendrogramu NCBI.
 - o Taxonomický firmy Bruker— podsoubor taxonomického dendrogramu NCBI, který obsahuje více než 3 700 hlavních spekter.
- **Knihovny MSP** — uživatelem definované nehierarchické sbírky hlavních spekter. Tyto kolekce lze použít při snaze omezit klasifikační vyhledávání určité skupiny hlavních spekter.

3.5.1 Editor taxonomického dendrogramu MALDI Biotyper

Tyto taxonomické dendrogramy jsou vytvářeny ve třech krocích (etapách):

- Vytvoření taxonomického dendrogramu.
- Přidání uzlů do taxonomického dendrogramu.
- Přidání hlavních spekter do uzlů.

Taxonomické dendrogramy jsou vytvářeny a editovány pomocí editoru **MALDI Biotyper Taxonomy Tree**.



Editor taxonomického dendrogramu má tři části/náhledy (views). Relativní výšky těchto náhledů lze měnit tak, že kurzorem popotáhujeme jejich horizontální okraje.

- **Kmenový náhled (Lineage View):** Tento náhled zobrazuje pozici taxonomického uzlu tvořícího kořen momentálně aktivního kmene v náhledu funkčního dendrogramu (**Working Tree View**). Kliknutím na určitý taxon

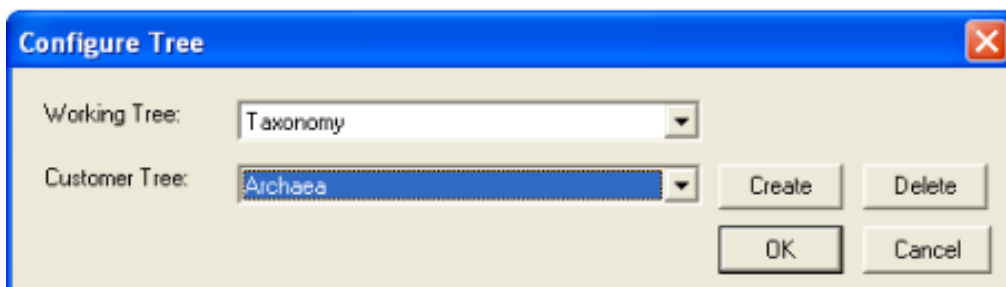
nacházející se kmenovém náhledu se nastartuje funkční kmen ve zvoleném vyšším uzlu taxonu.

- **Náhled funkčního kmene (Working Tree View):** Tento náhled obsahuje momentálně aktivní kmen (výrobce nastaveno jako 'Taxonomický kmen' určený pouze ke čtení). Celkový počet MSP přiřazených ke každému taxonomickému uzlu a jeho uzlům dceřinným je uveden v závorkách.
- **Náhled MSP:** Tento náhled obsahuje dvě tabulky. Na levé straně je uveden seznam těch MSP, která jsou dostupná v databázi programu **MALDI Biotyper** a nejsou momentálně přiřazena k žádnému z taxonových uzlů. Na straně pravé jsou pak zobrazena všechna spektra, která jsou přiřazena k taxonomickým uzlům vybraným v daném funkčním dendrogramu. Každé MSP je v seznamu uvedeno s příslušným názvem, datem vytvoření a počtem piků, jež byly k jeho vytvoření použity.

Aby bylo možno taxonové uzly mezi kmene navzájem kopírovat, jsou v editoru taxonomického dendrogramu (**Taxonomy Tree Editor**) uvedeny odkazy jak na momentálně aktivní (funkční) kmen, tak také na kmen vzdálený (uživatelský).

Je-li editor spuštěn, je kmen '**Taxonomy**' nastaven jako dendrogram pracovní (**Working Tree**) a momentálně zvolený náhled dendrogramu taxonomického (**Taxonomy Tree View**) je nastaven jako dendrogram uživatelský.


Oba tyto dendrogramy jsou definovány v dialogu **Configure Tree**.




3.5.2 Vytváření a užívání taxonomických dendrogramů

Vytvoření taxonomického dendrogramu

1. V seznamu **Taxonomy Tree View** zvolte požadovaný dendrogram.


2. Pravým tlačítkem myši klikněte na taxonový nodus a buď zvolte nabídku **Start Taxonomy Tree Editor** anebo klikněte na .
3. Pak klikněte na hlavní část editoru (**Taxonomy Tree Editor**) a z kontextového menu vyberte nabídku **Configure**.
4. Klikněte na nabídku **Create**, vložte název nového dendrogramu do dialogu **Create New Customer Tree** a klikněte na **OK**.
5. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.

Chcete-li do taxonomického dendrogramu přidat další (dceřinný) uzel (toto lze provést pouze v projektovém dendrogramu)

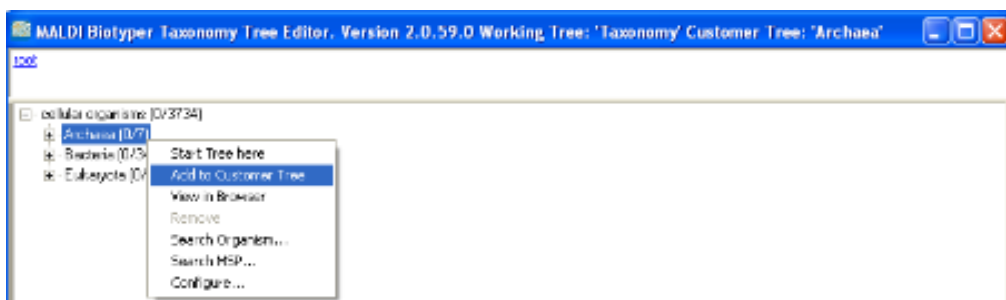
1. V seznamu **Taxonomy Tree View** zvolte požadovaný dendrogram.
2. Klikněte na taxonový nodus a buď zvolte příkaz **Start Taxonomy Tree Editor** nebo klikněte na .
3. Pak klikněte pravým tlačítkem myši na původní (parent) nodus a v kontextovém menu zvolte nabídku **New Node**.
4. Vložte název nového nodu a stiskněte **Enter**.
5. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.

Poznámka: Nový dceřinný nodus je uživatelského dendrogramu přidán automaticky tehdy, je-li určité hlavní spektrum v NCBI dendrogramu přiřazeno ke správnému (odpovídajícímu) uzlu.

Chcete-li do taxonomického dendrogramu přidat některý již existující nodus

1. V seznamu **Taxonomy Tree View** vyberte ten dendrogram, který tento uzel obsahuje.
2. Na příslušný taxonový nodus klikněte a buď zvolte příkaz **Start Taxonomy Tree Editor** anebo klikněte na .
3. Klikněte na hlavní část editoru (**Taxonomy Tree Editor**) a vyberte v kontextovém menu příkaz **Configure**.
4. V dialogu **Configure Tree** definujte momentálně aktivní (**Working**) a cílový (**Customer**) dendrogram a klikněte na **OK**.
5. V hlavní části editoru taxonomického dendrogramu přejděte na požadovaný uzel.

6. Klikněte na něj a v kontextovém menu zvolte nabídku **Add to Customer Tree**.




7. Kroky 5 a 6 opakujte u každého nodu, který chcete přidat do cíkového (**Customer**) dendrogramu.

Dceřinné uzly je třeba přidávat odděleně. Při přidávání taxonového nodu je zcela jedno, zda k němu již MSP bylo přiřazeno.

Za určitých okolností jsou taxonové uzly přidávány zcela automaticky, bez použití příkazu **Add to Customer Tree**. Přiřazením určitého MSP k taxonovému nodu nenacházejícímu se v uživatelském dendrogramu se automaticky přidává i tento nodus.


8. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.

Přejmenování nodu (toto lze provést pouze v projektovém dendrogramu)

1. V seznamu **Taxonomy Tree View** vyberte požadovaný taxonomický dendrogram.
2. Pravým tlačítkem myši klikněte na určitý taxonový uzel a buď zvolte nabídku **Start Taxonomy Tree Editor** anebo klikněte na .
3. Pravým tlačítkem myši klikněte na požadovaný nodus a v kontextovém menu zvolte příkaz **Rename Node**.
4. Vložte nový název nodu a stiskněte **Enter**.
5. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.

Chcete-li určitý nodus z taxonomického dendrogramu odstranit (toto lze provést pouze v projektovém a cílovém dendrogramu)


1. V seznamu **Taxonomy Tree View** vyberte dendrogram, jenž obsahuje nodus, který má být odstraněn.

2. Pravým tlačítkem myši klikněte na tento uzel a buď zvolte příkaz **Start Taxonomy Tree Editor** nebo klikněte na .
3. V hlavní části editoru taxonomického dendrogramu přejděte na nodus, který má být odestraněn.
4. Odstraňovaný nodus zcela otevřete (expand).
5. Pravým tlačítkem myši klikněte na subnodus nejnižší úrovně a v kontextovém menu zvolte příkaz **Remove**.
6. Krok 5 opakujte až do okamžiku, kdy je požadovaný nodus odstraněn.
7. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.

Poznámka: Odstraněním nodu z uživatelského dendrogramu se jeho přidružené hlavní spektrum (MSP) v NCBI dendrogramu nevymazává.


Poznámka: Má-li být nodus z projektového dendrogramu odstraněn, musí být prázdný.

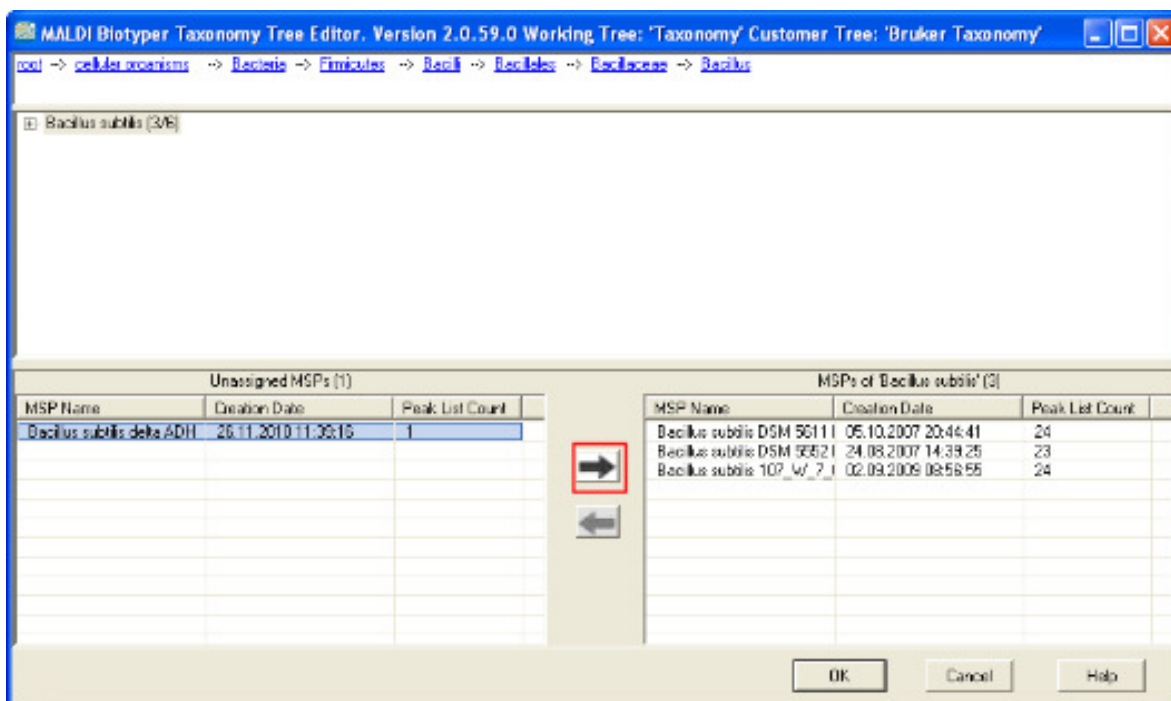
Přidání nepřřazeného MSP k určitému nodu

1. V seznamu **Taxonomy Tree View** vyberte požadovaný dendrogram.
2. Pravým tlačítkem myši klikněte na tento uzel a buď zvolte příkaz **Start Taxonomy Tree Editor** anebo klikněte na .

3. V hlavní části editoru taxonomického dendrogramu přejděte na požadovaný nodus.

Hlavní spektra, jež jsou momentálně v tomto nodu uložena, jsou uvedena v tabulce **MSPs of '<node name>'**. Nepřřazená MSP jsou uvedena v tabulce **Unassigned MSPs**.

4. Nepřřazené MSP přesuňte ze seznamu **Unassigned MSPs** do tabulky **MSPs of '<node name>'** tak, že je vyberete a kliknete na .



5. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.


Odstranění MSP z nodu

1. V seznamu **Taxonomy Tree View** vyberte požadovaný dendrogram.
2. Pravým tlačítkem myši klikněte na tento uzel a buď zvolte příkaz **Start Taxonomy**

Tree Editor nebo klikněte na .

3. V hlavní části editoru taxonomického dendrogramu přejděte na požadovaný nodus.
4. Požadovaný nodus přesuňte do hlavní části editoru.

Ta MSP, která se v daném okamžiku v nodu nacházejí, jsou uvedena v tabulce **MSPs of '<node name>'**.


4. MSP přesuňte z tabulky **MSPs of '<node name>'** do tabulky **Unassigned MSPs** tak, že je vyberete a klikněte na .
5. Kliknutím na **OK** editor taxonomického dendrogramu zavřete.

3.5.3 Odstranění taxonomického dendrogramu

Nežádoucí taxonomické dendrogramy lze z databáze odstranit.

Poznámka Dendrogram projektů ('Projects') a dendrogram NCBI ('Taxonomy') odstranit nelze.



Taxonomický dendrogram se odstraní následujícím způsobem:

1. Pravým tlačítkem myši klikněte na nodus taxonu a buď vyberte nabídku **Start Taxonomy Tree Editor** anebo klikněte na .
2. Pravým tlačítkem myši klikněte na hlavní část editoru taxonomického dendrogramu (**Taxonomy Tree Editor**) a v kontextovém menu zvolte nabídku **Configure**.
3. V dialogu **Configure Tree** definujte nežádoucí dendrogram jako destinační (uživatelský) dendrogram a klikněte na **Delete**.
4. Editor taxonomického dendrogramu zavřete kliknutím na **OK**.

3.5.4 Vytváření a používání knihoven MSP

Knihovny MSP představují pohodlný způsob jak se dostat k určité skupině hlavních spekter, např. v případě, že chceme zúžit proces klasifikačního vyhledávání určité skupiny mikroorganismů. Obsah knihoven MSP je spravován pomocí údajů vkládaných do tabulky **Selected MSPs**, která se nachází v **Table View**.


Vytvoření knihovny MSP

1. Kliknutím pravého tlačítka myši na název MSP uvedený v tabulce Current MSP přesuňte jednotlivá hlavní spektra do tabulky vybraných MSP (Selected MSP) a buď použijte příkaz **Add to MSP Selection** anebo klikněte na .
2. V tabulce vybraných MSP zvolte požadovaná hlavní spektra tím, že na ně kliknete pravým tlačítkem myši a pak v kontextovém menu zvolíte nabídku **Save MSP Library**. Jinou možnost představuje výběr požadovaných MSP a kliknutí na .
3. Do dialogu **Save MSP Library** napište název (**Name**) a opční popis (**Description**) MSP.

Vložení nového názvu MSP je stávající knihovna těchto spekter přepsána.

4. Knihovnu uložíte kliknutím na **OK**.

Natažení (nahrání) knihovny MSP

1. Pravým tlačítkem myši klikněte na tabulku **Selected MSPs** a v kontextovém menu zvolte příkaz **Load MSP Library**. jinou možností je kliknout na .
2. Požadovanou knihovnu natáhnete buď:
 - a. dDvojím kliknutím na požadovanou knihovnu v dialogu **Load MSP Library**
ANEBO
 - b. vybráním požadované knihovny a kliknutím na **OK**.


Hlavní spektra (MSPs) obsažená ve vybrané knihovně pak jsou vložena do tabulky vybraných MSP (**Selected MSPs table**).

3.6 MSP dendrogramy

Podobně jako matice CCI (viz **část 3.8**), ukazují i MSP dendrogramy do jaké míry jsou si jednotlivé mikroorganismy navzájem podobné/blízké. V rámci procesu, který se podobá porovnávání neznámých spekter s knihovnou MSP je porovnáním hlavních spekter s knihovnou MSP vytvořen dendrogram. V tomto dendrogramu je míra vzájemné podobnosti jednotlivých mikroorganismů stanovena na základě jejich předem stanovené podobnosti či nepodobnosti (arbitrary distance level).

3.6.1 Vytvoření MSP dendrogramů

Chcete-li MSP dendrogram vytvořit

1. Klikněte pravým tlačítkem myši na název MSP uvedený v tabulce **Current MSP**, přesuňte je to tabulky **Selected MSP** a zvolte příkaz **Add to MSP Selection**. Alternativní možností je přesunout všechna aktuální hlavní spektra (pouze horizontální transfokaci) kliknutím pravého tlačítka myši do uzlu (node) nepřirazených MSP (**Unassigned MSP**) a zvolit příkaz **Add Hierarchy to MSP Selection** nebo kliknutím na .

Možnost: Definování identifikační metody MSP použité během klasifikace je možné buď pomocí příkazů:

- a. **Action > Identification > Edit Method** anebo příkazů
- b. **Edit > Method > MSP Identification.**


Možnost: Metodu vytvoření MSP dendrogramu lze zvolit buď pomocí příkazů:

- a. **Action > MSP Dendrogram > Edit Method** anebo příkazů
- b. **Edit > Method > MSP Dendrogram Creation .**

Možnost: Zvolte příkazy **Tools > Options > General Settings > Dendrogram** a vložte nastavení požadovaného dendrogramu.

2. Požadovaná MSP zvýrazněte.

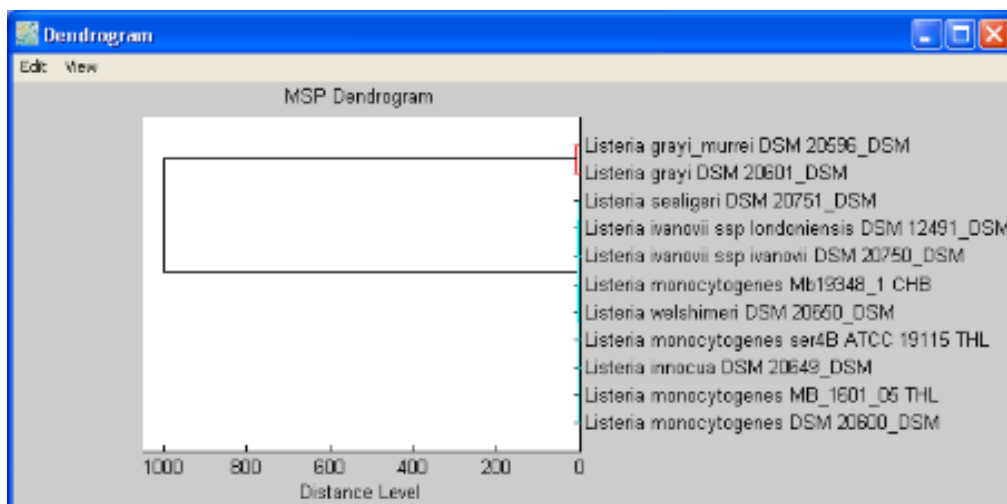
K vytvoření dendrogramu je zapotřebí nejméně tři MSP.

3. Zvolte příkazy **Action > MSP Dendrogram > View**. Jinou možnost představuje kliknutí pravým tlačítkem myši na zvýrazněná hlavní spektra a volba příkazu **View MSP Dendrogram** v kontextovém menu či kliknutí na  v panelu nástrojů **Table View**.

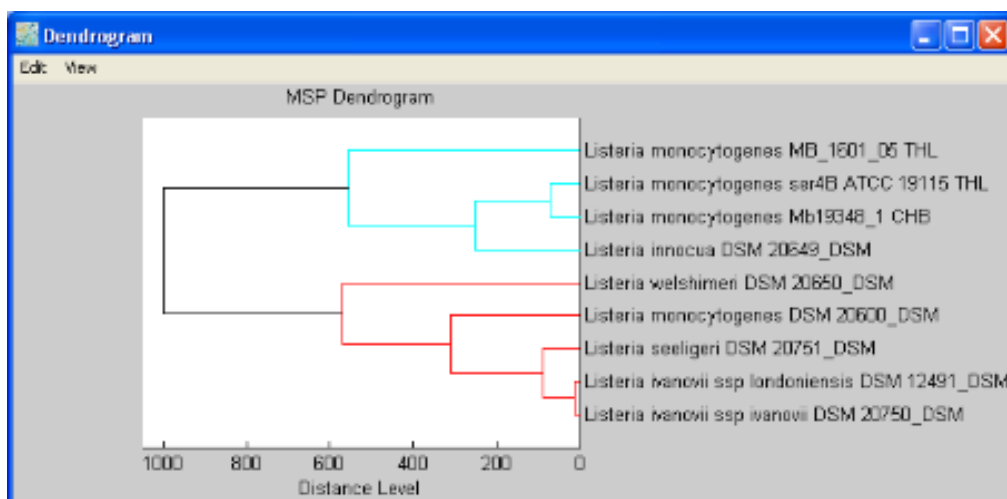
3.6.2 Zobrazení MSP dendrogramů

MSP dendrogram je zobrazen v okně s názvem Dendrogram. V daném dendrogramu jsou distance normalizovány na maximální hodnotu 1000, což znamená, že tyto distance jsou relativní a nelze je při srovnávání dendrogramů použít.

V níže uvedeném příkladu je ukázáno, jak byl příslušný MSP Dendrogram použit k vytvoření *Listeria* CCI matrix (viz část 3.8.4). V dendrogramu jsou viditelné i dva klastry, které byly pomocí analýzy CCI matrix identifikovány.




Detailnější vztahy lze zkoumat na základě výběru hlavních spekter nacházejících se v jednom klastru a vytvoření nového dendrogramu.



Transfokace a sledování dendrogramů

Chcete-li aktuální dendrogram měnit nebo s ním manipulovat, vyberte v menu **View** příkazy **Zoom** nebo **Pan**.


Transfokaci dendrogramu lze provést vybráním příkazů **View > Zoom** a posunutím kurzoru myši na požadované políčko (plot). Tím se zobrazí pod kurzorem zoom . Posuňte kurzor na požadovaný výchozí bod, klikněte a táhněte kurzorem směrem k požadovanému cílovému bodu. Ve zvolené oblasti stisk tlačítka uvolněte a požadovanou transfokaci proveďte.

Transfokační kroky jsou skládány na sebe samostatně pro každé políčko, což umožňuje postupné zvětšování náhledu pomocí příkazu **Zoom Out** uvedeného v kontextovém menu.

Dvojitým kliknutím levého tlačítka myši a nebo výběrem příkazu **Reset to Original View** v kontextovém menu původní náhled obnovíte.

V době, kdy je příkaz **Zoom** aktivní, klikněte pravým tlačítkem myši se v dendrogramu otevře kontextové menu, které obsahuje následující příkazy:

| Příkaz | Funkce |
|---|--|
| Zoom Out (Zvětšit) | Postupné zvětšování. |
| Reset to Original View (Resetovat původní náhled) | Obnoví původní náhled. |
| Zoom Options > (Možnosti transfokace >) | |
| Unconstrained Zoom (Disproporční transfokace) | Umožní disproporční transfokaci. |
| Horizontal Zoom (Horizontální transfokace) | Umožní pouze horizontální transfokaci. |
| Vertical Zoom (Vertikální transfokace) | Umožní pouze vertikální transfokaci. |

Chcete-li určitý dendrogram sledovat, zvolte příkaz **View > Pan** a kurzor myši přesuňte na požadovaný dendrogram. Po tomto kroku se objeví sledovací kurzor (pan cursor) . Po kliknutí lze příslušný diagram přesunovat (táhnout) v požadovaném směru.

Původní náhled lze obnovit buď dvojitým stikem levého tlačítka myši anebo zvolením příkazu **Reset to Original View**, který se nachází v kontextovém menu.

3.7 Klastrování spekter pomocí analýzy hlavních komponent (PCA)

Program **MALDI Biotyper** umožňuje analýzu hlavních komponent (**Principal Component Analysis**) jednotlivých souborů spekter. Tato statistická analýza poskytuje informaci o heterogenitě či homogenitě určitého souboru dat. Program PCA

je řízen externím softwarovým nástrojem MATLAB, který je do programu **MALDI Biotyper** integrován.

3.7.1 PCA hmotnostních spekter

Cílem PCA je redukovat rozměrnost toho souboru dat, v němž existuje velký počet vzájemně propojených a na sobě závislých proměnných, které si zachovávají svoji různorodost.

V rámci **MALDI Biotyper** analýzy, se soubor dat skládá z hmotnostních spekter získaných od různých druhů mikroorganismů. V hmotnostních spektrech představují intenzity jednotlivých m/z poměrů odpovídající proměnné. Program PCA vypočte nový systém koordinát, který může být vyjádřen jako lineární kombinace původních proměnných (mass-to-charge ratios m/z). Tímto způsobem lze hlavní trendy dat identifikovat.

Analýza PCA je založena na dekompozici kovariance vlastních hodnot/vlastních vektorů anebo korelačních matic původních proměnných. Příslušná data lze adekvátně popsat pomocí mnohem menšího počtu vzdálených koordinát (hlavních komponent) než při použití původních proměnných.

PCA je používána hlavně jako metoda redukce dat a jako nástroj vizualizace. Vynesení dat do systému souřadnic, který je založen na principiálních komponentách, často objasňuje ty vztahy a klastry, které by při použití souřadnic původních nebyly zřejmé.

3.7.2 Klastrování pomocí PCA

Klastrování **pomocí MALDI Biotyper PCA** se skládá ze tří různých kroků, z nichž každý představuje samostatnou metodou zpracování:

- Předběžné zpracování dat
- Tvorba PCA
- PCA klastrování

Výsledky PCA klastrování lze zobrazit dvěma různými způsoby:

- Vynesením a uložením hodnot skóre (Scores and loading plots) (viz část 3.7.3.1)
- Klastrováním dendrogramů (viz část 3.7.3.2)

V závislosti na požadovaném náhledu musí být příslušná metoda PCA klastrování (**PCA Clustering Method**) definována v následujících dvou krocích.

Vlastní PCA klastrování

1. V okně Náhled souboru (**File View**) natáhněte a zvýrazněte ta hrubá spektra, která mají být k PCA použita (viz část 3.2.1). Pro PCA klastrování anebo pro tvorbu dendrogramu je zapotřebí použít nejméně tři spektra.

Možnost: Metodu předběžného zpracování definujte buď příkazy:

- a. **Action > Preprocessing > Edit Method** anebo příkazy
- b. **Edit > Method > Preprocessing**.

Doporučenou metodou předběžného zpracování je metoda **BioTyper Preprocessing Standard Method PCA**.

Možnost: Metodu tvorby PCA definujte buď příkazy:

- a. **Action > PCA > Edit Creation Method** anebo příkazy
- b. **Edit > Method > PCA Creation**.

Doporučenou metodou tvorby PCA je **BioTyper PCA Creation Standard Method**.

2. Metodu PCA klastrování vyberte následujícím způsobem.
 - a. **Zobrazení výsledků pomocí skóre a vnesených dat (loading plots)** — PCA klastrování definujte buď pomocí příkazů **Action > PCA > Edit Clustering Method** anebo příkazů **Edit > Method > PCA Clustering**. Doporučenou metodou PCA klastrování pro generování skóre a vnesení dat je **BioTyper PCA Clustering Standard Method**.
 - b. **Zobrazení výsledků ve forme klastrovacího dendrogramu** — PCA klastrování definujte buď pomocí příkazů **Action > PCA > Edit Clustering Method** anebo příkazů **Edit > Method > PCA Clustering**. Doporučenou metodou PCA klastrování pro generování klastrovacích dendrogramů je **BioTyper PCA Clustering Standard Method**.
3. PCA klastrování začněte takto:.

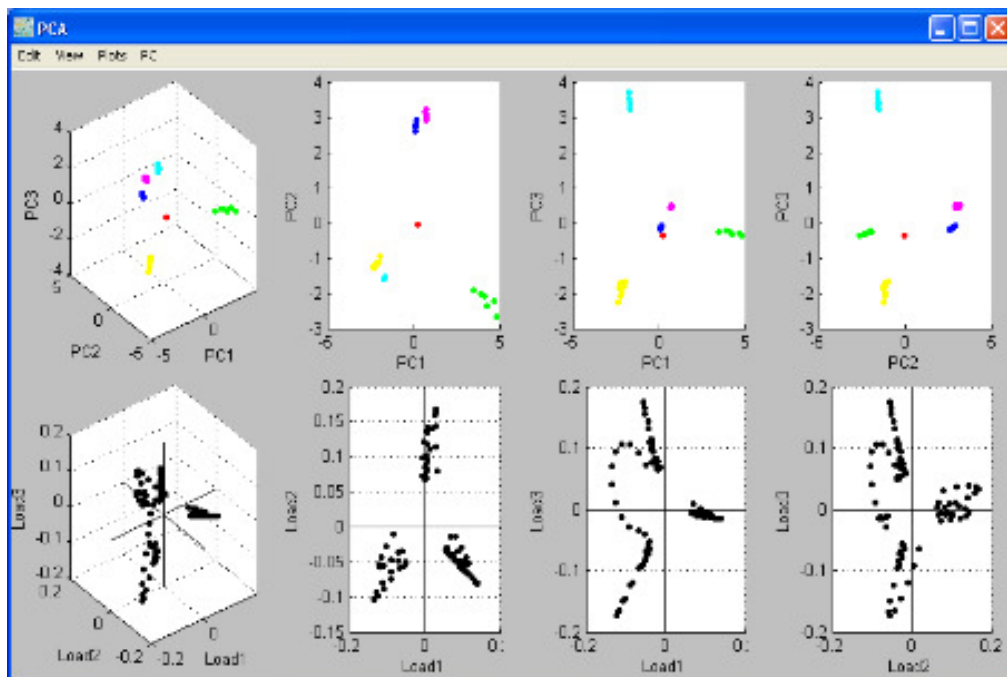
- a. Chcete-li výsledky zobrazit jako skóre a vynesené hodnoty, zvolte příkazy **Action > PCA > View Clustering**.
- b. Chcete-li výsledky zobrazit jako klastrovací dendrogram, použijte příkazy **Action > PCA > View Dendrogram**.

Stavová lišta v dolní části okna programu **MALDI Biotyper** zobrazuje informaci **Batch Processing**, která indikuje, že klastrování pomocí PCA probíhá. PCA okno se otevře po několika sekundách.

3.7.3 Zobrazení výsledků klastrování pomocí PCA

3.7.3.1 Skóre a grafy vynesených hodnot (Loadings Plots)

Hlavní okno PCA obsahuje osm různých trojrozměrných a dvourozměrných (3D and 2D) grafů; čtyři grafy zobrazující skóre a čtyři grafy zobrazující data. Každý z těchto osmi grafů může být prohlížen samostatně po zvolení relevantní nabídky v menu grafů okna PCA.



Ve výrobním nastavení se skóre a vložená data vztahují k prvním třem hlavním komponentám, které jsou označeny jako PC1, PC2 a PC3. Tyto hlavní komponenty obvykle postačují k vyjádření (popisu) převážné části variance určitého datového souboru. Celkový počet hlavních komponent je závislý na použité metodě PCA.

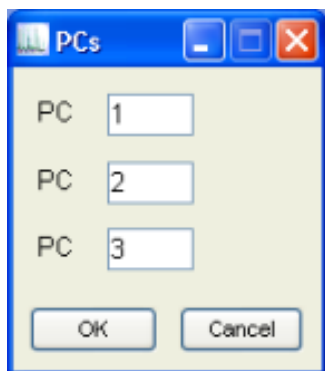
Horní část okna PCA obsahuje čtyři grafy skóre; jeden trojrozměrný graf (3D plot) s vynesáním hodnot PC1 vs. PC2 vs. PC3 a tři grafy dvourozměrné (2D plots). Každý jednotlivý bod těchto grafů představuje jedno spektrum. Tyto body (spektra) jsou automaticky přiřazovány ke klastrům, jejichž data (members) mají společnou barvu.

Dolní část okna PCA obsahuje čtyři grafy dat; jeden trojrozměrný graf (3D plot) s vynesáním hodnot Load1 vs. Load2 vs. Load3 a tři grafy dvourozměrné (2D plots). Každý jednotlivý bod těchto grafů představuje jeden pík ze seznamu píků analyzovaných spekter a indikuje do jaké míry se hlavní komponenty vztahují k původním píkům. Čím je vzdálenost píku od začátku větší, tím větší je také jeho podíl na varianci datového souboru.

Jednotlivé grafy mohou být v samostatných oknech zobrazeny pomocí volby odpovídajícího příkazu v menu grafů (**Plots** menu).

Volbou příkazů **View > Mark Data Points** se aktivuje značení vynášených dat. Kliknutím levého tlačítka myši na příslušný údaj dojde k jeho zakroužkování a označení buď číslem spektra (grafy skóre) nebo hodnotou m/z (grafy hodnot – loading points). Opakovaným kliknutím se toto označení odstraní.

Ty hlavní komponenty, které byly proti sobě navzájem vyneseny, lze v hlavním okně PCA měnit pomocí tlačítek **PC > PCs**. Požadované hlavní komponenty vložte do políček **PC** a klikněte na **OK**.




Změnou vynesných hlavních komponent se aktualizují všechny grafy zobrazené v hlavním okně. Grafy v ostatních samostatných oknech zůstávají nezměněny.

Chcete-li obsah okna kopírovat do schránky pro použití v jiné aplikaci, použijte příkazy **Edit > Copy**.

Transfokace, sledování a otáčení objektu

Se zobrazeným objektem lze v aktuálním náhledu manipulovat pomocí příkazů **Zoom**, **Pan** nebo **Rotate**, které jsou obsaženy v menu náhledu (**View**).

Při transfokaci ve dvourozměrném grafu zvolte příkazy **View > Zoom** a kurzor myši přesuňte na požadovaný graf. Tím dojde k transfokaci . Kurzor umístěte na požadovaný výchozí bod, klikněte a přetáhněte ho na požadovanou cílovou pozici. Po uvolnění tlačítka myši se zvolená oblast zmenší.


Pro každé z vybraných míst lze transfokační kroky klást postupně na sebe (stacked) pomocí příkazu **Zoom Out**, který se nachází v kontextovém menu.

Velikost původního náhledu obnovíte buď dvojitým kliknutím levého tlačítka myši anebo vybráním příkazu **Reset to Original View** v kontextovém menu.


Jakmile je příkaz **Zoom** aktivní, lze kliknout na dvourozměrný graf pravým tlačítkem myši; tím se zobrazí kontextové menu, které obsahuje následující příkazy:

| Příkaz | Funkce |
|---|--|
| Zoom Out (Zvětšení) | Postupné zvětšování. |
| Reset to Original View (Resetuj původní náhled) | Obnovení původního náhledu. |
| Zoom Options > (Možnosti transfokace >) | |
| Unconstrained Zoom (Disproporční transfokace) | Umožní disproporční transfokaci. |
| Horizontal Zoom (Horizontální transfokace) | Umožní pouze horizontální transfokaci. |
| Vertical Zoom (Vertikální transfokace) | Umožní pouze vertikální transfokaci. |

Panning technika umožňuje přetahovat všechna data obsažená ve dvourozměrném grafu jakýmkoli směrem, což umožňuje čtení dlouhých popisů, jež jsou k datovým bodům připojeny.

Chcete-li s dvourozměrným grafem manipulovat, zvolte příkazy **View > Pan** a přesuňte kurzor myši do požadovaného grafu. Tím se zobrazí manipulační kurzor (pan cursor) . Po kliknutí lze datové body přesunovat v požadovaném směru.

Dvojitým kliknutím na levé tlačítko myši anebo výběrem příkazu **Reset to Original View** v kontextovém menu lze původní zobrazení obnovit.

Příkaz **Rotate** umožňuje manipulaci s trojrozměrnými grafy (tj. jejich otáčení). Chcete-li trojrozměrným grafem otáčet, zvolte příkazy **View > Rotate** a přemístěte kurzor myši do požadovaného grafu. Tím se zobrazí rotační kurzor . Po kliknutí lze grafem otáčet v požadovaném směru.

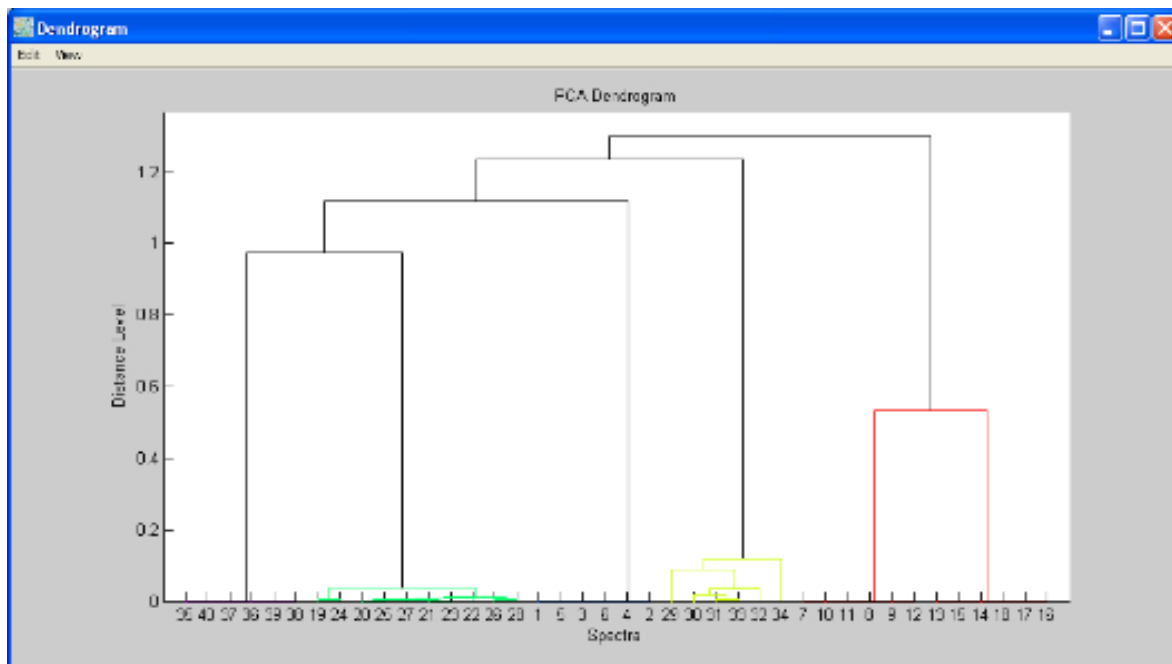
Dvojitým kliknutím na levé tlačítko myši anebo výběrem příkazu **Reset to Original View** v kontextovém menu lze původní zobrazení obnovit.

3.7.3.2 PCA Dendrogramy

Klastrování dendrogramů vyjadřuje vzájemnou příbuznost jednotlivých spekter (uvedených na ose x). Podobně jako u grafů hodnot skóre, jsou i v tomto případě spektra automaticky přiřazována k jednotlivým klastrům, jejichž příslušníci (members) mají stejnou barvu.

PCA dendrogramy lze zobrazit pomocí příkazů, které jsou stejné jako při zobrazování dendrogramů hlavních spekter (viz část 3.6.2).

Původní náhled lze obnovit buď dvojitým kliknutím levého tlačítka myši nebo volbou příkazu **Reset to Original View** v kontextovém menu.



3.8 CCI analýza

Ke statistické analýze vztahů mezi jednotlivými spektry lze použít matici kompozitního korelačního indexu (CCI matrix).

3.8.1 Vytvoření CCI Matrix

Hodnoty CCI se vypočítají na základě rozdělení spekter do jednotlivých nespojitých intervalů a jejich porovnání napříč souborem dat. Složení korelací všech intervalů pak skýtá CCI, jenž se používá jako parameter, který definuje vzdálenost mezi jednotlivými spektry. Hodnota CCI shody rovná 1 vyjadřuje úplnou korelaci, hodnota rovná 0 znamená absenci korelace.

Zvýšením počtu intervalů použitých v výpočtu CCI se zvyšuje i rozlišovací schopnost této analýzy. CCI analýzy programu **MALDI Biotyper** se používají hlavně ke studiu vztahů mezi spektry získanými od úzce příbuzných mikroorganismů. CCI analýzu lze také použít k identifikaci neznámých vzorků na základě porovnání jejich spekter s údaji uvedenými v knihovně známých spekter. Vysoká hodnota CCI shody (>0.9) indikuje silnou korelaci (příbuznost) s referenčním druhem a velmi pravděpodobnou identifikaci.

Chcete-li vytvořit Composite Correlation Index (CCI) matrix

1. V náhledu souboru (**File View**) vyberte ta hrubá spektra, která mají být použita (viz část 3.2.1).

Možnost: Metodu předběžného zpracování lze definovat buď pomocí příkazů:

- a. **Action > Preprocessing > Edit Method** anebo příkazů
- b. **Edit > Method > Preprocessing**.

Doporučenou metodou je metoda **BioTyper Preprocessing Standard Method CCI**.

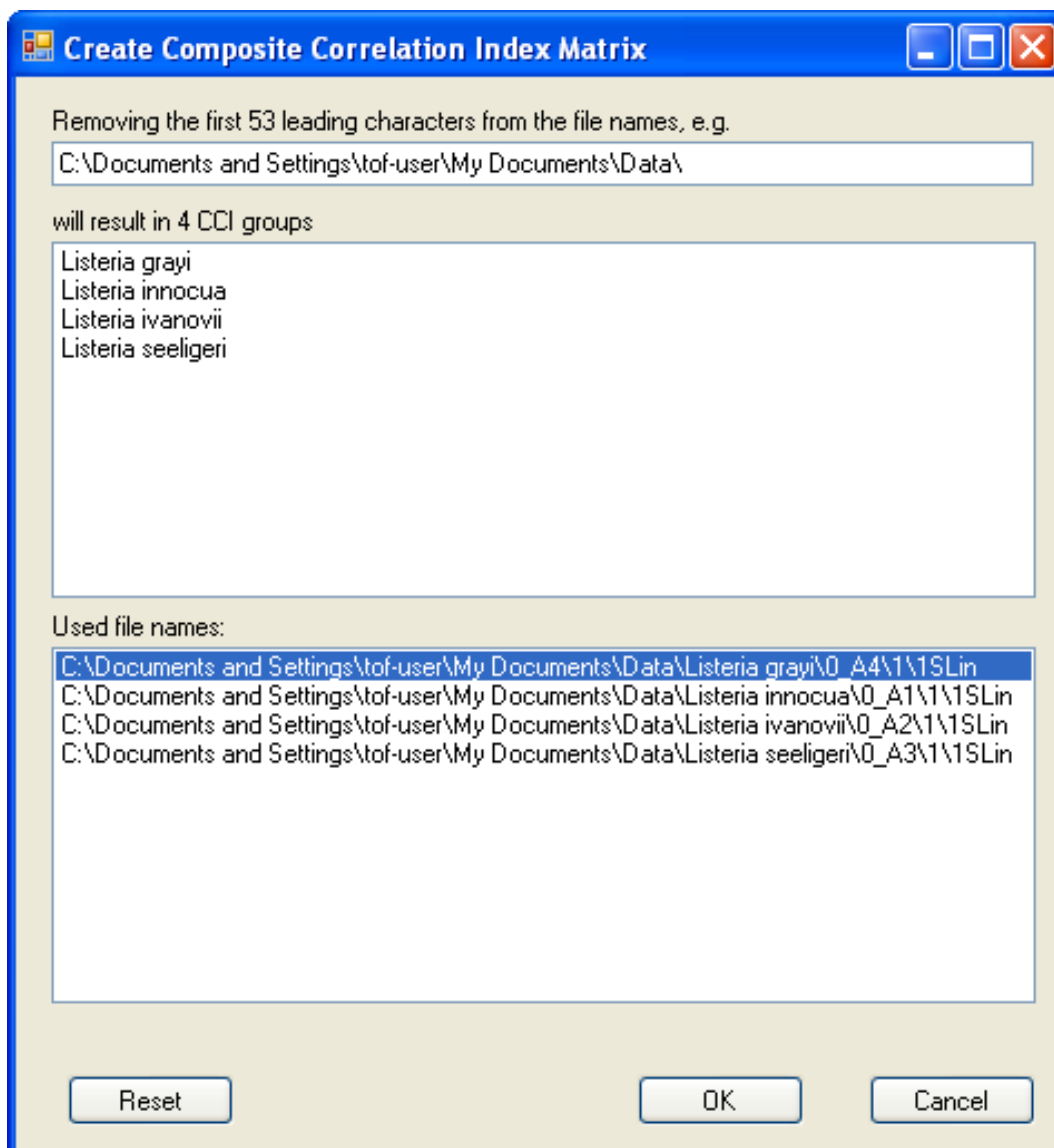
Možnost: Metodu stanovení kompozitního korelačního indexu lze definovat buď pomocí příkazů:

- a. **Action > Composite Correlation Index > Edit Method** anebo příkazů
- b. **Edit > Method > Composite Correlation Index**.

Doporučenou metodou výpočtu CCI je **BioTyper Composite Correlation Standard Method**.

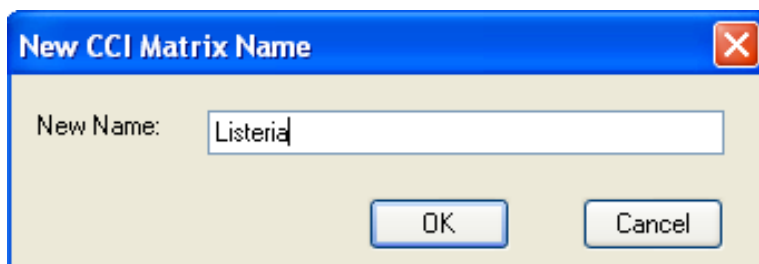
2. Zvolte příkazy **Action > Composite Correlation Index > Create**.

Tím se otevře dialog **Create Composite Correlation Index Matrix**. Je-li třeba, lze hlavní znaky (leading characters) z názvu souboru odstranit tak, že se na příslušné políčko klikne a nežádoucí znaky se odstraní.



3. Zkontrolujte návrh CCI grupování a klikněte na **OK**.

Tím se otevře dialog **New CCI Matrix Name**. Vložení názvu nového CCI dojde k přepsání CCI stávajícího.

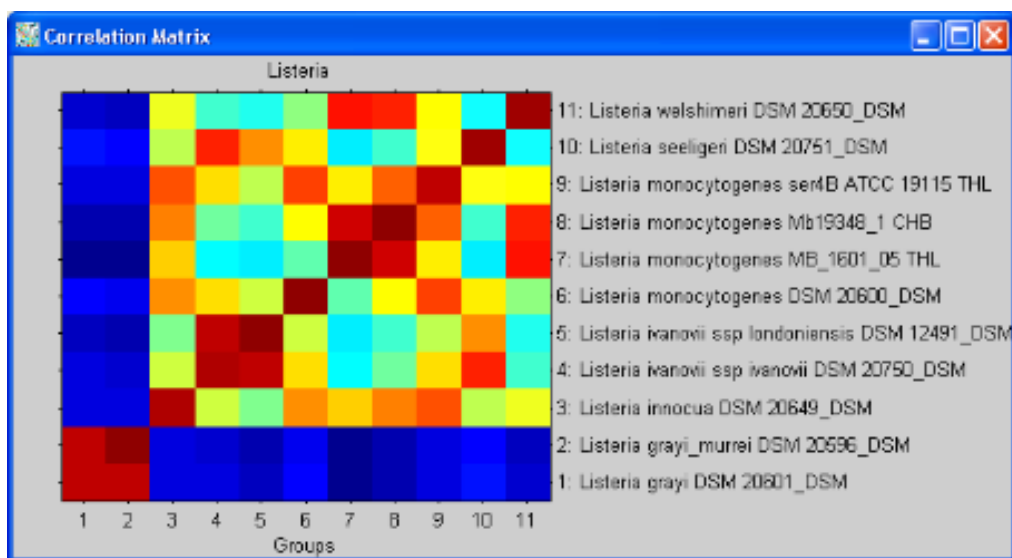


4. Výpočet zahájíte kliknutím na CCI matrix a na **OK** .

Po několika sekundách se okno korelační matrix (**Correlation Matrix** window) otevře.

3.8.2 Zobrazení výsledků CCI

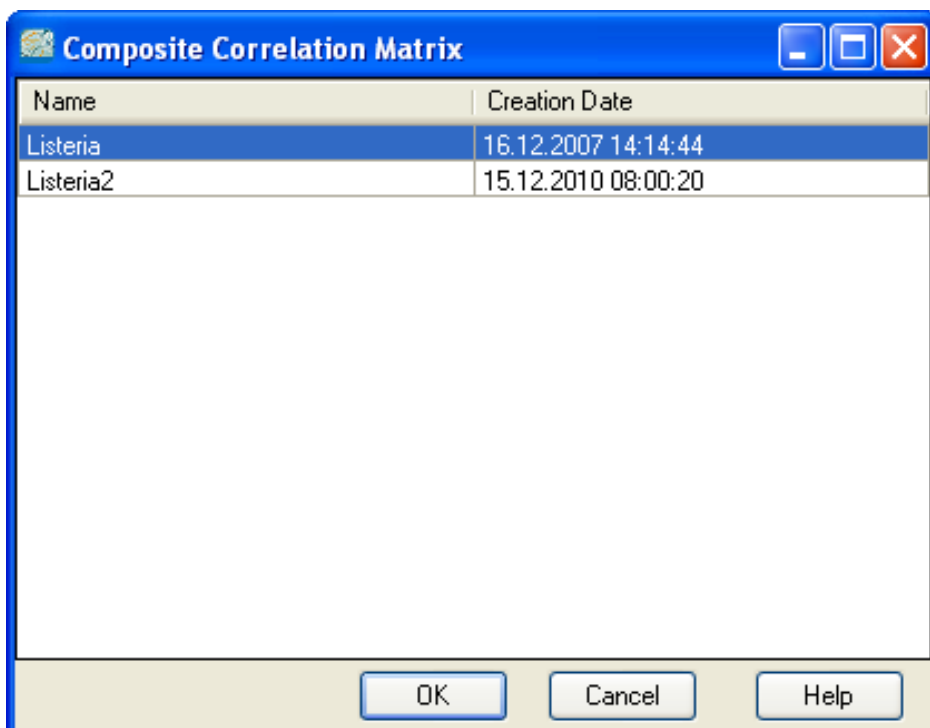
Okno korelační matrix zachycuje mřížku „horké mapy“ ('heat-map' grid). Barva políček v místě průniku dvou různých skupin indikuje míru jejich vzájemné příbuznosti (tmavě červená = horký vztah = těsná příbuznost; modrá = studený vztah = ne příliš těsná příbuznost). Níže uvedený příklad zachycuje dva zřetelně odlišné klastry vygenerované u skupin 1 a 2 (Groups 1 and 2) a u skupin 3 a 11 (Groups 3 and 11).



Zobrazení stávající CCI matrix

1. Zvolte příkazy **Action > Composite Correlation Index > View**.

Tím se otevře dialog **Composite Correlation Matrix**.



2. Požadovanou CCI otevřete buď:

a. dvojným kliknutím na zvolenou CC matrix v dialogu **Composite Correlation Matrix**

ANEBO

b. výběrem požadované CCI matrix a kliknutím na **OK**.

Poznámka: V jednom okamžiku může být zobrazena pouze jedna CCI matrix. Další CCI matrix lze zobrazit až po zavření momentálně otevřeného okna korelační matrix (**Correlation Matrix**).

3.8.3 Provedení CCI klasifikace

CCI matice lze použít při provádění klasifikace neznámého vzorku. Po předběžném zpracování jsou spektra z neznámých vzorků porovnávána s CCI matrix pomocí metody CCI (**Composite Correlation Index Method**).

Provedení klasifikace pomocí CCI matrix

1. Z náhledu souboru (**File View**) stáhněte a vyberte ta hrubá spektra, jež jsou ke klasifikaci učena (viz část 3.2.1).

Možnost: Metodu předběžného zpracování definujte následujícím způsobem. Buď zvolte příkazy:

- a. **Action > Preprocessing > Edit Method** anebo příkazy
- b. **Edit > Method > Preprocessing**.

Doporučenou metodou předběžného zpracování vzorku je metoda **BioTyper Preprocessing Standard Method CCI**.

Možnost: **Metodu** stanovení CCI definujte následujícím způsobem. Buď zvolte příkazy:

- a. **Action > Composite Correlation Index > Edit Method** anebo příkazy
- b. **Edit > Method > Composite Correlation Index**.

Doporučenou metodou stanovení CCI je **BioTyper Composite Correlation Standard Method**.

2. Zvolte příkazy **Action > Composite Correlation Index > Match**.
3. Požadovanou CCI matrix otevřete buď:

- a. dvojitým kliknutím na požadovanou CCI matrix v dialogu **Composite Correlation Index Matrix to be Viewed**

ANEBO












- b. vybráním požadované CCI matrix a kliknutím na **OK**.

Na stavové liště zobrazené v dolní části okna programu **MALDI Biotyper** je zachycen průběh procesu porovnávání (**Composite Correlation Index matching running**), který indikuje, že klasifikace právě probíhá. Výsledky klasifikace a srovnávané hodnoty jsou zobrazeny v tabulce **CCI Scores**, která je zobrazena v náhledu tabulky (**Table View**).

3.8.4 Zobrazení výsledků CCI klasifikace

V tabulce CCI skóre jsou zobrazeny všechny skupiny, které se v CCI matrix nacházejí; tyto skupiny jsou uspořádány v pořadí, které je založeno na míře jejich shody se spektrem neznámého vzorku. Kódování v barvách dopravních signálů tuto míru shody indikuje (zelená = dobrá shoda, červená = špatná shoda)⁵.

V níže uvedeném příkladu byl „neznámý“ vzorek získaný z bakterií druhu *Listeria monocytogenes* klasifikován pomocí matrix Listeria CCI.

| Group Name | Match |
|--|-------|
|  <i>Listeria monocytogenes</i> ser4B ATCC 19115 THL | 0,996 |
|  <i>Listeria ivanovii</i> ssp <i>ivanovii</i> DSM 20750 DSM | 0,933 |
|  <i>Listeria seeligeri</i> DSM 20751 DSM | 0,869 |
|  <i>Listeria ivanovii</i> ssp <i>londoniensis</i> DSM 12491 DSM | 0,788 |
|  <i>Listeria monocytogenes</i> Mb19348 1 CHB | 0,752 |
|  <i>Listeria monocytogenes</i> DSM 20600 DSM | 0,737 |
|  <i>Listeria welshimeri</i> DSM 20650 DSM | 0,682 |
|  <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 DSM | 0,63 |
|  <i>Listeria monocytogenes</i> MB 1601 05 THL | 0,623 |
|  <i>Listeria grayi</i> DSM 20601 DSM | 0,171 |
|  <i>Listeria grayi</i> <i>murrei</i> DSM 20596 DSM | 0,158 |

Selected MSP | Current MSP | CCI Scores (11)

3.9 Uzavření programu MALDI Biotyper OC

Program MALDI Biotyper OC uzavřete takto:

1. Buď zvolte příkazy **File > Exit** a klikněte na  anebo stiskněte Alt+F4.

3.10 Rychlé odkazy do menu programu MALDI Biotyper 3.0 Menus a zkrácené příkazy

| Příkaz | Funkce | Tlačítko | Zkratka |
|--------|--------|----------|---------|
| - | - | - | - |

⁵ Skórovací prahové hodnoty barevného kódování lze uživatelsky nastavit pomocí příkazů **Tools > Options > General Settings > Result Display > MSP Identification > Result Thresholds**.

| | | | |
|--|---|---|--------|
| File > (<i>Soubor ></i>) | | | |
| Add Spektra (<i>Přidat spektra</i>) | Spustí prohlížeč spekter (Spectrum Browser) umožňující jejich uložení |  | Ctrl+O |
| Close All Spektra (<i>Zavřít všechna spektra</i>) | Zavře a odstraní z náhledu souborů (File View) všechna spektra. |  | |
| Open Realtime Classification Project (<i>Otevřít projekt klasifikace v reálném čase</i>) | Otevře dialog Load Project umožňující natažení projektů MALDI Biotyper RTC. |  | Ctrl+P |
| Exit | Zavře program MALDI Biotyper . |  | Alt+F4 |
| Edit > | | | |
| Method > [Method type] (<i>Metoda > [typ metody]</i>) | Otevře editor MALDI Biotyper Method Editor, který zobrazuje tabulky [typ metody] | | |
| Action > Preprocessing > (<i>Akce > Předpříprava / přeběžné zpracování</i>) | | | |
| Edit Method (<i>Editovat metodu</i>) | Zobrazí, edituje a vybere metodu předběžného zpracování. | | |
| Adjust Mass (<i>Upravit hmotnost</i>) | Upraví hmotnostní rozmezí vybraného spektra. | | |
| Smooth (<i>Vyhladit</i>) | Vyhladí zvolené spektrum. | | |
| Subtract Baseline (<i>Odečíst základnu</i>) | U zvoleného spektra provede odečet základní čáry. | | |
| Normalize (<i>Normalizovat</i>) | Normalizuje zvolené spektrum. | | |
| Pick Peaks (<i>Vybrat píky</i>) | Ze zvoleného spektra vybere píky. | | |
| Batch Processing (<i>Skupinové zpracování</i>) | V zvoleného spektra provede postupně všechny kroky předběžného zpracování. | | |
| Action > Identification > (<i>Akce > Identifikace ></i>) | | | |
| Edit Method (<i>Editovat metodu</i>) | Zobrazí, edituje a vybere metodu identifikace MSP. | | |

| | |
|--|---|
| Start | Zahájí klasifikaci vybraného spektra. |
| <i>Action > MSP Creation ></i> | |
| Edit Method (Editovat metodu) | Zobrazí, edituje a vybere metodu tvorby MSP. |
| Edit Subtyping Method (Editovat metodu subtypizace) | Zobrazí, edituje a vybere metodu tvorby subtypizace MSP. |
| Create (Vytvořit) | Ze zvolených spekter vytvoří MSP. |
| Create Series (Vytvořit sérii) | Ze zvolených spekter vytvoří sérii MSP. |
| <i>Action > MSP Dendrogram ></i> | |
| <i>(Akce > Dendrogram MSP)</i> | |
| Edit Method (Editovat metodu) | Zobrazí, edituje a vybere metodu tvorby dendrogramu MSP. |
| View (Zobrazit) | Vytvoří a zobrazí dendrogram MSP. |
| <i>Action > PCA ></i> | |
| <i>(Akce > PCA >)</i> | |
| Edit Creation Method (Editovat metodu tvorby) | Zobrazí, edituje a vybere metodu tvorby PCA. |
| Edit Clustering Method (Editovat metodu klastrování) | Zobrazí, edituje a vybere metodu klastrování PCA. |
| View Clustering (Zobrazit klastrování) | Pro vybraná spektra zobrazí výsledky klastrování PCA. |
| View Dendrogram (Zobrazit dendrogram) | Pro vybraná spektra zobrazí dendrogram PCA. |
| <i>Action > Composite Correlation Index ></i> | |
| <i>(Akce > CCI)</i> | |
| Edit Method (Editovat metodu) | Zobrazí, edituje a vybere metodu výpočtu CCI (Composite Correlation Index). |
| Create (Vytvořit) | Z vybraných hrubých spekter vytvoří CCI matrix. |
| View (Zobrazit) | Zobrazí již existující CCI matrix. |

| | | |
|---|---|----|
| Match (Porovnat) | Porovná neznámé spektrum s CCI matrix. | |
| Export (Exportovat) | Exportuje již existující CCI matrix. | |
| Tools > (Nástroje >) | | |
| Server Settings (Nastavení serveru) | Definuje nastavení serveru. | |
| Options (Možnosti) | Definuje obecná nastavení. | |
| Clear Spektrum Cache (Vyčistit vyrovnávací paměť spektra) | U serveru vyčistí vyrovnávací paměť spekter. | |
| Help > (Nápověda >) | | |
| Help Topics (Témata nápovědy) | Spustí nápovědu programu MALDI Biotyper . | F1 |
| O programu MALDI Biotyper | Zobrazí informace o autorských právech a licencování. | |

3.11 Řešení problémů

| Problém | Příčina | Doporučený postup |
|---|---|--|
| MALDI Biotyper nelze spustit, namísto toho se objeví hláška : "Could not create model ..." | Soubor s osobními nastaveními uživatele je poškozen. | Smažte soubor s nastaveními: C:\Documents and Settings\ <username>\Application Data\Bruker Daltonik\BioTyper\GeneralSettings.xml</username> |
| MALDI Biotyper se spustí s prázdným taxonomickým dendrogramem. | Není nainstalován místní server MALDI Biotyper . | Nastavte vzdálený server MALDI Biotyper Options > Server . |
| | Není spuštěn místní server MALDI Biotyper . | Zkontrolujte/Spustte službu Bruker MBT Service v menu Windows Service . |
| Objeví se „pop-up“ okno s chybovou hláškou obsahující termíny | Jedná se o serverovou výjimku. Server | Zkontrolujte zda editor Method Editor obsahuje prázdné pole pro zvolení typu metody. Pokud ano zvolte |

| Problém | Příčina | Doporučený postup |
|---|---|--|
| “SOAP fault” nebo “SoapException”. | má potíže se špatně zadanou vstupní hodnotou (a výjimka nebyla převedena na chybu klienta). | požadovanou metodu a zmáčkněte OK . |
| Příkaz Start Identification vytvoří prázdnou tabulku MSP Skóres. | Srovnávání MSP bylo spuštěno s prázdnými vstupními daty. | Zvolte jedno nebo více spektrum/MSP ze vstupní sestavy a znovu spusťte srovnávání. |
| Počet MSP zobrazených v závorce za uzlem taxonu je chybný. | Obvykle se jedná o problém způsobený opakovaným (novým) načtením. | Zavřete příslušný parent node a znovu jej otevřete (k opakovanému načtení správných hodnot). Nepřiřazené uzly MSPs načtete znovu přepnutím mezi stromy (např. Project a Bruker Taxonomie). |
| Příkaz Search MSP je spuštěn v taxonomickém dendrogramu (ne v editoru Taxonomy Tree Editor) a nezobrazují se žádné výsledky. | Použitý název struktury neodpovídá. | Zkratek vyhledávací řetězec a použijte hvězdičku (*) jako zástupnou hodnotu na konci řetězce (např. Bacil*). |
| | K vyhledávání byl použit prázdný strom klienta. | Spusťte editor Taxonomy Tree Editor, nastavte jako strom klienta 'Bruker Taxonomy' a stiskněte OK . |

Příloha A — Příprava matrix a MALDI terčků

Spotřební materiály

Mnohé plasty nejsou pro analýzu hmotnostní spektrometrií vhodné, a to především proto, že se z nich uvolňují polymery. Nepoužívejte proto žádný typ silikonizovaných trubic.

Používání nevhodných plastových materiálů má za následek heterogenní krystalizaci a polymerové signály, které mohou klasifikaci mikrobiálních druhů pomocí přístroje MALDI Biotyper ovlivnit nebo dokonce znemožnit.

Rozpouštědla a chemikálie

Všechna Rozpouštědla a chemikálie, jež jsou pro zpracování vzorků přístrojem MALDI Biotyper použita, musejí být chemicky vysoce čistá (přínejmenším stupně HPLC-grade).

MALDI terčičky

Při analýze vzorků přístrojem MALDI Biotyper lze použít následující MALDI terčičky:

- o MSP 96 terčičk z leštěné oceli (Výr. č. 224989, Bruker Daltonik GmbH)
- o MSP BigAnchorChip™ 24 (Výr. č. 255080, Bruker Daltonik GmbH)
- o MSP BigAnchorChip™ 96 (Výr. č. 254460, Bruker Daltonik GmbH)
- Terčičky vhodné pouze pro autoflexní přístroj:
 - o MTP 384 terčičk z leštěné oceli T F (Výr. č. 209520, Bruker Daltonik GmbH)
 - o MTP BigAnchorChip™ 384 T F (Výr. č. 254454, Bruker Daltonik GmbH)

POZOR: BIOLOGICKÁ RIZIKA



MALDI terčičky, reagenční činidla, reagentie a další spotřební materiály používané při těchto analýzách (protokolech) mohly přijít do styku s mikroorganismy a představují proto potenciálně nebezpečný biologický materiál.

Za opatrné zacházení s těmito látkami, příslušenstvím a spotřebními materiály, za jejich dekontaminaci a za jejich správnou likvidaci v souladu s příslušnými celostátními nebo místními předpisy je

zodpovědný uživatel.

POZOR: HOŘLAVÉ / KOROZIVNÍ / NEBEZPEČNÉ CHEMIKÁLIE



Některé z chemikálií, které jsou při těchto analýzách používány, jsou vysoce hořlavé, korozivní anebo škodlivé.



Pečlivě si přečtěte příslušné bezpečnostní materiálové listy, upozornění na chemická rizika a bezpečnostní pokyny výrobců a dodavatelů těchto reagensů. Dodržujte všechny celostátní i místní bezpečnostní předpisy.



Při zacházení s těmito chemikáliemi vždy a všude dodržujte i obecná pravidla bezpečnosti práce.

Vždy používejte laboratorní pláště, bezpečnostní brýle a ochranné rukavice.

Je-li to výrobcem činidla doporučeno, pracujte v digestoři.

A.1 Příprava matrix roztoku

Jako matrix je třeba používat preparát HCCA_{portioned} (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; Výr. č. 255344, Bruker Daltonik GmbH) ve všech aplikacích přístroje MALDI Biotyper.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Roztok matrix musí být připraven v den měření vzorků. Delší skladování roztoku matrix se nedoporučuje.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Pro správné zpracování vzorků je třeba se vždy přesvědčit o tom, že zda jsou použity pouze velmi kvalitní materiály a chemicky vysoce čisté reagensy.

►► Příprava matrix roztoku

1. Do Eppendorfovy mikrozkušavky odpipetujte 475 µl ultračisté vody, 25 µl 100% kyseliny trifluoroctové a 500 µl acetonitrilu, čímž dosáhnete celkového objemu 1 ml.
2. Tuto směs pečlivě promíchejte. Výsledná směs se nazývá “standardní rozpouštědlo”.
3. Do mikrozkušavky s HCCA_{portioned} matrix odpipetujte 250 µl standardního rozpouštědla.
 - o Chcete-li připravit matrix pro terčíky **BigAnchor MALDI targets** odpipetujte do mikrozkušavky s HCCA_{portioned} matrix 500 µl standardního rozpouštědla.
4. HCCA rozpouštějte mícháním při pokojové teplotě až do okamžiku, kdy se roztok stane zcela průhledným (v roztoku musejí být rozpuštěny všechny krystaly). Konečná koncentrace roztoku matrix je 10 mg HCCA/ml.
 - o Konečná koncentrace roztoku matrix pro terčíky **BigAnchor MALDI targets** je 5 mg HCCA/ml.

V tomto okamžiku je roztok matrix připraven k použití.

Poznámka: Připravený roztok matrix může být uložen ve tmě a při pokojové teplotě (předcházejte kontaktu s UV zářením) po dobu jednoho pracovního dne.

A.2 Čištění MALDI terčků

Před použitím při MALDI Biotyper procedurách musejí být MALDI terčíky pečlivě vyčištěny 70% vodným etanolem a 80% vodným roztokem kyseliny trifluoroctové.

►► Příprava 70% vodného etanolu (100 ml)

1. 30 ml deionizované vody nalijte do 100 ml odměrného válce.
2. Obsah válce přelijte do kádinky.
3. Do 100 ml odměrného válce nalijte 70 ml čistého etanolu.
4. Obsah válce přelijte do kádinky obsahující 30 ml vody.

5. Roztok promíchejte přeléváním směsi obou reagensů z kádinky do válce a zpět (provedte celkem pětkrát).

Po tomto promíchání je vodný roztok etanolu připraven k použití.

►► Příprava 80% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové (250 µl)

1. 50 µl deionizované vody odpipetujte do 1,5 ml Eppendorfovy mikrozkušavky.
2. Opatrně přidejte 200 µl 100% kyseliny trifluoroctové.
3. Roztok míchejte vířením po dobu 1 minuty.

Po tomto promíchání je roztok připraven k použití.

►► Čištění MALDI terčků

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Nepoužívejte chemikálie jinak než je předepsáno. MALDI terčiky nikdy nenamáčejte do organických rozpouštědel na dobu delší než 20 minut.

1. MALDI terčik vložte do vhodné nádoby a přelijte 70% vodným roztokem etanolu (připraveným podle výše uvedeného návodu) tak, aby byl zcela ponořen.
2. Při pokojové teplotě nechejte MALDI terčik v roztoku máčet po dobu 5 minut.
3. Pak MALDI terčik z lázně vyjměte a dokonale opláchněte pod tekoucí vodou.
4. Utěrkou Kimwipe MALDI terčik pečlivě vyčistěte pomocí 70% vodného roztoku etanolu.
5. Pak MALDI terčik znovu opláchněte tekoucí vodou a utřete do sucha utěrkou Kimwipe.
6. 100 µl 80% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové (připraveného podle výše uvedeného návodu) napipetujte na MALDI terčik. Všechny části MALDI terčiku pečlivě otřete utěrkou Kimwipe.
7. MALDI terčik opláchněte v deionizované vodě a utřete do sucha utěrkou Kimwipe.
8. Při pokojové teplotě nechejte MALDI terčik po dobu nejméně 15 minut úplně uschnout.

V tomto okamžiku je MALDI terčik připraven pro použití v MALDI Biotyper aplikacích.

{b}Poznámka {/b} Vyčištěné MALDI terčiky lze před použitím skladovat i delší dobu na suchém místě a při pokojové teplotě.

Příloha B — Analýza vzorků

B.1 Kultivace mikroorganismů

V normálních kultivačních podmínkách se ke standardní kultivaci bakterií pro MALDI Biotyper analýzy používá krevní agar Columbia obsahující 5% ovčí krve.

Jiná kultivační média (např. LB nebo YPD) mohou být použita také, stejně jako různá růstová stádia anebo jiné teploty. Nejlepších výsledků lze dosáhnout za podmínek, které se shodují s těmi podmínkami, které byly použity při kultivaci referenčních vzorků uložených v databázi.

Při standardní metodě kultivace kvasinek pro MALDI Biotyper analýzu se používají v souladu s doporučeními dodavatele glukózo-agarové destičky (Sabouraud-glucose-agar plates).

Případné změny média nebo kultivačních podmínek jsou závislé na rozhodnutí uživatele a před použitím je třeba je validovat.

Výchozí materiál musí být čerstvý, se subkulturou jediného druhu (kultivace přes noc; pouze u pomalu rostoucích bakterií může kultivace trvat i několik dní). U kolonií kultivovaných na primárních agarových destičkách existuje zvýšené riziko výskytu dvou různých druhů mikroorganismů; toto riziko by mělo být prověřeno pomocí jejich izolované kultivace (opět přes noc).

B.2 Příprava vzorků

Pro analýzy přístrojem MALDI Biotyper existují tři různé metody přípravy vzorků:

- Metoda přímého transferu — vhodná pro nepatogenní mikroorganismy.
- Metoda extrakce kyselinou mravenčí — vhodná pro všechny nesporulující mikroorganismy.
- Metoda extrakce kyselinou trifluoroctovou (TFA) — vhodná pro sporulující mikroorganismy.

Metody extrakce kyselinou mravenčí a TFA lze použít především v těch případech, kdy metoda přímého transferu selže.

B.2.1 Metoda přímého transferu

►► Příprava vzorků metodou přímého transferu

Poznámka Metoda přímého transferu by neměla být používána ke klasifikaci patogenů. Ke klasifikaci patogenních mikroorganismů použijte metody extrakce kyselinou mravenčí anebo TFA.

1. Biologický materiál (jedinou kolonii) naneste jako tenký film přímo na čistý MALDI terčik.

Použit lze buď pipetové „špičky“ nebo inokulační kličky. Inokulovaný materiál je vždy třeba nanést stejnoměrně (homogenně).

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ Tento krok je nejkritičtější součástí metody přímého transferu. Důležité je použít správné množství biologického materiálu. Tato analytická metoda je velmi citlivá a obecně lze říci, že při ní stačí použít jen malé množství materiálu. Je-li použité množství biologického materiálu příliš velké, klasifikace se nezdaří.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ Abychom se vyhnuli křížové kontaminaci, je nutno vždy používat buď nové pipetové špičky anebo plamenem desinfikované inokulační kličky.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ Po uschnutí vzorku je třeba matrix aplikovat nejpozději do 10 minut.

2. Každou pozici vzorku (= spot) pečlivě překryjte 1 µl matrix roztrou (viz Přílohu B).

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ Je velmi důležité, abychom se vyhnuli spojování různých vzorků, neboť kapičky matrix se navzájem smíchávají. Takovýto proces pak může způsobit křížovou kontaminaci a nesprávné výsledky.

3. Jednotlivé pozice (skvrny) vzorků nechejte uschnout při pokojové teplotě.

Vždy je třeba, aby byl získaný preparát homogenní.

V tomto okamžiku je vzorek připraven ke klasifikaci. Připravený MALDI terčik vložte okamžitě do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.

4. Bude-li třeba provést ještě další klasifikační analýzy, uchovávejte agarové destičky při pokojové teplotě.

Poznámka: Uchovávání agarových destiček v chladničce má na kvalitu spekter negativní vliv.

Poznámka Uplyne-li od použití vzorku pro přímý transfer více než 12 hodin, je třeba ho pro další analýzu překultivovat.

B.2.2 Metoda extrakce kyselinou mravenčí

►► Příprava vzorků pomocí extrakce kyselinou mravenčí

1. Odpipetujte 300 µl ultračisté vody do čisté Eppendorfovy mikrozkušavky.
2. Do zkumavky přeneste jen jednu jedinou kolonii biologického materiálu.
3. Suspenzi buněk v Eppendorfove zkumavce homogenizujte opakovaným pipetováním a odsáváním, po němž následuje intenzivní promíchání krouživým pohybem (minimálně po dobu jedné minuty).
4. Do mikrozkušavky odpipetujte 900 µl čistého etanolu a vznikou suspenzi krouživým pohybem intenzivně promíchejte (minimálně jednu minutu).
5. Pak zkumavku 2 minuty odstřeďujte při 13 000 ot/min a supernatant pipetou odsajte.
6. Krok 5 zopakujte.

Všechny reziduální etanol je třeba odstranit.

7. Odpipetujte 30 µl H₂O a 70 µl 100% kyseliny mravenčí do čisté Eppendorfovy mikrozkušavky a směs intenzivním krouživým pohybem promíchejte.

Výsledkem této procedury je 70% vodný roztok kyseliny mravenčí.

K peletě přidejte 1–80 µl 70% vodného roztoku kyseliny mravenčí a výslednou směs pečlivě promíchejte opakovaným pipetováním a odsáváním, po němž následuje promíchání intenzivním krouživým pohybem. Pak do zkumavky přidejte stejný objem 100% acetonitrilu a vše znovu důkladně promíchejte. Objem 70% kyseliny mravenčí a acetonitrilu přidaný k peletě by měl odpovídat množství biologického materiálu, který byl do zkumavky přenesen v kroku 2.

| | Malá jediná kolonie | Velká jediná kolonie | 1 µl inokulační klička | 10 µl inokulační klička |
|--------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Kyselina mravenčí | 1–5 µl | 5–15 µl | 10–40 µl | 30–80 µl |
| Acetonitril | 1–5 µl | 5–15 µl | 10–40 µl | 30–80 µl |

9. Zkumavku odstředíte při 13 000 ot/min po dobu 2 minut.
10. Pipetou naneste 1 µl supernatantu tohoto mikrobiálního extraktu na čistý MALDI terčik.
11. Vzorek pak nechejte uschnout při pokojové teplotě.

Výsledkem tohoto postupu by měl být homogenenní preparát.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Po uschnutí vzorku je třeba matrix přidat nejpozději do 10 minut.

12. Pčlivě překryjte každou pozici vzorku (= skvnu) 1 µl roztoku matrix (viz Příloha B).

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Je velmi důležité vyhýbat se smíchávání různých vzorků, neboť může dojít k vzájemnému průsaku (bleeding) kapiček.

13. Hodnocené skvrny vzorku pak nechejte uschnout při pokojové teplotě.

Výsledkem tohoto postupu by měl být homogenenní preparát.

Výsledný vzorek je tak připraven pro klasifikační proces. MALDI terčik vložte bezopkladně do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.

B.2.3 Metoda TFA extrakce

Metoda TFA extrakce je vhodná při inaktivaci sporulujícího biologického materiálu.

►► Příprava vzorku pomocí metody TFA extrakce

1. Biologický materiál (5-10 mg) přeneste od čisté Eppendorfovy mikrozkušavky.

2. Do zkumavky pak odpipetujte 50 µl 80% TFA a vše resuspendujte opakovaným pipetováním, které je třeba provádět tak dlouho, až se biologický materiál úplně rozpustí/denaturuje.

Při práci se sporulujícími mikroorganismy zůstává roztok turbidní (zakalený).

3. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 10–30 minut.
4. Do zkumavky odpipetujte 150 µl H₂O.
5. Dále do zkumavky odpipetujte 200 µl acetonitrilu a výslednou směs intenzivním krouživým pohybem promíchejte.
6. Zkumavku odstředíte při 13 000 ot/min po dobu 2 minut.
7. 1 – 2 µl supernatantu tohoto mikrobiálního extraktu naneste pipetou na čistý MALDI terčik.
8. Skvrny vzorku nechejte uschnout při pokojové teplotě.

Výsledkem tohoto postupu by měl být homogenenní preparát.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Po zaschnutí vzorku je třeba matrix přidat nejpozději do 10 minut.

9. Každou pozici vzorku (= skvrnu) překryjte 2 µl roztoku matrix (viz Příloha B).

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Je velmi důležité vyhýbat se smíchávání různých vzorků, neboť může dojít k vzájemnému průsaku (bleeding) kapiček.

9. Skvrny vzorku nechejte uschnout při pokojové teplotě.

Výsledkem tohoto postupu by měl být homogenenní preparát.

Vzorek je nyní připraven ke klasifikaci. MALDI terčik vložte bezodkladně do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.

B.3 Měření MALDI-TOF spekter

Při klasifikaci pomocí přístroje MALDI Biotyper jsou k měření spekter vhodné následující přístroje firmy Bruker:

- Přístroje řady microflex™
- Přístroje řady autoflex™speed
- Přístroje řady ultrafleXtreme™

B.3.1 Kalibrace

Uživatelé si mohou sami definovat tu pozici terčiku, na níž bude před zahájením procesu klasifikace provedena automatická kalibrační a validační procedura.

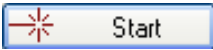
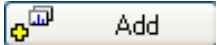
Kalibrační a validační procedura se provádí na té pozici terčiku, která obsahuje vzorek standardu **Bruker Bacterial Test Standard** (Bruker díl výr. č.255343). Tento standard je v podstatě preparátem kmene *E. coli* DH5 α , který byl nanesen se dvěma dodatečnými proteiny do horní části hmotnostního rozmezí, což umožňuje kalibraci v hmotnostním rozmezí od 4 do 17 kDa.

►► Provedení kalibrační procedury u přístroje MALDI Biotyper

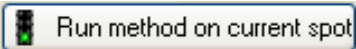
1. Vložte MALDI terčik se vzorkem testovacího standardu **Bruker Bacterial Test Standard** do přístroje a spusťte program **flexControl**.

Při přípravě testu postupujte podle pokynů uvedených v brožurě přiložené k výrobku (**Product Information**).

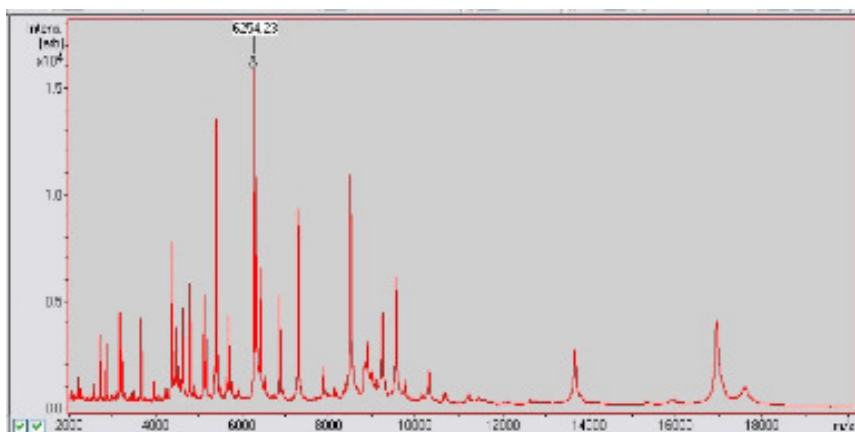
2. Metodu flexControl spusťte příkazem `MBT_FC.par`.
3. Provedete to buď tak, že:
 - a. metodu flexControl spustíte příkazem `MBT_FC.par` a pak manuálně změříte 6 x 40 míst (shots) na různých pozicích skvrny nacházející se na skvrně testovacího standardu (**Bruker Bacterial Test Standard spot**).

K akumulaci těchto míst (shots) buď použijte tlačítek  a .

ANEBO

- b. Natáhněte vhodnou metodu automatického provedení testu zvanou **autoXecute method** (např. `MBT_AutoX.axe`) a klikněte na .

4. Pak klikněte na tlačítka **Display sum buffer** () a **Smooth spectrum in sum buffer** ().




5. Vyberte tabulku **Calibration** a v sestupném seznamu **Mass Control List** zvolte příkaz `MBT_Standard`
6. buď:
- a. kliknutím na **Automatic Assign** , čímž provedete automatické přiřazení píků kalibrovaného vzorku

ANEBO

- b. píky přiřadíte manuálně tak, že:
- o kalibrant vyberete ze seznamu **Mass Control List** (na displeji spektra se objeví vertikální červená čára).
 - o Poté ihned klikněte vlevo od píku, který patří ke kalibrantu (tím vertikální červená čára zezelená a na špičce píku se zobrazí odpovídající hmotnost).
7. U každého kalibrantu zkontrolujte sloupec **Err/ppm**.

| Name | Ref. Mass/Da | Cur. Mass/Da | Err/ppm | Err/Da |
|--------------------------------|--------------|--------------|---------|----------|
| ✓ RL36 [M+H] ⁺ | 4365.30000 | 4363.71916 | -88 | -0.38619 |
| ✓ R532 [M+H] ⁺ | 5096.80000 | 5097.32819 | 138 | 0.70297 |
| ✓ R534 [M+H] ⁺ | 5381.40000 | 5382.03974 | 83 | 0.44575 |
| ✓ R533meth [M+H] ⁺ | 6255.40000 | 6256.36624 | -41 | -0.25433 |
| ✓ RL29 [M+H] ⁺ | 7274.50000 | 7275.03992 | -228 | -1.66047 |
| ✓ R519 [M+H] ⁺ | 10300.10000 | 10306.38734 | 256 | 2.63746 |
| ✓ RNAse A [M+H] ⁺ | 13683.20000 | 13683.58622 | -166 | -2.27252 |
| ✓ Myoglobin [M+H] ⁺ | 16952.30000 | 16952.26147 | 46 | 0.78774 |

Zobrazená hodnota nesmí být vyšší než ± 300 ppm. Je-li kterákoli z hodnot vyšší než ± 300 ppm, vraťte se zpět a zopakujte krok 3.

7. Novou kalibraci akceptujete kliknutím na .
8. Nové kalibrační hodnoty uložte do metody flexControl pomocí `MBT_FC.par`.

Příloha C — Instalace a licencování softwaru MALDI Biotyper

V přístroji Bruker Daltonics MALDI Biotyper 3.0 je nainstalována anglická verze Windows XP. Podrobnosti týkající se servisních balíčků naleznete v poznámkách Release Notes na instalačním CD-ROM.

Pro práci spřístrojem MALDI Biotyper 3.0 je třeba nainstalovat aplikaci **MATLAB Component Runtime**. Při tomto postupu software **MALDI Biotyper installation** nejdříve zkontroluje, zda je komponenta MATLAB nainstalována a jestliže tomu tak není, upozorní uživatele na to, že před spuštěním programu **MALDI Biotyper installation**, je třeba tuto aplikaci nainstalovat. Oba softwary (**MALDI Biotyper** a **MATLAB Component Runtime**) se nacházejí na instalačním CD softwaru MALDI Biotyper.

První instalací programu MALDI Biotyper Offline Classification do kteréhokoli počítače se automaticky vytváří dočasná licence, která platí 60 dnů. Jakmile tato dočasná licence skončí, je třeba použít licenční heslo, které je dodáváno spolu se softwarovým balíčkem (jinak MALDI Biotyper nebude fungovat).

C.1 Systémové požadavky

Minimální požadavky kladené na počítač užívající serverovou a klientskou aplikaci jsou uvedeny níže:

- CPU: mikroprocesor Dual core processor (např. Intel Core nebo Intel Xeon)
- Hard disk: nejméně 1 GB volného místa na disku
- Hlavní paměť: 4 GB RAM
- Operační systém: Windows XP nebo Windows 7 s nejnovějším servisním balíčkem
- Grafické rozlišení: 1024 x 768 pixelů, 256 barev nebo vyšší (např. 1650 x 1080 with true colours)
- Mechaniky CD-ROM / DVD (pouze pro instalaci)
- Internet Explorer 8.0
- Microsoft .NET Runtime 3.5 (nenachází-li se v počítači, bude nainstalován Setupem)

C.2 Instalace softwaru MALDI Biotyper

Software MALDI Biotyper používá architekturu client/server. Existují dva hlavní instalační balíčky, tj.: klientský balíček a serverový balíček. Vzhledem k tomu, že za správu dat zodpovídá server, je serverový balíček nainstalován pouze do jednoho počítače (centrální server). Klientský balíček může být nainstalován do různých počítačů (každá instalace si ale vyžaduje samostatnou licenci). Všichni offline klienti softwaru **MALDI Biotyper** mají přístup k datům nacházejícím se na centrálním serveru.

Klientská a serverová instalace se iniciují z příslušného bodu menu jejich spouštěče, který se obvykle nastartuje po natažení instalačního CD. Je-li funkce Autostart deaktivována, nastartujte instalaci přímo pomocí aplikace 'Launch.exe', která se nachází v kořenovém adresáři (root directory) instalačního CD.

C.2.1 Instalace MALDI Biotyper serveru

Instalační balíček MALDI Biotyper serveru se skládá ze čtyř dílčích balíčků (sub packages), které se nainstalují automaticky v předem určeném pořadí.

1. Java runtime (JVM)
2. MATLAB component runtime (MCR)
3. Server relační databáze (PostgreSQL)
4. Aplikační server (JBoss)

Během instalace postupuje uživatel podle instalačních kroků (setups).

V závislosti na rychlosti počítače může instalace trvat několik minut až půl hodiny.

Instalací serveru se do databáze uloží výrobcem nastavené referenční profily hlavních spekter (50 MSPs). Další hlavní spektra lze získat v samostatném instalačním balíčku (MaldiBiotyperDBRestore_Standard.exe), který však může být nainstalován až po instalaci MALDI Biotyper serveru.

C.2.2 Instalace balíčku MALDI Biotyper Offline Classification

Instalační balíček **MALDI Biotyper Offline Classification** obsahuje dva dílčí balíčky, které se nainstalují automaticky v předem stanoveném pořadí.


1. Balíček **MATLAB component runtime** (MCR)
2. Balíček s aplikací **MALDI Biotyper Offline Classification**

Během instalace postupuje uživatel podle jednotlivých instalačních kroků (setups). Balíček MCR je nainstalován pouze v tom případě, že v systému není přítomen.

C.2.3 Instalace balíčku MALDI Biotyper Offline Classification v síti se vzdáleným MALDI Biotyper Serverem

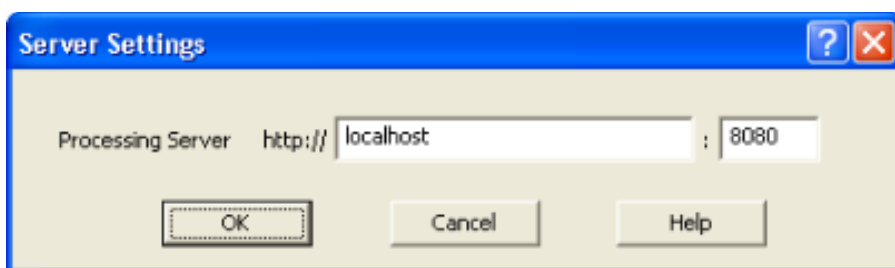
Tuto proceduru použijte tehdy, chcete-li klientský počítač propojit se vzdáleným severem.

►► **Instalace balíčku MALDI Biotyper Offline Classification v síti se vzdáleným MALDI Biotyper Serverem:**

1. Zvolte příkazy  **Start** > **Programs** > **Bruker Daltonics** > **MALDI Biotyper**.
2. Není-li software MALDI Biotyper licencován, vložte platné licenční heslo.
3. Na požádání se zalogujte (přihlaste).

Zobrazí se klientská aplikace s prázdným taxonomickým dendrogramem.

4. Zvolte příkazy **Tools** > **Server** a do dialogu **Server Settings** vložte název vzdáleného serveru. Původní čtyřmístné nastavení portu neměňte.



5. Dialog **Server Settings** ukončíte kliknutím na **OK**.


6. Je-li u specifikovaného hostitelského počítače MALDI Biotyper server nalezen, objeví se na obrazovce platný taxonomický dendrogram a do klientské aplikace se uloží nový název serveru.

C.3 Licencování softwaru MALDI Biotyper

Po první instalaci softwarového balíčku MALDI Biotyper Offline Classification do počítače se automaticky vytvoří dočasná licence, která má platnost 60 dnů. Jakmile tato dočasná licence skončí, je třeba použít licenční heslo, které je dodáváno spolu se softwarovým balíčkem MALDI Biotyper. Je-li dodána pouze dočasná licence, objeví se po 30 dnech varování, že po dalších 30 dnech tato licence vyprší.

Poznámka Je-li ve vašem systému nainstalována aplikace **Bruker Daltonics Compass Security Pack**, funguje software MALDI Biotyper automaticky v povoleném (Compliance) módu a užívá aplikaci **Bruker Daltonics UserManagement** (část 4.1). Při fungování v tomto módu mohou licence přidávat a vymazávat pouze ti uživatelé, kteří jsou vybaveni speciálními právy.

►► **Licencování balíčku MALDI Biotyper Offline Classification lze provést takto:**

1. Volbou příkazů  > **Programs > Bruker Daltonics > Administration > LicenseManager** zahajte dialog **Bruker Daltonics LicenseManager**.
2. Do políček **New license key** vložte licenční heslo balíčku MALDI Biotyper Offline Classification.
3. Klikněte na **Add** (lze provést až po vložení licenčního hesla).
 - V nepovoleném módu se po vložení platného licenčního hesla licence přidává do seznamu **Existing licenses**.
 - V nepovoleném módu se v případě použití platného hesla otevře dialog **Re-enter Your Password**. Požadované heslo vložte znovu a klikněte na **OK**. Je-li heslo správné a uživatel má právo licence přidávat/odebírat, bude tato licence přijata.
Není-li heslo správné anebo nemá-li uživatel požadovaná práva, objeví se chybové hlášení.


- Chcete-li některou z licencí vymazat, vyberte ji v seznamu **Existing licenses** a klikněte na **Delete**.

4. Kliknutím na **Close** aplikaci Bruker Daltonics LicenseManager ukončíte.

Program LicenseManager může být v softwaru MALDI Biotyper otevřen také pomocí příkazů **Compass > License**. V tomto případě LicenseManager zobrazí všechny licence, které jsou momentálně pro aplikace Bruker Daltonics dostupné.

C.4 Odinstalování programu MALDI Biotyper

►► **Chcete-li program MALDI Biotyper 3.0 Client/Server odinstalovat:**

1. Zvolte příkazy  **Start** > **Settings** > **Control Panel**.
2. Dvakrát klikněte na nabídku **Add/Remove Program**.
3. V seznamu nainstalovaných programů zvolte software **MALDI Biotyper 3.0 RTC/OC**.
4. Klikněte na nabídku **Remove**.
5. Potvrďte dotaz, zda tento software skutečně chcete odstranit.

C.5 Instalace programu MALDI Biotyper Real Time Classification

1. Software **MALDI Biotyper Real Time Classification** (viz část 2) propojuje akvizici dat (**flexControl**) s jejich klasifikací (**MALDI Biotyper**). Tento balíček lze nainstalovat pouze do toho akvizičního systému, v němž funguje program flexControl.

Příloha D — Nastavení registrů (určeno pouze pro vyspělé uživatele)

Konfigurační registr pro program MALDI Biotyper RTC je lokalizován na adrese: `HKEY_CURRENT_USER\Software\Bruker Daltonik\BioTyper Automation Control\Configuration`.

Nastavení registračního klíče (registry key settings) mohou být rozdělena do pěti skupin:

- **AutoXecute** — slouží ke spuštění funkce AutoXecute.
- **Report Creation** (tvorba zprávy) — definuje pořadí, v němž se budou výsledky klasifikace objevovat ve zprávě o výsledcích klasifikace (Classification Results report).
- **Data Directory Name** (název datového adresáře) — definuje název adresáře, do něhož jsou naměřené údaje uloženy.
- **Project Import** (import projektu) — používá se k přiřazení hodnot obsažených v CSV souborech do náhledu tabulek v Průvodci programem MALDI Biotyper RTC.
- **Sequential Insert Mode** (sekvenční modus ukládání) — kontroluje přiřazování ID v sekvenční módu ukládání (viz část 2.5.1.4)

| <u>Klíč registru</u> | <u>Výrobce nastavená hodnota</u> | <u>Poznámka</u> |
|------------------------|---|-----------------|
| AutoXecute | | |
| autoXecuteMethod | DefaultMeasure | |
| measuringOrder | HORIZONTAL_ZIGZAG | |
| spectrumDir | D:\Data\MALDIBiotyperRealTime Classification | |
| targetGeometry | MSP 96 | |
| Report Creation | | |

| <u>Klíč registru</u> | <u>Výrobce nastavená hodnota</u> | <u>Poznámka</u> |
|----------------------------------|---|---|
| sortColumn | name | Sloupce použité pro třídění výsledků ve zprávě. povolené hodnoty = name , externalID , description . |
| Data Directory Name | | |
| sampleNameColumn | externalId | Přidání dalšího podadresáře mezi projekt a adresáře vzorků na cestě ukládání spekter. Název tohoto podadresáře je odvozen od příslušné hodnoty. Povolené hodnoty = name , externalID , description . |
| Project Import | | |
| importFolder | C:\Documents and Settings\<user>\Desktop | Designovaný importní adresář pro importovaný CSV soubor (viz část 2.6.2). |
| importSuffix | in | V importním dialogu budou zobrazeny pouze soubory mající tuto příponu (viz část 2.6.2). |
| csvDelimiter | ; | Separátor používaný pro analýzu (parsing) CSV souborů. |
| posOnScoutImport ColumnNumber | 1 | Sloupec CSV souboru odpovídající pozici (Position). |
| externalIdImport ColumnNumber | 2 | Sloupec CSV souboru odpovídající ID . |
| nameImport ColumnNumber | 0 | Sloupec CSV souboru odpovídající Name . 0 = nepoužito. |
| descriptionImport | 0 | Sloupec CSV souboru odpovídající popisu |

| <u>Klíč registru</u> | <u>Výrobce nastavená hodnota</u> | <u>Poznámka</u> |
|--|----------------------------------|---|
| ColumnNumber | | (Description). 0 = nepoužito. |
| chipOnScoutImport ColumnNumber | 0 | Sloupec CSV souboru odpovídající Chip . 0 = nepoužito. |
| <u>Sequential Import Mode</u> | | |
| generateAnalyte IdNumber | 0 | 0 = povoluje ve stejném projektu opakovat ID (např. pro větší počet preparátů téhož vzorku); 1 = přidává k ID sčítač (counter) (-00x) a zvyšuje ID pro opakované případy (tzn. že všechna ID jsou jedinečná). |

Příloha E — Povolný modus

Software MALDI Biotyper může být použit také v povoleném pracovním módu (Compliance mode), což napomáhá při plnění požadavků FDA 21 CFR Part 11 (pravidla FDA pro elektronické podpisy a záznamy).

E.1 Činnost softwaru MALDI Biotyper v povoleném módu

K činnosti softwaru MALDI Biotyper v povoleném módu je zapotřebí nainstalovat aplikaci **Bruker Daltonics Compass Security Pack**, která zajišťuje funkci Bruker Daltonics UserManagement; tuto aplikaci je nejvhodnější nainstalovat na centrální server. Existuje-li licence **Compass Security Pack**, zahájí software MALDI Biotyper činnost v povoleném módu zcela automaticky.

{b}Poznámka {/b} V kontextu balíčku Compass Security Pack znamená Povolný modus (Compliance mode) to, že jsou nástroje a funkce balíčku Compass Security Pack dostupné a že je uživatel může použít k tomu, aby splnil požadavky pravidel FDA pro elektronické podpisy a záznamy (21 CFR Part 11 requirements). Ani povolený modus (Compliance mode), ani balíček Compass Security Pack však úplnou shodu s požadavky 21 CFR Part 11 zajistit nemohou.

Povolný modus dává softwaru MALDI Biotyper následující vlastnosti:

- Do programu MALDI Biotyper se mohou zalogovat pouze ti uživatelé, kteří byli vytvořeni správci aplikace UserManagement (**UserManagement administrators**). Pro zalogování je třeba uvést uživatelské ID a heslo.
- Administrátor aplikace UserManagement může přístup do programu MALDI Biotyper umožnit tím, že uživatelům, které vytvoří, udělí jejich individuální práva. Tato práva se týkají těch činností (actions), jejichž provádění je jim v systému MALDI Biotyper povoleno.
- Všechny Bruker Daltonics aplikace, které jsou v uživatelském počítači nainstalovány, mohou být tímto uživatelem zamykány a odemykány.

Poznámka: Výše uvedené vlastnosti se týkají kterékoli aplikace, která je podporována softwarem Bruker Daltonics UserManagement.

E.2 Operační práva k aplikacím Bruker Daltonics UserManagement a MALDI Biotyper

Aplikace UserManagement je určena jak pro klienty, tak pro server. Databáze definující uživatele a jejich práva je nainstalována v serverovém počítači, zatímco aplikace Bruker Daltonics jsou nainstalovány v počítačích klientských.

Operátoři jsou vytvářeni a vybavováni příslušnými právy pomocí aplikace **Bruker Daltonics UserManagement Administration Tool**. Vytvářet operátory a udělovat jim jejich práva směřují pouze administrátoři aplikace UserManagement.

Poznámka: Podrobné informace o tom, jak jsou uživatelé vytvářeni a jak jsou jim jejich práva předělována, lze nalézt v aplikaci s pomocnými nástroji **UserManagement Administration Tool help tools**.

Aplikace UserManagement uděluje tato oprávnění, která se týkají softwaru MALDI Biotyper:

- Právo obecné analýzy (**General Analyses Processing**) — základní právo, které uživatel potřebuje mít k tomu, aby mohl spektra v přístroji MALDI Biotyper zpracovávat. Uživatel sice smí používat metody, hlavní spektra a další, které již existují, nesmí ale žádnou z metod měnit.
- Právo měnit konfiguraci programu (**Change Program Configuration**) — toto oprávnění klient využívá k měnění metod stávajících a k vytváření nových metod, MSP atd.

U aplikace MALDI Biotyper jsou předdefinovány dvě uživatelské kategorie:

- Projektoví manažeři (**Project Managers**) — příslušníci této skupiny mají oprávnění provádět jak obecnou analýzu, tak také měnit konfiguraci programu.
- Operátoři (**Operators**) — příslušníci této skupiny jsou oprávněni provádět pouze obecnou analýzu.
 - o Pokusí-li se operátor provést tu akci, k níž nemá potřebné oprávnění, objeví se příslušná varovná informace.

E.3 Změna uživatelských hesel

V Povoleném módu (Compliance mode) je pro zalogování nutno provést identifikaci uživatele zadáním jeho ID a hesla. V době, kdy je MALDI Biotyper v chodu, mohou uživatelé své heslo měnit kdykoli to bude zapotřebí a kdykoli si to budou přát.

Uživatel je požádán, aby změnil své heslo v těchto případech:

- Při prvním přihlášení se do té aplikace systému Bruker Daltonics, která podporuje program UserManagement.
- V okamžiku, kdy je administrátorem programu UserManagement poprvé požádán, aby se definoval jako nový uživatel.
- Poté, co administrátor aplikace UserManagement změnil nebo resetoval jeho heslo (tak např. poté, co byl ze systému vyloučen kvůli opakovanému zadání neplatného hesla)

Nová hesla musejí být vytvořena v souladu s pravidly jejich tvorby; tato pravidla jsou definována administrátorem programu UserManagement.

►► Změna hesla

1. V dialogu spusťte přihlašování do programu **MALDI Biotyper** buď vybráním tohoto programu anebo výběrem příkazů **Compass > Operator**.
2. Do políčka **Operator** vložte platné ID uživatele.
3. Kliknutím na nabídku **Change Password** dialog **Change Password** zahájíte.



Change Password

Enter your old password.
Then enter your new password twice.

Operator jkb

Old password

New password

Confirm new password

OK Cancel

4. Do políčka **Old password** vložte momentálně platné heslo.

Při psaní se heslo nezobrazuje. V heslech je třeba rozlišovat velká a malá písmena.

5. Nové heslo vložte do políčka **New password**.

Nová hesla musejí být vytvořena v souladu s pravidly jejich tvorby; tato pravidla jsou definována administrátorem programu UserManagement.

6. Nové heslo vložte ještě jednou do políčka **Confirm new password**.
7. Klikněte na **OK** a zavřete zprávu potvrzující úspěšnou změnu hesla.



Objeví-li se chybové hlášení, zopakujte všechny požadované kroky.



E.4 Zamykání a odemykání uživatelů

Administrátoři programu UserManagement mohou uživatele kdykoli ze systému vyloučit. Vyloučení uživatelé se pak nemohou přihlásit do žádné z těch aplikací systému Bruker Daltonics, které jsou programem UserManagement kontrolovány.

Opakované vkládání neplatného hesla vede k tomu, že je uživatel ze systému vyloučen. Administrátor programu UserManagement může určit, jaký počet zadání neplatných hesel může uživatel vložit před tím, než bude ze systému vyloučen.

O tom, že byli ze systému vyloučeni, budou uživatelé posléze informováni.

Přístup do systému může uživateli obnovit přístup pouze administrátor programu UserManagement.

E.5 Zamykání a odemykání aplikací programu Bruker Daltonics

V povoleném operačním módu mohou uživatelé přístup do jednotlivých aplikací programu Bruker Daltonics zamykat. Aplikaci může znovu otevřít pouze buď ten uživatel, který ji uzamkl anebo administrátor.

Poznámka Všechny aplikace programu Bruker Daltonics, které kontroluje UserManagement budou automaticky uzamčeny v případě, že kterákoli z nich nebude po určité době použita.

►► Zamčení aplikací systému Bruker:

1. Zvolte příkazy **Compass > Lock All Applications**.

Tím se otevře dialog, který bude uživatele informovat o tom, že je systém MALDI Biotyper uzamčen.



►► Odemčení aplikací systému Bruker:

1. Vložte platné uživatelské ID (rozlišujte velká a malá písmena) do políčka **Operator** v dialogu programu **MALDI Biotyper**.

V dialogu se zobrazí ten **Operator**, který aplikaci uzamkl.

Poznámka: Jiní uživatelé než operátor, který aplikace uzamkl, musejí mít právo tyto aplikace odemknout.

2. Vložte platné uživatelské ID (rozlišujte velká a malá písmena).
3. Klikněte na nabídku **Log On**.

Příloha F — Glosář

A

Active (target) position – Aktivní (cílová) pozice

Cílová pozice zvolená pro vložení údajů o pozici analytu vybraného pro vložení potřebných údajů. Na displeji stránky Analyte Placement je tato pozice označena bílým kroužkem.

Ambiguous result – Nejednoznačný výsledek

Nejednoznačný výsledek je získán tehdy, jestliže je u jediného vzorku získána více než jedna pravděpodobná klasifikace druhu (hodnota skóre >2.0).

Analyte – Analyt

Vzorek nalyzovaný (tj. definovaný, změřený a oklasifikovaný) během klasifikace programem MALDI Biotyper.

Analyte Placement page – Stránka umístění analytu

Stránka v Průvodci programem IVD MALDI Biotyper RTC určená k vložení údajů o analytu a jeho pozici.

Analyte position – Pozice analytu

Pozice cílového analytu (= **Pozice** vložená na stránku **Analyte Placement** v Průvodci k programu MALDI Biotyper RTC). Target position with associated analyte data. Na cílové obrazovce vyznačena bílým kroužkem. Geometrická pozice terčiku se vzorkem, který má být analyzován. Lokalizace vzorku na MALDI terčiku, např. A1, B5, apod.

B

Bruker Bacterial Test Standard – Testovací standard

Preparát bakteriálních bílkovin, který se používá ke kalibraci přístroje. Bruker part no. #255343.

C

Chemical Risk & Safety Phrases (R&S-Phrases) – Upozornění na chemická a bezpečnostní rizika

Tato standardní upozornění objasňují rizika vznikající při zacházení s určitými reagensy (Riziková upozornění) a poskytují rady, jak se jim vyhnout (Bezpečnostní upozornění).

Classification – Klasifikace

Proces porovnávání profilů píků neznámého vzorku se všemi (nebo s podsouborem) referenčních profilů uložených v databázi programu MALDI

Biotyper. V závislosti na hodnotě skóre nejlepší shody je výsledek (identifikace) považován za úspěšný či neúspěšný.

Classification project – Klasifikační projekt

Zásobník všech dat vztahujících se ke klasifikaci vzorků na terčiku měřeném v jedné šarži.

Classification Results Report – Zpráva o výsledku klasifikace

Zpráva o výsledku klasifikace obsahuje seznam výsledků klasifikačního projektu v tabelární formě.

Classification run – Klasifikační chod

Série měření provedených pomocí přístroje MALDI Biotyper v rámci daného klasifikačního projektu.

Composite Correlation Index (CCI) Matrix analysis – Analýza matice kompozitního korelačního indexu (CCI)

Metoda použitá ke statistické analýze vztahů existujících mezi jednotlivými spektry.

Consistency category – Kategorie shody

Kategorie (A, B, or C), která vyjadřuje specifitu (tj. míru) shody u určitého druhu nebo rodu mikroorganismů.

F**flexControl**

Software, který řídí činnost hmotnostního spektrometru a usnadňuje akvizici dat.

Fume hood – Digestoř

Zařízení používané k bezpečnému odvodu chemických výparů z prostorů laboratoře, např. na základě jejich odsávání nebo absorpce ve filtrech obsahujících aktivní uhlí.

POZNÁMKA: Nezaměňovat s laminárním boxem (flowboxem), který se používá při práci s buněčnými kulturami. Tato zařízení odstraňují pouze pracovní částice, ne chemická činidla.

H**HCCA**

viz kyselina α -cyano-4-hydroxykořičová.

I**Identification – Identifikace**

Proces porovnávání profilu určitého píku zjištěného v neznámém spektru se všemi (nebo s podsouborem) referenčních profilů uložených v databázi programu

MALDI Biotyper. V závislosti na hodnotě skóre nejlepší shody je výsledek (identifikace) považován za úspěšný či neúspěšný.

Identification metod – Metoda identifikace

Soubor parametrů použitých k porovnání seznamu píků (neznámého spektra) s referenčními profily uloženými v knihovně známých profilů.

Inactive (target) position – Inaktivní pozice terčiku

Cílová pozice nezvolená pro vložení údajů o pozici analytu vybraného pro vložení stránku Analyte Placement. Na stránce Analyte Placement je tato pozice označena bílým kroužkem.

L

Library – Knihovna

Referenční hodnoty hmotnostních otisků (mass signatures) proteinů mikroorganismů uložené ve stukturu, která se podobá databázi.

M

MALDI

Akronym (zkratkové slovo) vytvořené z názvu Matrix Assisted Laser Desorption Ionization.

MALDI target – Maldí terčík

Nosič vzorku, obvykle ve formě ocelové destičky.

Matrix

Činidlo, které absorbuje UV záření a přenáší protony do jiných molekul. Nezbytné pro provádění MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

MSP

Hlavní spektrum.

P

Polymer signals – Polymerové signály

Stopy polymerů vyluhovaných z plastových materiálů. Jsou viditelné jako charakteristické profily četných opakujících se píků, jež se na ose x nacházejí v malých a stejných vzdálenostech (m/z-rozmezí).

Preprocessing metod – Metoda předběžného zpracování (předpřípravy)

Soubor parametrů použitých k vytvoření seznamu píků na základě (kalibrovaného) hrubého spektra.

Principal Component Analysis (PCA) – Analýza hlavních komponent (PCA)

Statistická analýza poskytující informace o heterogenitě či homogenitě daného souboru dat.

R

Realtime classification – Klasifikace v reálném čase

Kombinace měření s klasifikací vzorku.

S

Score value – Hodnota skóre

Biostatistický parametr, který vyjadřuje spolehlivost shody mezi profilem vzorku a profilem referenčním. Čím je hodnota skóre vyšší, tím vyšší je i míra shody.

Selected (target) position – Zvolená (cílová) pozice

Cílová pozice zvolená pro umístění analytu na cílovém displeji na stránce Analyte Placement. Je označena modrým čtverečkem.

Spot – Skvrna

Suchý vzorek anebo kapička aplikované na MALDI terčik.

T

Target position – Cílová pozice

Geometrická lokalizace na MALDI terčiku, např. A1, B5, atd.

V

Validation position – Validační pozice terčiku

Pozice terčiku obsahujícího testovací standard (Bruker Bacterial Test Standard). Používá se při prověrkách kalibrace a validace.

A

 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)

Matrix použitá pro měření přístrojem IVD MALDI Biotyper.

Index

A

Abort (Zrušit)
classification run (klasifikační chod) 60

Abort Classification button (Tlačítko pro
zrušení klasifikace) 60

Analyte-specific ranking table (report)
(Tabulka s pořadím analytů - zpráva) 70

Archived projects (Archivované projekty)
loading (ukládání) 61

B

Baseline Subtraction (Odečet od základní čáry)
101

C

Calibration (Kalibrace) 158

CCI 138

CCI analysis (CCI analýza) 138
classification (klasifikace) 142

results (výsledky) 141

CCI matrix
creating (vytvoření) 138

CCI Scores (CCI skóre) 86

Classification (Klasifikace)
CCI 142

MSP (Hlavní spektrum) 117

results (výsledky) 118, 144

subtyping (subtypizace) 119

Classification job files (Klasifikační soubory)
47

Classification results (Výsledky klasifikace)

viewing (zobrazení) 63

Classification Results Report (Zpráva o
výsledcích klasifikace)
Analyte-specific ranking table (Tabulka pořadí
analytů) 70

consistency categories (kategorie shody) 70

generating (generování) 65

Matching hints (Shodné výsledky) 68

Meaning of score values (význam hodnot
skóre) 69

printing (tisk) 65, 73

Project info (Projektové informace) 66

Result overview (Přehled výsledků) 67

Classification run (Klasifikační chod)
Abort (Zrušení) 60

following (sledování) 57

starting (zahájení) 53

Clear command (Příkaz vymazání) 45

Comment (Poznámka) 69

Composite Correlation Index See CCI
Kompozitní korelační index - viz CCI

Consistency categories (Kategorie shody) 70

CSV files (CSV soubory) 47

Current MSP (Aktuální MSP) 85

D

Delete Samples command (Příkaz k vymazání
vzorků) 45

Dendrogram
MSP 129

PCA clustering (Klastrování PCA) 138

E

Error Messages (Chybové hlášení)
MALDI Biotyper RTC 73

Existing project (Stávající projekt)
opening (otevření) 54

F

File View (Náhled souboru) 80

G

Gel View (Náhled gelu) 84

H

HCCA 150

I

Identification View (Náhled identifikace) 82
Import button (Tlačítko importu) 48
Import Project dialog (Dialog Project Import)
48

M

Main spectrum See MSP (Hlavní spektrum -
viz MSP)
MALDI Biotyper Metod Editor (Editor metody
programu MALDI Biotyper) 97
MALDI Biotyper OC 18
menus and commands (menu a příkazy) 144
starting the software (spuštění softwaru) 78
toolbars (panely nástrojů) 87
user interface (uživatelské rozhraní) 78
workflows (pracovní postupy) 90

MALDI Biotyper Offline Classification - viz
MALDI Biotyper OC
MALDI Biotyper Realtime Classification - viz
MALDI Biotyper RTC
MALDI Biotyper RTC 16, 20
error messages (chybová hlášení) 73
menus and commands (menu a příkazy) 77
result table (tabulka výsledků) 22
starting the software (spuštění softwaru) 20
toolbars (panely nástrojů) 21
troubleshooting (vyhledávání a odstraňování
chyb) 73
user interface (uživatelské rozhraní) 20
MALDI Biotyper RTC projects (Projekty
MALDI Biotyper RTC)
opening (otevření) 95
MALDI Biotyper RTC Wizard (Průvodce
programem MALDI Biotyper RTC) 24
starting (spuštění) 25
MALDI Biotyper Taxonomy Tree Editor
(Editor taxonomického dendrogramu
programu MALDI Biotyper) 123
MALDI targets (MALDI terčíky) 149
cleaning (čištění) 151
MALDI-TOF spectra (MALDI-TOF spektra)
measuring (měření) 157
Mass Adjustment (Úprava hmotnosti)
101
Matching hint (Míra shody) 69
Matching hints (report) (Zpráva o mírách
shody) 68
Matrix solution (Roztok matrix)
preparing (příprava) 150
Meaning of score values (report) (Význam
hodnot skóre) 69
Method (Metoda)
preprocessing (předběžné zpracování) 100

Method Editor (Editor (použité) metody) 97
Microorganisms (Mikroorganismy
culturing (kultivace) 153

Molecular Fingerprint (Molekulární
identifikátor) 17

MSP (Hlavní spektrum)
current (aktuální) 85

deleting (vymazání) 111, 114

selected (vybrané) 85

standard (standardní) 103

subtyping (subtypizace) 112

MSP classification (MSP klasifikace) 117

MSP dendrogram 129
creating (tvorba) 130

viewing (náhled) 130

MSP libraries (Knihovny hlavních spekter) 122
creating (tvorba) 128

using (užívání) 128

MSP peak lists (Seznam MSP píků) 108
editing (editace) 108

MSP Scores (MSP skóre) 86

MSPs (Hlavní spektra) 103
handling (manipulace) 95

highlighting (zvýraznění) 96

loading (vkládání) 95

selecting (výběr) 96

MSPS
removing (odstranění) 96

N

New classification project (Nový klasifikační
projekt)
creating (tvorba) 26

New Project dialog (Dialog Nový projekt) 28
Normalization (Normalizace) 101

O

Open Project dialog (Zahájení projektového
dialogu) 54, 55

Open Tree button (Tlačítko otevření
dendrogramu) 54, 55

P

PCA 132

PCA clustering (PCA klastrování) 132
dendrogram 138

results 135

Peak Picking (Výběr píků) 101

Preprocessing metod (Metoda předběžného
zpracování) 100

Preprocessing spectra (Předběžné zpracování
spekter) 100

Principal Component Analysis See PCA
(Analýza hlavních komponent - viz PCA)

Printing (Tisk)
classification results reports (zprávy o
výsledcích klasifikace) 65, 73

Processing methods (Metody zpracování) 96
creating (tvorba) 98

editing (editace) 98

selecting (výběr) 99

viewing (zobrazení) 98

Project (Projekt)
cancelling setup (zrušení setupu) 52

create using "Import" (vytvoření pomocí
příkazu "Import") 47

create using "New" (vytvoření pomocí
příkazu "Nový") 28

Project info (report) (Projektové informace - zpráva) 66
Project methods (Projektové metody) defining (definování) 50
Project Methods page (Stránka projektových metod) 50
Project settings (Nastavení rojektu) checking (kontrola) 51
Project Summary page (Souhrnná stránka projektu) 51
Protocols (Protokoly) 149
consumables (spotřební materiály) 149
solvents and chemicals (ředidla a chemikálie) 149

R

Result overview (report) (Pehled výsledků - zpráva) 67
Result table (Tabulka výsledků) MALDI Biotyper RTC 22
Results (Výsledky) viewing (náhled) 118
Results command (Příkazy) 65, 72

S

Sample data (Údaje o vzorku) barcode format (formát čárového kódu)36
character restrictions (zakázané znaky) 32
copying (kopírování) 37
CSV format (CSV formát) 47, 48
editing (editace)44
entering (vlození) 29, 32, 36, 37
importing (import) 41, 48
obligatory (povinná) 32

optional (opční) 32
pasting (vkládání)37
requirements (požadavky) 30
XML format 41

Sample positions (Pozice vzorku) deleting (vymazání) 45

Samples (Vzorky) classifying (klasifikace) 115
preparing (příprava) 153

Score value (Hodnota skóre) 17
calculating (výpočet)

116

Score values (report) (Zpráva o hodnotách skóre) 69

Scores (Skóre) CCI 86

MSP 86

Spectrum 85

Sub-MSP 86

Scores and Loadings Plots 135

Selected MSP 85

Sequential insert mode 30

Sequential Insert Mode command 30

Show Report command 121

Smoothing 101

Spectra (Spektra)

closing (zavírání) 94

handling (zacházení se spektry) 91

highlighting (zvýrazňování) 96

loading (vkládání) 91, 95

preprocessing (příprava/předběžné zpracování) 100

removing (odstraňování) 94

selecting (výběr) 96

Spectrum Scores (Skóre spektra) 85

Spectrum View (Náhled spektra) 82

Spectrum/Identification (Identifikace spektra)

82

Standard MSPs (Standardní hlavní spektra)
creating (tvorba) 103

Sub-MSP Scores (Skóre sub-MSP) 86

Subtyping (Subtypizace) 119

Subtyping MSP (Subtypizace MSP)
creating (tvorba) 112

Switch off scrolling (Vypnutí rolování) Y23

System components (Systémové komponenty)
16

T

Table (Tabulka)

CCI Scores (CCI skóre) 86

Current MSP (Aktuální hlavní spektrum) 85

MSP Scores (MSP skóre) 86

Selected MSP (Zvolené MSP) 85

Spectrum Scores (Skóre spektra) 85

Sub-MSP Scores (Skóre vedlejších MSP) 86

Table columns (Sloupky tabulky)

displaying (zobrazení) 86

hiding (skrytí) 86

Table View (Náhled tabulky) 85

Target positions (Pozice terčíku)
selecting (výběr) 30

Taxonomy tree (Taxonomický dendrogram)

122

creating (vytvoření) 123

deleting (vymazání) 128

Taxonomy Tree Editor (Editor taxonomického
dendrogramu) 123

Taxonomy Tree View (Náhled taxonomického
dendrogramu) 83

Toolbars (Panely nástrojů) 21, 87
MALDI Biotyper OC 87

MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2

MALDI Biotyper RTC 21

Troubleshooting (Hledání a odstraňování chyb)
MALDI Biotyper 147

MALDI Biotyper RTC 73

U

User interface (Uživatelské rozhraní)

MALDI Biotyper OC 78

MALDI Biotyper RTC 20

V

Validation check (Validační kontrola) 45

Validation position (Validační pozice) 45

Validation status (Uživatелеm definovaný
validační status)
user-defined 64

View (Náhled)

File (Soubor) 80

Gel 84

Identification (Identifikace) 82

Spectrum (Spektrum) 82

Spectrum/Identification/MSP Peak List
(Seznam spekter/identifikací/MSP píků) 82

Table (Tabulka) 85

Taxonomy Tree (Taxonomický dendrogram) 83

View Results button (Tlačítko zobrazení
výsledků) 65, 72

W

Welcome page (Uvítací stránka) 25

Bruker Daltonik GmbH

X

XML soubory 41

Z

Zooming (Tansfokace) 83

A

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid 150

