

Kit Respiratory Flow Chip

Identifikasi Patogen yang Menyebabkan Pernafasan Akut Berbasis Multiplex PCR dan Reverse Hybridization

Untuk semua platforms hybriSpot

Kompatibel dengan versi 2.2.0.R04 dan hybriSoft HSHS
Untuk kompatibilitas dengan versi lain, silahkan hubungi pabrikan / supplier.



Ref. MAD-003939M-HS12
Ref. MAD-003939M-HS



24 tests
24 tests

Untuk penggunaan Diagnostik In Vitro
Directive 98/79/EC



Isi

1. Kegunaan Kit	3
2. Prinsip tes.....	4
3. Komponen.....	4
4. Peralatan dan Material yang Dibutuhkan namun Tidak Disediakan dalam Kit.....	5
4.1. Reagen dan material.....	5
4.2. Peralatan	6
5. Penyimpanan dan Stabilitas.....	6
6. Perhatian dan Pencegahan	7
7. Preparasi Sampel Klinis Untuk Analisis	8
7.1. Preparasi Sampel	8
7.2. Eksraksi DNA dari lavage bronchoalveolar, aspirat nasofaring dan eksudat nasofaring	9
8. Prosedur Analisis untuk HS12 AND HS24 Platforms	9
8.1. Reaksi Amplifikasi DNA/RNA multiplex.....	9
8.2. Flow-through reverse hybridization	11
9. Prosedur Analisis untuk HS12a	12
10. Prosedur Kontrol Kualitas	12
11. Interpretasi Hasil	14
12. Karakteristik Performa.....	19
12.1. Fungsi Analitik pada platform manual.....	19
12.1.1. Pengulangan	19
12.1.2. Reproduksiabilitas.....	20
12.1.3. Spesifisitas Analitik	20
12.1.4. Sensitifitas Analitik	21
12.2. Fungsi Analitik pada platform otomatis Hybrispot 24	23
12.3. Fungsi Analitik pada platform otomatis Hybrispot 12 PCR AUTO.....	24
12.4. Performa Klinik.....	25
12.3.1. Spesifisitas dan Sensitifitas Diagnostik.....	26
13. Batasan	26
14. Penyelesaian Masalah	27
15. Daftar Pustaka	28
16. Simbol	28
17. Keterangan	29

1. Kegunaan Kit

Respiratory Flow Chip adalah kit diagnostik untuk identifikasi patogen utama yang menyebabkan infeksi saluran pernafasan akut. Organisme yang menyebabkan infeksi ini meliputi virus dan bakteri, relatif sering terjadi koinfeksi. Saat ini metode yang digunakan untuk diagnostik cukup mahal, sulit dan tidak selalu menunjukkan spesifisitas 100%. **Kit Respiratory Flow Chip** dapat mendeteksi 11 patogen secara simultan: Virus Influenza¹, Adenovirus², Bocavirus, Coronavirus³, Metapneumovirus, Virus Parainfluenza⁴, Virus Respiratory Syncytial (Subtype A and Subtype B), Rhinovirus, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* dan *Mycoplasma pneumoniae*, menggunakan amplifikasi viral DNA/RNA dengan reverse transcription dan multiplex PCR (RT-PCR) dan subsequent reverse hybridization pada membran yang mengandung probe spesifik untuk setiap spesies.

Kit Respiratory Flow Chip dapat mengidentifikasi agen infeksius dari purifikasi material genetik yang berasal dari beberapa jenis sampel klinis (eksudat nasofaring, aspirate nasofaring dan lavage bronchoalveolar).

¹Tipe virus influenza yang teridentifikasi:

- Influenza Tipe A: subtype H3 and subtype H1N1 (pandemic 2009)
- Influenza Tipe B

²Serotipe Adenovirus yang dapat dideteksi dengan kit (tidak terdeteksi secara individual):

- Tipe 1
- Tipe 2
- Tipe 3
- Tipe 4
- Tipe 6
- Tipe 7
- Tipe 8
- Tipe 11
- Tipe 12
- Tipe 16
- Tipe 18
- Tipe 21
- Tipe 31
- Tipe 34

³Identifikasi coronavirus:

- 229E
- HKU-1
- NL63
- OC43

⁴Tipe Virus Parainfluenza :

- Tipe 1
- Tipe 2
- Tipe 3
- Tipe 4

Status Microbiologis: Produk tidak steril

2. Prinsip Tes

Kit Respiratory Flow Chip didasarkan pada metodologi yang terdiri dari amplifikasi DNA virus secara simultan, RNA virus dan bakteri oleh RT-multiplex PCR hanya dalam satu langkah, diikuti oleh hibridisasi dalam membran dengan probe DNA spesifik pada alat DNA-Flow technology baik HybriSpot otomatis dan manual. Amplikon yang terbiotinilasi yang dihasilkan setelah RT-PCR digabungkan dalam membran yang berisi susunan probe spesifik untuk setiap virus serta probe kontrol amplifikasi dan hibridisasi. DNA-Flow technology memungkinkan pengikatan cepat produk PCR dan probe spesifiknya dalam lingkungan berpori tiga dimensi, dibandingkan dengan hibridisasi pada permukaan konvensional. Setelah pengikatan antara amplikon spesifik dan probe terkait telah terjadi, sinyal divisualisasikan melalui reaksi kolorimetri imunoenzymatic dengan Streptavidin – Alkaline Phosphatase dan kromogen (NBT-BCIP) menghasilkan endapan yang tidak larut dalam membran di posisi-posisi dimana telah terjadi hibridisasi. Hasilnya dianalisis secara otomatis dengan software *hybriSoft*.

3. Komponen

Kit Respiratory Flow Chip dipasarkan dalam dua format sesuai dengan jenis platform hibridisasi yang akan digunakan untuk analisis sampel klinis. Kedua format menyediakan semua reagen yang diperlukan untuk amplifikasi melalui RT-multiplex PCR dan hibridisasi selanjutnya dari 24 sampel klinis. Setiap format kit berisi komponen dan referensi berikut:

KIT/COMPONENTS	FORMAT	REFERENCES
Respiratory Flow Chip kit (Manual)	24 tests	MAD-003939M-HS12
1. Respiratory Flow Chip kit (PCR Reagents)	24 tests	MAD-003939M-P
Respiratory PCR Mix 1	3 strips × 8 tubes (clear)	MAD-003939M-MIX1
Respiratory PCR Mix 2	3 strips × 8 tubes (yellow)	MAD-003939M-MIX2
2. Respiratory Chips	24 tests	MAD-003939M-CH-HS
3. Flow Chip Hybridization Reagents Type I (Manual)	24 tests	MAD-003925M-HS12
Hybridization Solution (Reagent A)	40 ml	MAD-003930MA-HS12-24
Blocking Solution (Reagent B)	10 ml	MAD-003930MB-HS12-24
Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Reagent C)	10 ml	MAD-003930MC-HS12-24
Washing Buffer I (Reagent D)	35 ml	MAD-003930MD-HS12-24
Reagent E	10 ml	MAD-003930ME
Washing Buffer II (Reagent F)	18 ml	MAD-003930MF-HS12-24

Table 1. Reagen yang disediakan dalam Format Respiratory Flow Chip kit (Manual).

KIT/COMPONENTS	FORMAT	REFERENCES
Respiratory Flow Chip kit (Auto)	24 tests	MAD-003939M-HS
1. Respiratory Flow Chip kit (PCR Reagents)	24 tests	MAD-003939M-P
Respiratory PCR Mix 1	3 strips × 8 tubes (clear)	MAD-003939M-MIX1
Respiratory PCR Mix 2	3 strips × 8 tubes (yellow)	MAD-003939M-MIX2
2. Respiratory Chips	24 tests	MAD-003939M-CH-HS
3. Flow Chip Hybridization Reagents Type I (Auto)	24 tests	MAD-003925M-HS
Hybridization Solution (Reagent A)	60 ml	MAD-003930MA-HS24-24
Blocking Solution (Reagent B)	10 ml	MAD-003930MB-HS24-24

Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Reagent C)	10 ml	MAD-003930MC-HS24-24
Washing Buffer I (Reagent D)	35 ml	MAD-003930MD-HS24-24
Reagent E	10 ml	MAD-003930ME-HS24

Table 2. Reagen disediakan dalam format Kit Respiratory Flow Chip (Manual).

- **Kit Respiratory Flow Chip (PCR Reagen):** dikomersialkan dalam format strip 8 tabung sebanyak 0,2 ml yang mengandung reagen yang diliofilisasi sesuai dengan dua PCR mix – mix 1 and mix 2.
 - Tabung yang sesuai dengan mix 1 (bening) ditempatkan dalam format lyophilized sphere dengan warna biru yang komponennya adalah : PCR buffer, dNTPs (U/T), DNase and RNase-free water, biotinylated and non-biotinylated primers, DNA of an exogenous amplification control, RNase inhibitors, *Hot Start Polymerase*, *Reverse Transcriptase* and *Uracil DNA Glycosylase*. Primer yang dimasukkan adalah spesifik untuk amplifikasi 8 spesies virus : Virus Influenza A, Virus Influenza A Subtipe H3, Virus Influenza A Subtipe H1N1 (pandemic 2009), Virus Influenza B, Virus Respiratory Syncytial Subtipe A, Virus Respiratory Syncytial Subtipe B, Rhinovirus dan Metapneumovirus. Selanjutnya, primer dimasukan untuk amplifikasi fragmen DNA genom manusia (control endogen) dan fragmen DNA sintesis, digunakan sebagai kontrol amplifikasi eksogen.
 - Tabung yang sesuai dengan mix 2 (kuning) ditempatkan dalam format lyophilized sphere dengan warna putih yang komponennya adalah : PCR buffer, dNTPs (U/T), DNase and RNase-free water, biotinylated and non-biotinylated primers, DNA of an exogenous amplification control, RNase inhibitors, *Hot Start Polymerase*, *Reverse Transcriptase* and *Uracil DNA Glycosylase*. Primer yang dimasukkan adalah spesifik untuk amplifikasi 13 spesies dari spesies patogen : Adenovirus, Bocavirus, Parainfluenza virus Type 1, Parainfluenza virus Type 2, Parainfluenza virus Type 3, Parainfluenza virus Type 4, Coronavirus 229E, Coronavirus HKU-1, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Mycoplasma pneumoniae*. Selanjutnya, primer dimasukan untuk amplifikasi fragmen DNA genom manusia (control endogen) dan fragmen DNA sintetis, digunakan sebagai control amplifikasi eksogen.
- **Chip Respiratory:** Kit ini mencakup 24 chip secara total (Ref: MAD-003939M-CH-HS) yang berisi susunan probe DNA spesifik untuk setiap patogen yang termasuk dalam analisis, serta yang lainnya yang terkait dengan kontrol internal pada kit ini. Posisinya pada chip dapat dirujuk pada bagian 10 dari manual (INTERPRETASI HASIL)
- **Reagen Flow Chip Hybridization :** mengandung semua reagen yang diperlukan untuk proses hibridisasi reverse Flow-Through.

4. Material yang Tidak Disediakan Dalam Kit

4.1. Reagen dan Material

A. Reagen umum untuk platforms manual dan otomatis:

- Sarung tangan.
- Tip pipet dengan DNase/RNase-free filters.
- Untuk rekonstitusi reagen lyophilized: DNase/RNase-free water atau buffer yang disediakan dengan kit ekstraksi of starting genetic material (see Table 4).

B. Reagen Spesifik (Auto, ref: MAD-003939M-HS)

- Reagen Washing (Ref: MAD-003930WSH).

4.2. Peralatan

A. Peralatan umum untuk platform manual dan otomatis :

- Mikrosentrifuse.
- Mikropipet Otomatis: P1000, P200, P20 and P2.
- Untuk ekstraksi bahan genetik dari sampel lavage bronchoalveolar, aspirate nasofaring dan eksudat nasofaring. Disarankan menggunakan kit RNA/DNA purification. Pada table 4, menunjukkan secara detail mengenai informasi kit DNA/RNA purification dan peralatan ekstraksi yang mana kit Respiratory Flow Chip sudah tervalidasi.
- Software HybriSoft.

B. Peralatan khusus:

- Kit Respiratory Flow Chip (Manual) (Ref: MAD-003939M-HS12):
 - Peralatan manual untuk hibridisasi hybriSpot 12 (VIT-HS12).
 - Thermocycler
 - Blok thermal untuk memanaskan tabung PCR (dapat digantikan oleh thermocycler)
 - Plate yang dingin (4°C)
 - Thermostatic bath / heater.
- Kit Respiratory Flow Chip (otomatis) (Ref: MAD-003939M-HS):
 - Peralatan otomatis untuk hibridisasi hybriSpot 24 (VIT-HS24) atau hybriSpot 12 PCR AUTO (VIT-HS12a).
 - Thermocycler (tidak perlu hybriSpot 12 PCR AUTO).
 - Blok thermal untuk memanaskan tabung PCR (tidak perlu hybriSpot 12 PCR AUTO)
 - Plate yang dingin (4°C).

5. PENYIMPANAN DAN STABILITAS

Kit Respiratory Flow Chip terdiri dari dua komponen yang terpisah:

- **Kit Respiratory Flow Chip (Reagen PCR):** Dikirim dan disimpan dalam suhu 2-8°C. Reagen PCR stabil hingga tanggal kadaluarsa. Reagen PCR harus disimpan jauh dari sumber DNA kontaminan atau produk PCR. Setelah paket yang berisi strip tabung dengan campuran PCR yang diliofilisasi tersebut dibuka, tabung disimpan hingga maksimum satu minggu pada suhu 2-8°C dalam paket aslinya.
- **Respiratory Chips:** Dikirim dan disimpan dalam suhu 2-8°C.*. **Jangan dibekukan.** Chip stabil hingga tanggal kadaluarsa.
- **Reagen Hibridisasi:** Dikirim dan disimpan dalam suhu 2-8°C.*. **Jangan dibekukan.** Chip stabil hingga tanggal kadaluarsa. Rekomendasi sebelumnya mengenai reagen hibridisasi:

- Reagen hibridisasi A harus dipanaskan dalam suhu 41°C pada bak termostatik atau pemanas (hanya sebelum digunakan dalam peralatan manual) sebelum digunakan.
- Sisa reagen hibridisasi harus digunakan pada suhu kamar (20-25°C).

* Indikator suhu disertakan dalam paket untuk mengontrol kondisi selama pengiriman. Jika rantai dingin terputus, disarankan untuk menghubungi pabrik sebelum menggunakan reagen.

6. Peringatan dan Pencegahan

- **Baca instruksi sebelum menggunakan produk ini.**
- **Tindakan pencegahan dan keselamatan dan pembuangan dijelaskan dalam lembar data keselamatan produk ini.** Produk ini hanya ditujukan untuk keperluan laboratorium profesional, dan tidak ditujukan untuk farmakologis, rumah atau jenis penggunaan lainnya. Versi lembar data keselamatan produk ini dapat di unduh di halaman web www.vitro.bio atau dapat di email ke regulatory@vitro.bio.
- **Kit Respiratory Flow Chip** digunakan sebagai bahan awal, asam nukleat yang sebelumnya sudah diekstraksi dan dimurnikan. Ini adalah tanggung jawab customer untuk memasukkan kontrol yang diperlukan untuk memverifikasi bahwa sistem ekstraksi bahan genetik yang digunakan dapat berfungsi dengan baik.
- **Pertimbangan umum untuk menghindari degradasi RNA dengan ribonucleases (RNases)**
RNases adalah enzim yang sangat stabil. Sulit untuk dinonaktifkan, yang mana dapat mendegradasi RNA dengan cepat. Pengenalan RNases dalam sampel uji dan reagen yang digunakan untuk RT-PCR harus dihindari dengan mengambil tindakan pencegahan berikut :
 - Bekerja di area RNase-free yang bersih. Sumber kontaminasi RNase utama berasal dari partikel kulit dan debu, yang merupakan bakteri dan pembawa jamur.
 - Selalu menggunakan sarung tangan sekali pakai untuk mencegah kontaminasi RNase dari kulit.
 - Ganti sarung tangan sesering mungkin dan tutup tabungnya.
 - Gunakan tips tabung dan pipet RNase-free.
 - Bekerja cepat untuk menghindari degradasi RNA oleh RNase residual dan endogen selama proses persiapan sampel yang akan diamplifikasi.
- **Pertimbangan umum untuk menghindari kontaminasi dengan produk PCR:** Sumber kontaminasi terbesar biasanya produk amplifikasi PCR yang sama. Oleh karena itu, direkomendasikan untuk melakukan penanganan produk yang diamplifikasi di area yang berbeda dari yang dilakukan reaksi PCR. Disarankan untuk bekerja pada area pra dan pasca PCR yang berbeda dimana penanganan tes DNA dan persiapan tabung PCR (pra-PCR) dan penanganan dan hibridisasi produk yang diperkuat (post-PCR) dilakukan. Area-area ini harus dipisahkan secara fisik dan material laboratorium yang berbeda harus digunakan (jas laboratorium, pipet, tip, dll.) untuk menghindari kontaminasi sampel dengan DNA amplified, yang dapat mengarah pada diagnosis positif palsu. Alur kerja harus selalu berjalan dalam satu arah, dari area pra-PCR ke area pasca-PCR dan tidak pernah sebaliknya. Aliran material dan pribadi dari area pasca-PCR ke area pra-PCR harus dihindari. Lebih lanjut, untuk menghindari kontaminasi dengan produk PCR sebelumnya, enzim Uracil-DNA Glycosylase (Cod-UNG), yang menurunkan produk PCR yang mengandung dUTP, dimasukkan dalam kit.

Dianjurkan untuk menyertakan kontrol amplifikasi negatif yang mengandung semua reagen yang ditangani dalam kit, dari ekstraksi hingga amplifikasi, kecuali untuk sampel DNA/RNA, untuk mendeteksi dan mengendalikan kontaminasi yang mungkin terjadi pada reagen dengan sampel uji atau produk yang di amplifikasi. Hibridisasi pada membran kontrol ini harus negative, hanya menandai kontrol eksogen amplifikasi. Dengan cara ini, diverifikasi bahwa tidak ada kontaminasi pada DNA pasien

dan/atau DNA yang di amplifikasi di area pra-PCR.

- **Pembuangan Limbah:**

Penanganan limbah yang dihasilkan oleh penggunaan produk yang dikomersialkan oleh Vitro S.A. harus dilakukan sesuai dengan hukum yang berlaku di negara tempat produk ini digunakan. Sebagai referensi, tabel berikut menunjukkan klasifikasi limbah yang dihasilkan oleh kit ini sesuai dengan Undang-undang Eropa, khususnya sesuai dengan *European Commission Decision 18 2014* yang mengubah keputusan 2000/532/CE tentang daftar limbah sesuai dengan petunjuk 2008/98/EC Parlemen dan Dewan Eropa:

POTENSI LIMBAH YANG DIHASILKAN SETELAH MENGGUNAKAN PRODUK INI	KODE ELW*	JENIS LIMBAH SESUAI DENGAN ELW*
1. Sampah/limbah yang dihasilkan dari reagen hibridisasi 2. Pembuangan limbah cair ("Limbah" di platform manual dan otomatis)	161001	"Limbah cair yang mengandung zat berbahaya" setelah menambahkan 10% dari total volume agen desinfektan. Jika desinfeksi, tidak dilakukan, limbah ini harus dianggap sebagai "limbah yang penyimpanan dan pembuangannya mengacu pada persyaratan khusus untuk mencegah infeksi.
3. Chip yang digunakan 4. Bahan yang mudah rusak (tubes, tips, aluminum foil, dll.) 5. Setiap elemen yang telah bersentuhan sebelumnya dengan materi genetik	180103	"Limbah yang pengumpulan dan pembuangannya mengacu pada persyaratan khusus untuk mencegah infeksi".
6. Wadah untuk reagen yang digunakan merupakan berbahaya (menurut Safety Data Sheet)	150110	"Wadah yang memiliki residua tau terkontaminasi oleh zat berbahaya"

Table 3. Klasifikasi limbah yang dihasilkan oleh kit ini sesuai dengan Undang-Undang Eropa. *ELW: English acronym for *European Legislation of Waste*.

***Note:** Klasifikasi ini termasuk sebagai pedoman umum , karena berada di bawah tanggung jawab akhir pengguna untuk memenuhi semua peraturan lokal, regional dan nasional tentang pembuangan jenis material ini.

7. PREPARASI SAMPEL KLINIS UNTUK ANALISIS

7.1. Pengambilan sampel

Kit *Respiratory Flow Chip* sudah divalidasi untuk penggunaannya dengan bahan genetic yang dimurnikan dari bronchoalveolar lavage, nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal exudate. Sampel dari bronchoalveolar lavage diambil dari sampel rumah sakit dengan bronkoskop melalui instalasi dan aspirasi cairan berikutnya dari satu atau dua segmen paru-paru atau sub-segmen. Pada aspirasi nasofaring, probe dimasukkan melalui rongga hidung ke dinding posterior faring. Kemudian 1 mL larutan saline steril dimasukkan ke dalam salah satu lubang hidung menggunakan jarum suntik yang terpasang pada probe dan cahaya dengan pompa vakum atau jarum suntik diterapkan, menyedot sebanyak mungkin sekresi nasofaring. Dalam kasus eksudat nasofaring, sampel ini diambil dengan kapas. Swab dimasukkan dengan hati-hati ke bagian posterior rongga hidung. Ujung swab nasofaring yang digunakan harus dari polyester, rayon, atau nilon, dengan pegangan plastik yang lembut dan fleksibel (penyeka dengan ujung kalsium alginate atau kapas tidak boleh digunakan). Setelah dimasukkan, swab dipegang ditempat yang sama

selama sekitar 10 detik dan setelah itu swab ditempatkan dalam tabung steril yang kering. Sampel dikumpulkan dalam wadah steril dan disimpan pada 2-8 °C selama maksimal 48 jam. Setelah sampel dikumpulkan, kemudian disimpan pada suhu -80 °C untuk menjaga viabilitas virus.

7.2. Ekstraksi asam nukleat dari *bronchoalveolar lavages*, *nasopharyngeal aspirates* dan *nasopharyngeal exudates*

Kit *Respiratory Flow Chip* telah diuji dengan bahan genetik yang dimurnikan dari lavage bronchoalveolar manusia, aspirasi nasofaring atau eksudat nasofaring. Kit ini telah divalidasi dengan bahan genetik awal dari kit DNA / RNA purifikasi berikut dan peralatan ekstraksi * dari 200 µ sampel klinis dan dielusi dalam 100 µ buffer elusi:

KIT EKSTRAKSI	ALAT EKSTRAKSI
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics)	MagNA Pure Compact Instrument. Version 1.1.2 (Roche Diagnostics)
QIAasymphony Certal Kits (Qiagen)	QIAasymphony SP (Qiagen)
NucliSENS EasyMAG (Biomerieux)	NucliSENS EasyMAG (Biomerieux)
PureLink Viral RNA/DNA extraction mini kit (Invitrogen)	Manual system

Table 4. Kit ekstraksi dan instrumen yang digunakan untuk purifikasi DNA/RNA dari sampel klinis.

*Catatan: Sistem belum divalidasi dengan sistem ekstraksi DNA / RNA lainnya. Karena itu, jika ada sistem pemurnian lain yang digunakan, ini harus diverifikasi terlebih dahulu.

8. PROSEDUR ANALISA UNTUK PLATFORMS HS12 DAN HS24

8.1. Reaksi amplifikasi multipleks DNA/RNA

Thermal cyclers berikut ini sudah divalidasi dengan *Respiratory Flow Chip*:

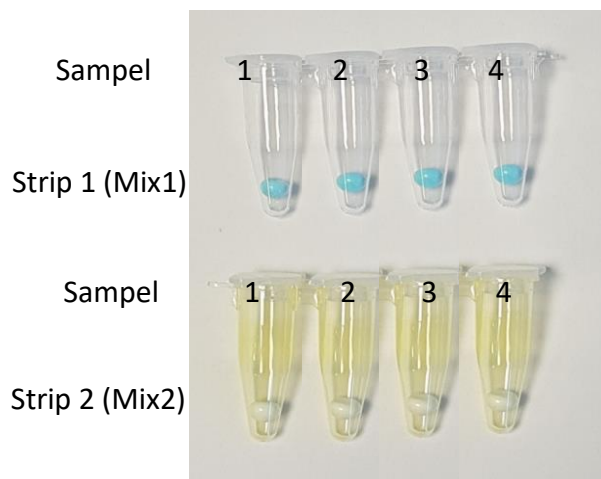
- *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems)
- *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems)
- *LifeEco (BioER) thermocycler*
- *MyCycler™ Thermal Cycler System* (BioRad)
- *GeneAmp PCR system 9700* (Applied BioSystems)
- *TProfessional ThermoCycler* (Biometra)

Reaksi PCR dilakukan dalam volume akhir 30 µl untuk setiap mix PCR. Bola lyophilized biru dan putih masing-masing sesuai dengan mix 1 dan mix 2 dan disuplai dalam strip terpisah. Dua tabung PCR harus digunakan untuk setiap sampel, satu untuk setiap strip.

Jika jumlah sampel yang dianalisis lebih rendah atau lebih tinggi dari 8, tabung yang diperlukan dapat dipisahkan dari setiap strip tanpa perlu menggunakan strip lengkap.

Setelah strip terbuka, **sisir tube lyophilizes yang tidak akan digunakan pada saat itu harus disimpan maksimal 1 minggu pada suhu 4 ° C dalam paket aslinya.**

Diagram di bawah ini menunjukkan contoh distribusi sampel / strip dalam kasus 4 sampel uji digunakan :



Prosedur:

- Ambil tabung mix 1 dan tabung mix 2 yang mengandung PCR mix lyophilized untuk setiap sampel yang akan dianalisis.
- Tambahkan hingga 30 µl material genetik dari setiap sampel yang sebelumnya dimurnikan (ekstraksi eluat) ke masing-masing tabung yang sesuai untuk kedua campuran PCR.
Jika jumlah sampel awal tersebut tidak tersedia, volume yang lebih rendah dapat digunakan (hingga minimal 3 µl/ reaksi PCR) dan selesaikan sisanya hingga 30 µl dengan DNase/RNase-free water, meskipun spesifikasi kit dalam istilah sensitivitas dan spesifitas klinis didasarkan pada penggunaan 30 µl sampel awal.
- Homogenkan reagen mix dengan pipet dan centrifuge selama beberapa detik.
- Tempatkan tabung pada thermocycler dan atur kondisi amplifikasi berikut:

PROGRAM PCR		
25 °C	5 menit	1 siklus
50 °C	20 menit	1 siklus
95 °C	5 menit	1 siklus
95 °C	30 detik	45 siklus
60 °C	1 menit	
8 °C	∞	

Table 5. Program PCR.

Biarkan tabung didinginkan pada 8-10 ° C saat reaksi selesai. Jika sampel tidak akan diproses pada saat itu, tabung tersebut dapat disimpan di zona post-PCR pada 8-10°C selama 1-2 hari. Untuk menyimpannya dalam jangka waktu yang lebih lama, disarankan untuk melakukannya pada suhu -20 ° C hingga maksimum satu minggu.

8.2. Hibridisasi flow-through reverse

Semua reagen disediakan dalam format "siap pakai".

Chip sekali pakai. Chip tersebut harus ditangani dengan menggunakan sarung tangan dan jauh dari sumber kontaminasi. Bergantung pada jenis kita yang kami gunakan, kita akan melanjutkan sebagai berikut:

A. Kit Respiratory Flow Chip untuk HS12 (Manual, ref: MAD-003939M-HS12):

Proses hibridisasi sepenuhnya dilakukan secara semi-otomatis di hybriSpot (HS12) mengikuti instruksi yang diberikan oleh sistem wizard. Manajemen sampel, pengambilan gambar dan analisis serta laporan hasil dilakukan oleh *hybriSoft software*.

Catatan: Konfigurasi instrumen dengan mengikuti instruksi user manual (diberikan bersama instrumen).

Sebelum memulai proses hibridisasi:

- Pre-heat **Reagent A** pada suhu **41°C** selama **setidaknya 20 menit** dalam bak thermostatically controlled bath.
- Produk **Mix PCR** yang diperoleh dengan **mix 1 dan mix 2** dan aliquot 50 µl dalam tabung mix baru, karena ini bahan yang digunakan dalam langkah-langkah berikut.
- **Denaturasikan produk PCR** dengan memanaskannya pada 95°C selama 10 menit (dalam thermal cycler atau blok pemanas) dan mendinginkan dengan cepat dengan menjaga sampel pada suhu 4°C selama minimal 2 menit.
- Tempatkan setiap **Chip Respiratory** pada posisi yang ditunjukkan pada platform (HS12).

Protokol Hibridisasi Manual:

- a) Atur suhu alat pada 4°C. Tambahkan **300 µl Reagent A (Hybridization Solution)** dipanaskan terlebih dahulu selama setidaknya 20 menit pada 41°C untuk setiap Chip dan inkubasi selama **minimal 2 menit pada 41°C**.
- b) Buang **reagen A (Hybridization Solution)** dengan mengaktifkan vacuum pump.
- c) Campurkan **50 µl** masing-masing sampel PCR dari kombinasi dua produk PCR yang diperoleh dengan mix 1 dan mix 2 (sebelumnya didenaturasi dan disimpan dalam es) dengan **230 µl Reagent A (Hybridization Solution)** (41°C) dan keluarkan mix Respiratory Chip yang sesuai.
- d) Inkubasi pada suhu **41°C selama 8 menit**.
- e) Aktifkan pump setidaknya selama 30 detik untuk membuang produk PCR.
- f) Cuci 3 kali dengan **300 µl Reagent A (Hybridization Solution)** (41°C).
- g) Atur suhu pada 29°C.
- h) Tambahkan **300 µl Reagent A (Blocking Solution)** dan inkubasi selama 5 menit.
- i) Aktifkan pump untuk melepaskan reagen B.
- j) Ketika suhu mencapai **29°C**, tambahkan **300 µl Reagen C (Streptavidin-Alkaline Phosphatase)** ke setiap Chip.
- k) Inkubasi selama **5 menit** pada suhu **29°C**.
- l) Aktifkan pump untuk membuang reagen.
- m) Atur suhu pada **36°C**.

- n) Cuci membran sebanyak **4 kali** dengan **300 µl** dengan **reagen D (Washing buffer I)**.
- o) Ketika suhu telah mencapai **36°C**, tambahkan **300 µl Reagent E (developer solution)** ke setiap Chip. Inkubasi selama **10 menit** pada **36°C**
- p) Aktifkan pump untuk membuang reagen.
- q) Cuci membrane sebanyak **2 kali** dengan **300 µl** dengan **reagen F (Washing buffer II)**.
- r) Aktifkan pump untuk membuang reagen.
- s) Lakukan pengambilan gambar, analisis dan laporan hasil dengan mengikuti instruksi dari manual penggunaan alat.

B. Kit Respiratory Flow Chip untuk HS24 (Auto, ref: MAD-003939M-HS):

Seluruh proses hibridisasi dilakukan secara otomatis di hybriSpot 24 (HS24). Manajemen sampel, pengambilan gambar dan analisis serta laporan hasil dilakukan melalui software hybriSoft.

Catatan: Konfigurasi instrumen dengan mengikuti instruksi manual pengguna (diberikan bersama instrumen).

Sebelum memulai proses hibridisasi:

1. Denaturasikan produk PCR dengan memanaskannya pada suhu **95°C selama 10 menit** dalam thermocycler atau blok pemanas dan dinginkan dengan cepat dalam es selama minimal **2 menit**.
2. Ikuti instruksi dalam manual untuk menempatkan tabung PCR dari Mix 1 dan 2, Chips Respiratory dan reagen dalam posisi yang sesuai dari platform otomatis HS24.
3. Pilih protokol yang sesuai pada alat untuk memulai proses secara otomatis.

9. PROSEDUR ANALISIS UNTUK HS12a

Amplifikasi melalui PCR dan proses hibridisasi dilakukan secara otomatis di platform Hs12a.

Pemrosesan sampel, pengambilan gambar dan analisis hasil dilakukan dengan perangkat lunak hybriSoft.

Sebelum memulai proses, disarankan untuk membaca manual pengguna dengan seksama (termasuk dalam platform Hs12a). Ikuti instruksi dalam manual untuk menempatkan strip tabung PCR, CHIP dan reagen hibridisasi dalam instrumen.

Protokol:

- Ambil tabung yang mengandung masing-masing campuran PCR yang liofilisasi per sampel untuk dianalisis.
- Tambahkan hingga 30 µl sampel dalam setiap tabung mengikuti protokol yang direkomendasikan di bagian 8.
- Mix dihomogenkan dengan menggunakan pipet dan centrifuge selama beberapa detik.
- Jika jumlah sampel yang dianalisis lebih rendah atau lebih tinggi dari 8, tabung yang diperlukan dapat dipisahkan dari strip tanpa perlu menggunakan strip lengkap. Sisa strip tabung liofilisasi yang tidak akan digunakan pada saat itu harus disimpan maksimum selama 1 minggu pada suhu 4°C dalam bungkus aslinya.
- Ikuti instruksi yang dijelaskan dalam manual instrumen Hs12a untuk menempatkan strip tabung PCR, chips dan reagen hibridisasi dalam instrumen dan memulai proses.

10. PROSEDUR KONTROL KUALITAS

Kit Respiratory Flow Chip berisi beberapa kontrol internal untuk mengontrol kualitas hasil.

SPOTS	KONTROL	POSISI (lihat gambar 1)
B	Kontrol Hibridisasi	1A-1B-2I-5E-8A
CI-1	Kontrol amplifikasi Eksogen mix 1	1C-5F
CI-2	Kontrol amplifikasi Eksogen mix 2	1D-5G
RNaseP	Kontrol amplifikasi Endogen mix 1	1E-6A
BG	Kontrol amplifikasi Endogen mix 2	1F-6B

Table 6. Probe kontrol yang terdapat di dalam *Respiratory Chip*.

Kontrol hibridisasi: Setelah pengembangan membran, sinyal yang kuat harus muncul di semua lima posisi kontrol hibridisasi (B), yang berfungsi sebagai kontrol kualitas. Sinyal ini menunjukkan bahwa reagen hibridisasi dan pengembangan telah bekerja dengan baik. Jika sinyal tidak muncul, ini menunjukkan bahwa telah terjadi kesalahan selama proses hibridisasi atau bahwa reagen belum digunakan dengan benar. Selain itu, sinyal ini memungkinkan perangkat lunak untuk mengarahkan panel probe dengan benar untuk melakukan analisis selanjutnya.

Kontrol amplifikasi eksogen (CI-1): penyelidikan untuk mendeteksi DNA sintetis yang termasuk dalam mix 1 PCR. DNA ini akan diamplifikasi bersama dengan materi genetik sampel. Dua sinyal positif dalam kontrol amplifikasi eksogen 1 (CI-1) akan menunjukkan bahwa reaksi PCR dalam campuran 1 telah bekerja dengan benar. Hasil negatif dalam kontrol ini tidak membatalkan hasil jika kontrol endogen 1 telah dengan benar diamplifikasi dan atau sampel positif untuk semua organisme yang termasuk dalam campuran.

Kontrol amplifikasi eksogen (CI-2): penyelidikan untuk mendeteksi DNA sintetis yang termasuk dalam mix 2 PCR. DNA ini akan diamplifikasi bersama dengan materi genetik sampel. Dua sinyal positif dalam kontrol amplifikasi eksogen 2 (CI-2) akan menunjukkan bahwa reaksi PCR dalam mix 2 telah bekerja dengan benar. Hasil negatif dalam kontrol ini tidak membatalkan hasil jika kontrol endogen 2 telah diamplifikasi dengan baik dan atau sampel positif untuk semua organisme yang termasuk dalam campuran.

Kontrol amplifikasi endogen mix 1 (RNaseP): penyelidikan untuk mendeteksi DNA gen RNaseP manusia yang diperkuat bersama selama PCR ketika mix 1 digunakan. Semua sampel di mana tes DNA telah diamplifikasi dengan benar akan memiliki sinyal positif dalam Kontrol amplifikasi Endogen (RNaseP). Sinyal ini menunjukkan kualitas/kuantitas DNA yang digunakan dalam amplifikasi. Sinyal positif menunjukkan bahwa amplifikasi telah bekerja dengan benar dan bahwa kualitas dan kuantitas DNA yang digunakan telah optimal. Kurangnya sinyal untuk kontrol ini menunjukkan kesalahan selama amplifikasi, karena rendahnya kualitas/kuantitas DNA yang digunakan dalam amplifikasi atau kurangnya DNA manusia dalam amplifikasi. Hasil negatif dalam kontrol ini tidak membatalkan hasil jika kontrol eksogen 1 telah dengan benar diamplifikasi dan atau sampel positif untuk semua organisme yang termasuk dalam campuran. Kasus terakhir kemungkinan terjadi dengan jenis spesimen klinis yang mengandung jumlah sel manusia yang lebih sedikit.

Kontrol amplifikasi endogen mix 2 (BG): penyelidikan untuk mendeteksi DNA gen beta-globulin manusia, yang di-amplifikasi selama PCR ketika mix 2 digunakan. Semua sampel di mana tes DNA telah diamplifikasi dengan benar akan memiliki sinyal positif dalam kontrol amplifikasi Endogen (BG). Sinyal ini menunjukkan kualitas/kuantitas DNA yang digunakan dalam amplifikasi. Sinyal positif menunjukkan bahwa amplifikasi telah bekerja dengan benar dan bahwa kualitas dan kuantitas DNA yang digunakan telah optimal. Kurangnya sinyal untuk kontrol ini menunjukkan kesalahan selama amplifikasi, karena rendahnya kualitas/kuantitas DNA yang digunakan dalam amplifikasi atau kurangnya DNA manusia dalam amplifikasi.

Hasil negatif pada kontrol ini tidak membatalkan hasil jika kontrol eksogen 2 telah diperkuat dengan benar dan atau sampel positif untuk semua organisme yang termasuk dalam campuran ini. Kasus terakhir kemungkinan terjadi dengan jenis spesimen klinis yang mengandung jumlah sel manusia yang lebih sedikit.

Ketika sampel positif untuk semua patogen yang termasuk dalam kit, dengan hasil negatif untuk kontrol amplifikasi eksogen dan endogen, laporan untuk analisis otomatis hasil dengan perangkat lunak HybriSoft menunjukkan peringatan "tidak ada kontrol eksogen / tidak ada manusia Kontrol DNA "bagi pengguna untuk melakukan verifikasi yang sesuai sebelum memvalidasi hasilnya.

Pengguna bertanggung jawab untuk menentukan prosedur kontrol kualitas yang sesuai untuk laboratorium mereka dan mematuhi undang-undang yang berlaku.

11. INTERPRETASI HASIL

Interpretasi hasil dilakukan secara otomatis menggunakan software analisis HybriSoft. Skema berikut menunjukkan pengaturan probe pada Respiratory Chip:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B	FluA	PIV-1	CoV-OC43		RNaseP	RSV-A	B	
B	B	FluA-H1N1	PIV-2	BP		BG	RSV-B	CoV-229E	
C	CI-1	FluA-H3	PIV-3	BPP			RhV	CoV-HKU1	
D	CI-2	FluB	PIV-4	MP			PIV-1	CoV-NL63	
E	RNaseP	MPV	AdV		B	FluA	PIV-2	BPP	
F	BG	RSV-A	BoV		CI-1	FluA-H1N1	PIV-3	MP	
G		RSV-B	CoV-229E		CI-2	FluA-H3	PIV-4		
H		RhV	CoV-HKU1		CoV-OC43	FluB	AdV		
I		B	CoV-NL63		BP	MPV	BoV		

Gambar 1: Skema pengaturan probe pada array.

"B": Kontrol Hibridisasi

"CI-1": Kontrol amplifikasi eksogen mix 1

"CI-2": Kontrol amplifikasi eksogen mix2

"RNaseP": Kontrol amplifikasi endogen mix 1 (fragmen RNaseP manusia)

"BG": Kontrol amplifikasi endogen mix 2 (fragmen β -Globin manusia)

"X": Probe spesifik untuk setiap patogen

Semua probe digandakan untuk menjamin keandalan dalam hasil analisis otomatis. Kontrol hibridisasi (B) diulangi dalam 5 posisi dan memungkinkan perangkat lunak untuk mengorientasikan dengan benar panel probe untuk analisis sesudahnya.

Distribusi probe yang berbeda termasuk dalam **Respiratory Chip** serta kemungkinan hasil yang diharapkan dan interpretasinya ditunjukkan di bawah ini:

EXPECTED RESULTS (DETECTED PATHOGENS)	PROBE ID	PROBE/POSITION(column-row)					
		PROBE	B	CI-1	CI-2	RNaseP	BG
Influenza A	FluA	2A-6E	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Influenza A, subtype H1N1 (pandemic 2009)*	FluA-H1N1	2B-6F	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Influenza A, subtype H3**	FluA-H3	2C-6G	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Influenza B	FluB	2D-6H	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Metapneumovirus	MPV	2E-6I	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Respiratory Syncytial Virus Subtype A	RSV-A	2F-7A	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Respiratory Syncytial Virus Subtype B	RSV-B	2G-7B	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Rhinovirus	RhV	2H-7C	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Parainfluenza Type 1	PIV-1	3A-7D	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Parainfluenza Type 2	PIV-2	3B-7E	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Parainfluenza Type 3	PIV-3	3C-7F	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Parainfluenza Type 4	PIV-4	3D-7G	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Adenovirus	AdV	3E-7H	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Bocavirus	BoV	3F-7I	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Coronavirus 229E	CoV-229E	3G-8B	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Coronavirus HKU-1	CoV-HKU1	3H-8C	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Coronavirus NL63	CoV-NL63	3I-8D	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Coronavirus OC43	CoV-OC43	4A-5H	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Bordetella pertussis</i>	BP	4B-5I	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Bordetella parapertussis</i>	BPP	4C-8E	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MP	4D-8F	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Negative sample	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	1E-6A	1F-6B
Blank	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	--	--
Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--	1D-5G	--	--
Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	--	--	--

Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--	--/1E-6A	--
Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--	--/1D-5G	--	-- /1F-6B
Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	1E-6A	--
Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	--	1F-6B
Negative sample	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--	--/1D-5G	1E-6A	1F-6B
Negative sample	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--	1E-6A	1F-6B
Invalid results	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--	--	--	--
Hybridization error	--	--	--	--	--	--	--

Tabel 7. Posisi Probe pada Chip Respiratory dan Interpretasi Hasil.

*** Catatan:** Identifikasi positif dari virus influenza A subtipe H1N1 diperoleh melalui kepositifan dari pemeriksaan FluA-H1N1 bersama dengan kepositifan untuk pemeriksaan FluA (meskipun hasil negatif untuk FluA tidak menunjukkan hasil invalid).

**** Catatan:** Identifikasi positif dari influenza A subtipe H3 diperoleh melalui kepositifan probe FluA-H3 bersama dengan kepositifan untuk pemeriksaan FluA (meskipun hasil negatif untuk FluA tidak menunjukkan hasil invalid).

Contoh hasil di mana sampel yang dianalisis positif untuk Coronavirus Type 229E (CoV-229E) ditunjukkan di bawah ini:



Respiratory Flow Chip Kit

LOTS

PCR:	RES004L	12/30/2022
Chips:	RESE030B-L	12/30/2022
Reagent:	HPVH036.2-7	12/30/2022

SAMPLE DETAILS

ID SAMPLE: Sample-01

SAMPLE TYPE:

ID PATIENT:

PATIENT:

SEX:

-

BIRTHDATE:

AGE:

REPORT

RES POSITIVE

Positive sample for:
Human Coronavirus 229E

The sample is negative for the rest of bacteria and virus included in the RES flow chip test.

PROTOCOL

Detection of a panel of viruses and bacteria that causing acute respiratory infections by multiplex-RT-PCR and Automatic Reverse Dot Blot that includes:

- Virus: Influenza Virus A/Influenza Virus A H1N1 2009/Influenza Virus A H3/Influenza Virus B/human Metapneumovirus/Respiratory syncytial virus A/Respiratory syncytial virus B/human Rhinovirus/human Parainfluenza virus type 1/ human Parainfluenza virus type 2/ human Parainfluenza virus type 3/ human Parainfluenza virus type 4/Adenovirus/human Bocavirus/human Coronavirus 229E/ human Coronavirus HKU/ human Coronavirus NL63/ human Coronavirus OC43

- Bacteria: Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis/Mycoplasma pneumoniae

Add cell suspension/purified DNA for PCR amplification:

PCR Protocol: 1x [25° 5 min]; 1x [50° 20 min]; 1x [95° 5 min]; 45x [95° 30 s-60° 1min]; 1x [8°C, ∞].

REVERSE-DOT BLOT protocol:

- Hybridization of the biotinylated PCR products to the Respiratory Flow CHIP.

- Post-hybridization washes.

- Streptavidin-Alkaline Phosphatase incubation.

- NBT-BCIP development.

Automatic analysis of results

NOTES

FACULTATIVE: Default Doctor, doctor

Validated: 9/10/2019

Performed by: Default Tech, tech

Processed: 9/10/2019



Respiratory Flow Chip Kit

LOTS

PCR:	RES004L	12/30/2022
Chips:	RESE030B-L	12/30/2022
Reagent:	HPVH036.2-7	12/30/2022

SAMPLE DETAILS

ID SAMPLE: Sample-01

SAMPLE TYPE:

ID PATIENT:

PATIENT:

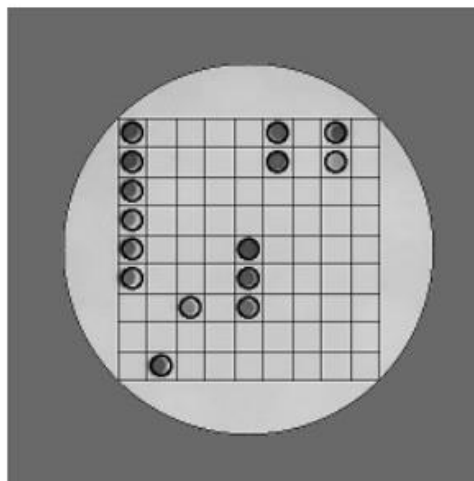
SEX:

BIRTHDATE:

AGE:

REPORT

B	FluA	PIV-1	CoV-OC43	RNaseP	RSV-A	B	
B	FluA-H1N1	PIV-2	BP	BG	RSV-B	CoV-229E	
CI-1	FluA-H3	PIV-3	BPP		RhV	CoV-HKU1	
CI-2	FluB	PIV-4	MP		PIV-1	CoV-NL63	
RNaseP	MPV	AdV		B	FluA	PIV-2	BPP
BG	RSV-A	BuV		CI-1	FluA-H1N1	PIV-3	MP
	RSV-B	CoV-229E		CI-2	FluA-H3	PIV-4	
	RhV	CoV-HKU1	CoV-OC43	FluB	AdV		
B	CoV-NL63		BP	MPV	BuV		



- Spot "B": Hybridization control (5 signals to orientate the CHIP)
 - Spot "CI-1": Amplification control for reaction mixture Mix-1. - Spot "CI-2": Amplification control for reaction mixture Mix-2.
 - Spot "RNaseP": DNA Control for reaction mixture Mix-1. - Spot "BG": DNA Control for reaction mixture Mix-2.
 - Spot "#": Pathogen specific probes
- All the spots are printed in duplicate.

ANALYSIS INFORMATION

Threshold: 4

FACULTATIVE:	Default Doctor, doctor	Validated:	9/10/2019
Performed by:	Default Tech, tech	Processed:	9/10/2019

Gambar 2. Contoh laporan yang diperoleh untuk kasus positif hanya untuk Coronavirus Type 229E (CoV-229E).

12. PERFORMA KARAKTERISTIK

12.1. Fungsi Analitik pada platform manual

12.1.1. Pengulangan

Pengulangan metode dianalisis dengan menguji metode 6 kali untuk setiap patogen yang termasuk dalam panel, menggunakan konsentrasi yang diketahui bahan genom dari berbagai virus/bakteri dari perusahaan Vircell (Influenza A, subtype H1N1 (pandemi 2009), Influenza A, subtype H3, Virus Syncytial Respiratory Subtype A, Virus Respiratory Syncytial Subtype B, Rhinovirus, Parainfluenza Tipe 1, Parainfluenza Tipe 2, Parainfluenza Tipe 3, Parainfluenza Tipe 4, Coronavirus 229E dan *Mycoplasma pneumoniae*), kecuali untuk bahan yang tidak tersedia, yang mana DNA / RNA sintetik dari urutan target digunakan (Influenza A, Influenza B, Metapneumovirus, Adenovirus, Bocavirus, Coronavirus HKU-1, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43, *Bordetella pertussis*, dan *Bordetella parapertussis*). Pengujian dilakukan oleh operator yang sama, di satu lokasi dan menggunakan lot reagen yang sama dan peralatan hybriSpot yang sama. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan hybriSoft HSHS v.2.2.0.R04.

TARGET	PROBES	No. COPIES / REACTION	POSITIVE / TESTED	% POSITIVE
Influenza A*	FluA	100	6/6	100%
Influenza A, subtype H1N1 (pandemic 2009)*	FluA-H1N1	10	6/6	100%
Influenza A, subtype H3	FluA-H3	100	6/6	100%
Influenza B	FluB	500	6/6	100%
Metapneumovirus	MPV	500	6/6	100%
Respiratory Syncytial Virus	RSV-A	100	6/6	100%
Respiratory Syncytial Virus	RSV-B	100	6/6	100%
Rhinovirus	RhV	100	6/6	100%
Parainfluenza Type 1	PIV-1	100	6/6	100%
Parainfluenza Type 2	PIV-2	100	6/6	100%
Parainfluenza Type 3	PIV-3	100	6/6	100%
Parainfluenza Type 4	PIV-4	250	6/6	100%
Adenovirus	AdV	100	6/6	100%
Bocavirus	BoV	100	6/6	100%
Coronavirus 229E	CoV-229E	250	6/6	100%
Coronavirus HKU-1	CoV-HKU1	100	6/6	100%
Coronavirus NL63	CoV-NL63	500	6/6	100%
Coronavirus OC43	CoV-OC43	100	6/6	100%
<i>Bordetella pertussis</i>	BP	250	6/6	100%
<i>Bordetella parapertussis</i>	BPP	50	6/6	100%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MP	100	6/6	100%

Tabel 8. Tes pengulangan untuk masing-masing patogen yang termasuk dalam panel Respiratory Flow Chip kit. * Target Influenza A berisi dua probe berbeda, masing-masing dengan sensitivitas berbeda.

12.1.2. Reprodusibilitas

Reprodusibilitas metode dianalisis dengan mensimulasikan variabilitas antar-laboratorium, mengubah operator, peralatan yang digunakan dalam proses dan banyak mix PCR. 47 sampel RNA dari strain virus influenza (Siklus ambang batas antara 18 dan 40 diperoleh dengan Simplexa™ Flu A / B & RSV Kit, Focus Diagnostics) dan 24 sampel negatif diuji. Konkordansi dihitung, memperoleh indeks kappa 0,908, kesalahan standar 0,052 dan 95% CI 0,807-1,010, menunjukkan signifikansi statistik dari tes reprodusibilitas dengan kit Respiratory Flow Chip.

12.1.3. Spesifisitas Analitik

Eksperimen untuk menentukan kasus potensial non-spesifisitas silang antara anggota panel dilakukan dengan menggunakan jumlah salinan spesifik dari masing-masing oligos sintetis (1×10^6 salinan) yang mewakili masing-masing patogen, tanpa silang non-spesifisitas yang diamati antara anggota panel:

ORGANISME	SPESIFISITAS
Influenza A	100%
Influenza A, subtype H1N1 (pandemic 2009)*	100%
Influenza A, subtype H3	100%
Influenza B	100%
Metapneumovirus	100%
Respiratory Syncytial Virus Subtype A	100%
Respiratory Syncytial Virus Subtype B	100%
Rhinovirus	100%
Parainfluenza Type 1	100%
Parainfluenza Type 2	100%
Parainfluenza Type 3	100%
Parainfluenza Type 4	100%
Adenovirus	100%
Bocavirus	100%
Coronavirus 229E	100%
Coronavirus HKU-1	100%
Coronavirus NL63	100%
Coronavirus OC43	100%
<i>Bordetella pertussis</i>	100%
<i>Bordetella parapertussis</i>	100%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100%

Tabel 9. Spesifisitas intra-panel *Respiratory Flow Chip* kit.

Non-spesifisitas dengan virus lain, bakteri atau jamur yang mungkin terkait secara filogenetik dengan anggota panel atau ada dalam flora karakteristik saluran pernapasan yang tidak diamati:

MIKROORGANISME YANG DIUJI (1×10^4 TOTAL SALINAN)		
Bacteria	Virus	Fungi
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMV	<i>Candida albicans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	VHS-1	
<i>Serratia marcescens</i>	MUV	
<i>M. tuberculosis</i>	VHS-2	
<i>N. gonorrhoeae</i>	VEB	
<i>C. trachomatis</i>	MEV	
<i>M. hominis</i>	Enterovirus	
<i>S. pneumoniae</i>		
<i>S. agalactiae</i>		
<i>N. meningitidis</i>		
<i>M. genitalium</i>		
<i>B. burgdorferi</i>		
<i>C. neoformans</i>		
<i>L. monocytogenes</i>		
<i>E. coli</i>		

Tabel 10. Daftar patogen yang termasuk dalam tes Spesifisitas "antar-panel" yang dianalisis dengan kit Respiratory Flow Chip.

12.1.4. Sensitifitas Analitik

Untuk memverifikasi secara analitik kinerja sistem yang dirancang, kami bekerja dengan bahan genom dari berbagai virus/bakteri dari perusahaan Vircell (Influenza A, subtype H1N1 (pandemi 2009), dan subtype H3, Respiratory Syncytial Virus Subtype A, Respiratory Virus Syncytial Subtype B, Rhinovirus, Parainfluenza Tipe 1, Parainfluenza Tipe 2, Parainfluenza Tipe 3, Parainfluenza Tipe 4, Coronavirus 229E dan *Mycoplasma pneumoniae*), telah digunakan, kecuali untuk mereka yang bahannya tidak tersedia, yang mana DNA/RNA sintetiknya dapat berdampingan. wilayah target patogen yang berbeda termasuk dalam panel urutan target (Influenza A, Influenza B, Metapneumovirus, Adenovirus, Bocavirus, Coronavirus HKU-1, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43, Bordetella pertussis, dan Bordetella parapertussis). Batas deteksi kit (LoD) dihitung untuk masing-masing gen yang dianalisis. Penentuan jumlah minimum salinan yang terdeteksi dilakukan melalui pengenceran seri bahan gen atau, jika gagal, DNA/RNA sintetik dari masing-masing patogen yang termasuk dalam panel dengan 20 ng DNA genom manusia. Untuk menghitung sensitivitas, setiap kasus diulangi sebanyak 12 kali. Semua PCR digabungkan dengan menggunakan platform manual. Hasilnya dianalisis dengan hybriSoft v.2.2.0.R02 dan nilai yang ditetapkan untuk sinyal positif adalah 4 (intensitas abu-abu).

ORGANISM	PROBE	No. COPIES/ REACTION	POSITIVE/ TESTED	SENSITIVITY	95% CONFIDENCE INTERVAL	SPECIFICITY	95% CONFIDENCE INTERVAL
Influenza A	FluA	100	12/12	100%	80.5%-100%	99%	97.8%-99.7%
	FluA	50	2/3	67%	20.8%-93.9%	99%	97.8%-99.7%
Influenza A, subtype	FluA-H1N1	100	3/3	100%	43.8%-100%	100%	99.2%-100%

H1N1 (pandemic 2009)*	FluA-H1N1	10	10/10	100%	77.2%-100%	100%	99.2%-100%
Influenza A, subtype H3	FluA-H3	250	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	FluA-H3	100	17/21	81%	60%-92.3%	100%	98.5%-100%
Influenza B	FluB	500	12/12	100%	69%-100%	100%	98.5%-100%
	FluB	250	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
Metapneumovirus	MPV	500	10/10	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	MPV	250	3/6	50%	18.8%-81.2%	100%	98.5%-100%
Respiratory Syncytial Virus Subtype A	RSV-A	100	10/10	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	RSV-A	50	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
Respiratory Syncytial Virus Subtype B	RSV-B	50	8/8	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	RSV-B	10	0/3	0%	0%-69%	100%	98.5%-100%
Rhinovirus	RhV	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	RhV	50	11/13	66.7%	30%-90.3%	100%	98.5%-100%
Parainfluenza Type 1	PIV-1	100	13/13	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-1	50	0/6	0%	0%-48%	100%	98.5%-100%
Parainfluenza Type 2	PIV-2	50	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-2	10	2/3	67%	20.8%-93.9%	100%	98.5%-100%
Parainfluenza Type 3	PIV-3	250	13/13	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-3	100	11/15	73.3%	48%-89.1%	100%	98.5%-100%
Parainfluenza Type 4	PIV-4	250	7/7	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-4	100	2/3	66.7%	20.8%-93.9%	100%	98.5%-100%
Adenovirus	AdV	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	AdV	50	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
Bocavirus	BoV	100	15/15	100%	61%-100%	99%	97.6%-99.82%
	BoV	50	5/6	83.3%	43.6%-97%	99%	97.6%-99.82%
Coronavirus 229E	CoV-229E	250	15/15	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-229E	100	3/5	66.7%	20.8%-93.9%	100%	98.5%-100%
Coronavirus HKU-1	CoV-HKU1	250	7/7	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-HKU1	100	11/15	73.3%	48%-89.1%	100%	98.5%-100%
Coronavirus NL63	CoV-NL63	250	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-NL63	100	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
Coronavirus OC43	CoV-OC43	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-OC43	50	5/6	83.3%	43.6%-97%	100%	98.5%-100%

<i>Bordetella pertussis</i>	BP	250	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	BP	100	0/3	0%	0%-69%	100%	98.5%-100%
<i>Bordetella parapertussis</i>	BPP	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	BPP	50	4/6	66.7%	30%-90.3%	100%	98.5%-100%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MP	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	MP	50	2/3	66.7%	20.8%-93.9%	100%	98.5%-100%

Tabel 11. Sensitivitas analitik dan uji spesifisitas menggunakan jumlah salinan materi genomik yang berbeda atau, jika gagal, sintetik DNA / RNA yang sesuai dengan masing-masing patogen yang termasuk dalam panel, menetapkan nilai cut-off positif 4.

12.2. Fungsi Analitik pada platform otomatis HybrisSpot 24

Performa dan kekokohan dari Respiratory Flow Chip kit pada platform otomatis divalidasi dengan menganalisis sejumlah salinan materi gen dari tiga patogen yang termasuk dalam panel. Reproduksi hasil yang diperoleh dengan platform otomatis HS24 dievaluasi dengan membandingkan hasil yang diperoleh dalam platform manual. Dua jenis tes dilakukan:

12.2.1. Reproduksi hasil dalam program untuk jumlah sampel yang berbeda

Replika sampel positif yang mengandung sejumlah salinan batas RNA Virus Influenza A Tipe H3 dan Virus Parainfluenza Tipe 2 (100 salinan dari masing-masing patogen) sudah dibuat. Untuk mengevaluasi kemampuan reproduksi platform otomatis HS24, ulangan ditempatkan pada posisi berbeda dari ruang reaksi dalam peralatan, dan empat protokol berbeda dievaluasi:

- Protokol untuk 2 sampel (2 replika)
- Protokol untuk 12 sampel (3 replika)
- Protokol untuk 15 sampel (3 replika)
- Protokol untuk 24 sampel (4 replika)

Hasilnya dianalisis secara otomatis dengan hybriSoft v.2.2.0.R00 dan tidak ada perbedaan antara posisi yang berbeda dari ruang reaksi maupun protokol yang digunakan terdeteksi.

12.2.2. Reproducibilitas hasil di berbagai posisi hibridisasi di platform otomatis

Empat ulangan untuk tiga patogen dari panel disiapkan dan ditempatkan di posisi yang berbeda dari dua ruang reaksi pada alat, menggunakan protokol untuk 24 sampel. Hasilnya dianalisis secara otomatis dengan hybriSoft v.2.2.0.R00, menunjukkan tingkat reproduksibilitas yang tinggi untuk semua patogen yang dianalisis dalam posisi yang berbeda.

ORGANISME	No. COPIES/REACTION	POSITIVE/TESTED	DIFFERENCES BETWEEN
Influenza A-H3	100	4/4	No
Adenovirus	100	4/4	No
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	50	4/4	No

Tabel 13. Hasil reproduktifitas diperoleh dengan platform otomatis dan kit Respiratory Flow Chip. Hasilnya dianalisis secara otomatis dengan hybriSoft v.2.2.0.R00, menetapkan nilai cut-off 4.

Validasi ini membuktikan reproduktifitas hasil antara posisi 1 dan 24 dari alat dan reproduktifitas hasil dengan program yang berbeda untuk jumlah sampel yang berbeda.

12.3. Fungsi Analitik pada platform otomatis Hybrispot 12 PCR AUTO

Fungsi dan kekokohan dari Respiratory Flow Chip sudah divalidasi dalam peralatan otomatis HS12a dengan menganalisis batas konsentrasi fragmen sintetik dari semua patogen yang termasuk dalam panel. Validasi ini juga membuktikan kemampuan reproduksi hasil dengan program yang berbeda untuk jumlah sampel yang berbeda.

11.3.1. Reproduksi Hasil dalam Program Untuk Jumlah Sampel yang Berbeda

Replika dari sampel positif yang mengandung sejumlah Salinan batas materi gen dari dua patogen yang termasuk dalam panel, RNA dari Virus Influenza A type H3 and Virus Parainfluenza Type 2, dibuat. Replika ini ditempatkan di berbagai posisi ruang reaksi sistem HS12a dan protokol yang berbeda dapat dievaluasi:

- Protokol untuk 2 sampel (2 replika)
- Protokol untuk 12 sampel (3 replika)

Hasilnya dianalisis secara otomatis dengan hybriSoft dan tidak ada perbedaan antara posisi yang berbeda dari chamber reaksi atau protocol yang digunakan tidak terdeteksi.

11.3.2. Verifikasi batas sensitivitas

Kinerja dan kekokohan Respiratory Flow Chip sudah divalidasi dalam HS12a peralatan otomatis dengan menganalisis konsentrasi pada batas deteksi fragmen sintesis DNA/RNA dan/atau bahan gen dari semua patogen yang termasuk dalam panel.

3 replika dari setiap sampel positif dibuat. Seluruh proses dilakukan secara otomatis menggunakan dua platform HS12a yang berbeda, dan hasilnya dianalisis dengan hybriSoft.

TARGET	No. COPIES / REACTION	POSITIVE/TESTED
Influenza A	100	3/3
Influenza A, subtype H1N1 (pandemic 2009)	10	3/3
Influenza A, subtype H3	100	3/3
Influenza B	500	3/3
Metapneumovirus	500	3/3
Respiratory Syncytial Virus Subtype A	100	3/3
Respiratory Syncytial Virus Subtype B	100	3/3
Rhinovirus	100	3/3
Parainfluenza Type 1	100	3/3
Parainfluenza Type 2	100	3/3
Parainfluenza Type 3	100	3/3
Parainfluenza Type 4	250	3/3
Adenovirus	100	3/3
Bocavirus	100	3/3
Coronavirus 229E	250	3/3
Coronavirus HKU-1	100	3/3
Coronavirus NL63	500	3/3
Coronavirus OC43	100	3/3
<i>Bordetella pertussis</i>	250	3/3
<i>Bordetella parapertussis</i>	50	3/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100	3/3

Table 15: Verifikasi batas sensitifitas Kit Respiratory Flow Chip di HS12a. Positivty dianalisis dengan software hybriSoft dengan menetapkan sebagai nilai cut-off 4. NT: Tidak diuji

12.4. Performa Klinis

Performa klinis dari kit Respiratory Flow Chip divalidasi dari purifikasi materi genetik dengan metode ekstraksi yang disebutkan diatas pada bagian 7 manual ini. Kapasitas diagnostik dari kit *Respiratory Flow Chip* dievaluasi dengan menguji sensitivitas dan spesifisitas diagnostiknya. Dua parameter ini didefinisikan dengan dihitung sebagai berikut:

- **Sensitifitas diagnostik** dinyatakan sebagai persentase (pecahan numerik dikalikan dengan 100), dihitung sebagai $100 \times \frac{\text{jumlah nilai positif sebenarnya (TP)}}{\text{jumlah nilai positif sebenarnya (TP) + jumlah nilai negatif palsu (FN)}}$, atau $100 \times \frac{TP}{TP + FN}$.
- **Spesifisitas diagnostik** dinyatakan sebagai presentase (pecahan numerik dikalikan dengan 100), dihitung sbagai $100 \times \frac{\text{jumlah nilai negatif sebenarnya (TN)}}{\text{jumlah nilai negatif sebenarnya (TN) + jumlah nilai positif palsu (FP)}}$, atau $100 \times \frac{TN}{TN + FP}$.

12.3.1. Spesifisitas dan Sensitifitas Diagnostik

Purifikasi DNA/RNA dari 386 sampel klinis dianalisis secara retrospektif dengan kit Respiratory Flow Chip. Penelitian ini dilakukan secara restrospektif dan parallel dengan metode yang di anggap sebagai GPLD standar :panel patogen Respiratory NxTAG® (Luminex). Analisis hasil sumbang dilakukan dengan kit FTD Respiratory Pathogens 21 (fast-track DIAGNOSTICS) dan gagal ini, PCR simpleks menggunakan primer spesifik dari masing-masing patogen.

ORGANISM	TP	TN	FP	FN	DIAGNOSTIC SENSITIVITY	DIAGNOSTIC SPECIFICITY
Influenza A	86	295	1	4	95.6	99.7
Influenza A, subtype H1N1 (pandemic 2009)	18	366	2	0	100.0	99.5
Influenza A, subtype H3	69	310	2	5	93.2	99.4
Influenza B	5	380	1	0	100.0	99.7
Metapneumovirus	18	361	0	7	72.0	100.0
Respiratory Syncytial Virus Subtype A	17	362	0	7	70.8	100.0
Respiratory Syncytial Virus Subtype B	28	357	1	0	100.0	99.7
Rhinovirus	55	313	5	13	80.9	98.4
Parainfluenza Type 1	0	386	0	0	NT	100.0
Parainfluenza Type 2	0	384	1	1	NT	99.7
Parainfluenza Type 3	15	369	0	2	88.2	100.0
Parainfluenza Type 4	0	385	0	1	NT	100.0
Adenovirus	35	344	3	4	89.7	99.1
Bocavirus	17	367	2	0	100.0	99.5
Coronavirus 229E	13	366	5	2	86.7	98.7
Coronavirus HKU-1	4	382	0	0	100.0	100.0
Coronavirus NL63	20	364	0	2	90.9	100.0
Coronavirus OC43	14	365	3	4	77.8	99.2
<i>Bordetella pertussis</i>	1	383	2	0	NT	99.5
<i>Bordetella parapertussis</i>	1	383	2	0	NT	99.5
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	31	353	1	1	96.9	99.7

Table 14. Sensitifitas dan spesifisitas hasil diagnostic diperoleh dengan kit *Respiratory Flow Chip* dari analisis purifikasi materi genetik. NT: Tidak diuji karena jumlah sampel yang tidak mencukupi.

13. BATASAN

Penggunaan sampel yang tidak cocok : Metode ini telah divalidasi dengan bahan gen murni dari lavage bronchoalveolar, aspirat nasofaring dan eksudat nasofaring. Analisis jenis sampel lain yang tidak ditunjukkan dalam manual ini dapat menyebabkan hasil yang salah atau tidak konklusif karena

penghambatan reaksi RT-PCR dengan menghambat agen kimia.

14. Penyelesaian Masalah

Masalah	Penyebab	Solusi
Tidak ada sinyal yang di amati/ tidak ada sinyal pada kontrol hibridisasi	- Kegagalan pada protokol hibridisasi - PCR reagen dan/atau sudah kadaluwarsa, atau tidak disimpan dengan benar. - Probe oligo pada chip dihancurkan oleh sisa reagen dekontaminan (misalnya pemutih) pada well.	Cek apakah semua reagen telah ditambahkan dengan benar selama proses hibridisasi. Cek fungsi hybriSpot 12/12a/24 yang benar. Ulangi pengujian. Cek tanggal kadaluwarsa dan kondisi penyimpanan reagen dan chip. Ulangi pengujian Bersihkan dengan distilled water yang banyak dan ulangi percobaan.
Tidak ada sinyal pada kontrol amplifikasi endogenus.	- kurangnya jumlah DNA/RNA pada sampel atau kesalahan klinis selama ekstraksi asam nukleat	Ulangi PCR dengan menambah jumlah sampel. Ulangi pengujian.
Sinyal hibridisasi lemah.	- Kegagalan fungsi thermal cycler (eksternal atau HS12a) - Reagen PCR dan/atau kadaluwarsa atau tidak disimpan dengan baik. - Volume sampel digunakan untuk re-suspend produk lyophilized yang salah. - Kesalahan pada protokol hibridisasi. - Kualitas / kuantitas DNA/RNA yang rendah dalam sampel.	Verifikasi fungsi yang benar dari thermal cycler dengan sampel kontrol positif. Jika terjadi kesalahan, hubungi technical support dari supplier Cek tanggal kadaluwarsa dan kondisi penyimpanan reagen, ulangi pengujian Ulangi pengujian dengan menggunakan volume sampel yang benar Cek fungsi hybriSpot HS12/12a/24 yang benar dan protocol hibridisasi. Ulangi pengujian. Ulangi ekstraksi dengan mengeliminasi RNA/DNA dalam volume yang sedikit. Ulangi pengujian

Tabel 15. Kemungkinan insiden, penyebab dan solusi terhadap masalah yang dapat muncul selama analisis.

15. Daftar Pustaka

- A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Sixteen Human Respiratory Virus Types/Subtypes. Jin Li, Shunxiang Qi, Chen Zhang, Xiumei Hu, Hongwei Shen, Mengjie Yang, Ji Wang, Miao Wang, Wenbo Xu, and Xuejun Ma. BioMed Research International Volume 2013, Article ID 327620
- Comparative Evaluation of Six Commercialized Multiplex PCR Kits for the Diagnosis of Respiratory Infections. Sylvie Pillet, Marina Lardeux, Julia Dina, Florence Grattard, Paul Verhoeven, Jerome Le Goff, Astrid Vabret, Bruno Pozzetto. Plos One, vol.8. 2013.
- Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza. World Health Organization 2013.
- Update on Influenza Diagnostics: Lessons from the Novel H1N1 Influenza A Pandemic. Swati Kumar, Kelly J. Henrickson. Clinical Microbiology Reviews p. 344–361. April 2012, Volume 25, Number 2.
- Laboratory Detection of Respiratory Viruses by Automated Techniques. Mercedes Pérez-Ruiz, Irene Pedrosa-Corral, Sara Sanbonmatsu-Gámez and José-María Navarro-Marí. The Open Virology Journal, 2012, 6, (Suppl 1: M7) 151-159
- Design and Performance of the CDC Real-Time Reverse Transcriptase PCR Swine Flu Panel for Detection of 2009 A (H1N1) Pandemic Influenza Virus. Bo Shu, Kai-Hui Wu, Shannon Emery, Julie Villanueva, Roy Johnson, Erica Guthrie, LaShondra Berman, Christine Warnes, Nathelia Barnes, Alexander Klimov, Stephen Lindstrom. Journal of Clinical Microbiology, July 2011, p. 2614–2619.
- Multiplex PCR and Emerging Technologies for the Detection of Respiratory Pathogens. Angela M. Caliendo. Clinical Infectious Diseases, 2011:52.
- Disease Control Priorities in Developing Countries. Chapter 25: Acute Respiratory Infections in Children. Eric A. F. Simoes, Thomas Cherian, Jeffrey Chow, Sonbol A. Shahid-Salles, Ramanan Laxminarayan, and T. Jacob John. Oxford University Press; 2006.

16. Simbol

Penjelasan simbol pada label produk:

	Expiration date		Catalog number
	Temperature limit		Lot code
	Manufacturer		Refer to the instructions of use
	Sufficient content for <n> assays		Medical product for <i>in vitro</i> diagnosis.

17. Keterangan

DNA: Deoxyribonucleic acid.

RNA: Ribonucleic acid

Cod UNG: Cod Uracil-DNA Glycosylase.

DNase: Deoxyribonuclease.

dUTP: Deoxyuridine Triphosphate.

FN: False negative results.

FP: False positive results.

HS12: *HybriSpot 12*.

HS24: *HybriSpot 24*.

HS12a: *HybriSpot 12 PCR AUTO*.

NBT-BCIP: Nitroblue Tetrazolium Chloride- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RNase: Ribonuclease.

TN: True negative results.

TP: True positive results.

