


# Sepsis Flow Chip Kit

**Deteksi Bakteri, Fungi dan Resistensi Antibiotik pada  
Manusia Berbasis Multiplex-PCR dan Reverse Dot Blot  
Hybridization**

**Kompatibel dengan HybriSpot 12 (HS12) & HybriSpot  
24 (HS24)**

|            |                                  |   |                 |
|------------|----------------------------------|---|-----------------|
| <b>REF</b> | <b>Ref. MAD-003936M -HS12-24</b> |  | <b>24 tests</b> |
|            | <b>Ref. MAD-003936M -HS12-48</b> |   | <b>48 tests</b> |
|            | <b>Ref. MAD-003936M -HS24-24</b> |   | <b>24 tests</b> |
|            | <b>Ref. MAD-003936M -HS24-48</b> |   | <b>48 tests</b> |

Untuk penggunaan Diagnostik In Vitro  
Directive 98/79/CE dan ISO 18113-2



## Isi

- 1. Kegunaan Kit**
- 2. Prinsip tes**
- 3. Komponen**
  - 3.1 Reagen untuk PCR multiplex
  - 3.2 Reagen untuk reverse dot-blot hybridization
- 4. Peralatan dan Material yang Dibutuhkan namun Tidak Disediakan dalam Kit**
  - 4.1 Reagen dan Material
  - 4.2 Peralatan
- 5. Penyimpanan dan Stabilitas**
- 6. Perhatian dan Pencegahan**
- 7. Preparasi Sampel**
- 8. Prosedur Kerja**
  - 8.1 Reaksi multiplex PCR
  - 8.2 Preparasi reagen hibridisasi
  - 8.3 Flow-through reverse hybridization
- 9. Prosedur Kontrol Kualitas**
- 10. Interpretasi Hasil**
- 11. Karakteristik Performa**
  - 11.1 Performa analitik
  - 11.2 Performa klinis
- 12. Batasan**
- 13. Penyelesaian Masalah**
- 14. Daftar Pustaka**
- 15. Simbol**
- 16. Keterangan**



## 1. Kegunaan Kit

Sepsis Flow Chip adalah kit diagnostik in vitro untuk infeksi nosokomial manusia berbasis multiplex PCR dan reverse dot blot hybridization untuk deteksi simultan bakteri, fungi dan gen resistensi antibiotik dalam satu kali tes. Tes Sepsis Flow Chip dapat mendeteksi lebih dari 36 spesies bakteri secara simultan (*Coagulase-Negative Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria meningitidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacteriaceae* species dan *Proteus spp.*), spesies fungi (*Candida albicans* dan *Candida spp.*) dan 20 marker resistensi antibiotik. Untuk marker resistensi antibiotik, kit mendeteksi satu gen untuk resistensi methicillin (*mecA*), dua gen untuk resistensi vancomycin (*vanA* dan *vanB*), dua untuk  $\beta$ -lactam (*blaSHV*, *blaCTX-M*) dan lima belas gen untuk resistensi carbapenem (*kpc*, *sme*, *nmc/imi*, *ges*, *vim*, *gim*, *spm*, *ndm*, *sim*, *imp*, *oxa23\_like*, *oxa24\_like*, *oxa48\_like*, *oxa51\_like*, dan *oxa58\_like*). Metode ini berbasis menggandakan target DNA dengan dua multiplex PCR dan kemudian menghibridisasi amplicon biotinylated ke probe DNA spesifik;

| Organism                                 | Target            |
|--|-------------------|
| <i>Staphylococcus Coagulase-Negative</i> | 16S rDNA          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>             | nuc               |
| <i>Streptococcus spp.</i>                | 16S rDNA          |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>          | cpsA              |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>          | 16S rDNA          |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>            | 16S rDNA          |
| <i>Listeria monocytogenes</i>            | 16S rDNA          |
| <i>Enterococcus spp.</i>                 | 16S rDNA          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | ecfX              |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>           | 16S rDNA          |
| <i>Neisseria meningitidis</i>            | 16S rDNA          |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>      | 16S rDNA          |
| <i>Escherichia coli</i>                  | 16S rDNA          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>             | khe               |
| <i>Serratia marcescens</i>               | 16S rDNA          |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                | 16S rDNA          |
| <i>Proteus spp./Morganella</i>           | 16S rDNA          |
| <i>Candida spp.</i>                      | 18S-5.8S ITS rDNA |
| <i>Candida albicans</i>                  | 18S-5.8S ITS rDNA |

Table 1: Target genes used for the amplification in bacteria and fungi.

## 2. Prinsip Tes

Sepsis Flow Chip berbasiskan pada metodologi yang melibatkan amplifikasi simultan dari paling tidak 36 spesies bakteri dan fungi ditambah dengan 20

marker resistensi antibiotik dengan multiplex PCR, diikuti dengan hybridisasi ke probe DNA spesifik yang terimobilisasi pada membran dengan teknologi DNA flow HybriSpot baik manual maupun otomatis. Alat DNA Flow HybriSpot dapat mengikat DNA yang telah diamplifikasi ke probe komplemen dalam lingkungan 3 dimensi berpori, yang memungkinkan pengikatan pasangan antara produk PCR dan probe spesifiknya. Produk PCR biotinylated dihibridisasi dengan probe spesifik dan sinyal hybridisasi muncul karena reaksi kolorimetri immunoenzimatik (Streptavidin-Alkaline Phosphatase dan NBT-BCIP chromogen). Reaksi substrat-kromogen menghasilkan presipitat ungu-gelap pada posisi dimana ampikon PCR berhibridisasi dengan probe spesifik dan sinyal ini secara otomatis ditangkap dan dianalisis oleh software hybriSoft.

### 3. Komponen

Kit ini sudah termasuk seluruh reagen amplifikasi multiplex PCR dan hybridisasi untuk **24 atau 48** sampel klinis (tergantung jumlah sampel pada tiap kit).

#### 3.1 Reagen untuk Multiplex PCR

- 24 Tes (MAD-003936M-P-HS-24)

| Name                         | Format   | Reference         |
|------------------------------|----------|-------------------|
| Mix 1 Multiplex PCR monotest | 24 units | MAD-003936MT-MIX1 |
| Mix 2 Multiplex PCR monotest | 24 units | MAD-003936MT-MIX2 |

Table 2: Reagents provided in kits of 24 tests to perform the multiplex PCR (Manual and Auto).

- 48 Tes (MAD-003936M-P-HS-48)

| Nombr                        | Format   | Reference         |
|------------------------------|----------|-------------------|
| Mix 1 Multiplex PCR monotest | 48 units | MAD-003936MT-MIX1 |
| Mix 2 Multiplex PCR monotest | 48 units | MAD-003936MT-MIX2 |

Table 3: Reagents provided in kits of 48 tests to perform the multiplex PCR (Manual and Auto).

**Mix 1** Multiplex PCR mengandung PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (U/T), Dnase/Rnase-free water dan primer biotinylated. Primer yang terdapat dalam kit adalah spesifik untuk amplifikasi spesies bakteri, fungi dan resistensi antibiotik. Kit ini juga mengandung primer untuk mengamplifikasi DNA genomik manusia sebagai kontrol internal.

**Mix 2** Multiplex PCR mengandung PR buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (U/T), Dnase/Rnase-free water dan primer biotinylated. Primer yang terdapat dalam kit adalah spesifik untuk 15 gen resistensi carbapenem. Selain itu, kit ini juga mengandung primer untuk DNA sintetik exogenus dan primer untuk mengamplifikasi DNA eksogenus ini.

### 3.2 Reagen untuk reverse dot blot hybridization

- 24 tests:

➤ (MAD-003936M-H-HS12-24):

| Name  | Format   | Reference            |
|---|----------|----------------------|
| 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 |
| Reactivo E                                    | 10 ml    | MAD-003930ME-HS12-24 |
| Washing Buffer II (Reagent F)                 | 18 ml    | MAD-003930MF-HS12-24 |
| Sepsis Chip (HS)                              | 24 units | MAD-003936M-CH-HS-24 |

Table 4: Reagents provided in kits of 24 tests to perform the hybridization (compatible with the hybriSpot 12 platform).

➤ (MAD-003936M-H-HS24-24):

| Name  | Format   | Reference            |
|---|----------|----------------------|
| 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 |
| Reactivo E                                    | 10 ml    | MAD-003930ME-HS24    |
| Sepsis Chip (HS)                              | 24 units | MAD-003936M-CH-HS-24 |

Table 5: Reagents provided in kits of 24 tests to perform the hybridization (compatible with the hybriSpot 24 and hybriSpot 12 PCR AUTO platforms).

- 48 tests:

➤ (MAD-003936M-H-HS12-48):

| Name  | Format       | Reference            |
|---|--------------|----------------------|
| Hybridization Solution (Reagent A)            | 80 ml        | MAD-003930MA-HS12-48 |
| Blocking Solution (Reagent B)                 | 18 ml        | MAD-003930MB-HS12-48 |
| Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Reagent C) | 18 ml        | MAD-003930MC-HS12-48 |
| Washing Buffer I (Reagent D)                  | 70 ml        | MAD-003930MD-HS12-48 |
| Reactivo E                                    | 18 ml        | MAD-003930ME-HS12-48 |
| Washing Buffer II (Reagent F)                 | 35 ml        | MAD-003930MF-HS12-48 |
| Sepsis Chip (HS)                              | 2 x 24 units | MAD-003936M-CH-HS-24 |

Table 6: Reagents provided in kits of 48 tests to perform the hybridization (compatible with the hybriSpot 12 platform).

➤ (MAD-003936M-H-HS24-48):

| Name  | Format       | Reference            |
|---|--------------|----------------------|
| Hybridization Solution (Reagent A)            | 115 ml       | MAD-003930MA-HS24-48 |
| Blocking Solution (Reagent B)                 | 18 ml        | MAD-003930MB-HS24-48 |
| Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Reagent C) | 18 ml        | MAD-003930MC-HS24-48 |
| Washing Buffer I (Reagent D)                  | 70 ml        | MAD-003930MD-HS24-48 |
| Reactivo E                                    | 18 ml        | MAD-003930ME-HS24-48 |
| Sepsis Chip (HS)                              | 2 x 24 units | MAD-003936M-CH-HS-24 |

Table 7: Reagents provided in kits of 48 tests to perform the hybridization (compatible with the hybriSpot 24 and hybriSpot 12 PCR AUTO platforms).

## 4. Peralatan dan Material yang Tidak Disediakan Dalam Kit

### 4.1 Reagen dan Material

- Reagen untuk purifikasi DNA bakteri
- Sarung tangan powder free
- Tabung mikro 0.2 / 0.5 ml/ 1.5 ml
- Tips pipet



Vitro S.A.

Calle Luis Fuentes Bejarano nº 60. Ed. Nudo Norte Local 3. 41020 Sevilla (Spain).  
Tel: +34 954 933 200. vitro@vitro.bio; www.vitro.bio



#### 4.2 Peralatan

- Mikrosentrifuse
- Mikropipet: P1000, P200, P20, P2
- Thermocycler
- Thermostatic bath atau heating block
- Plate dingin (4°C)
- Peralatan untuk hibridisasi (hybriSpot12 dan hybriSoft software)

#### 5. Penyimpanan dan Stabilitas

Reagen PCR: Dikirim dalam suhu 2-8°C dan disimpan dalam -20°C setelah penerimaan. Cairkan dalam es sebelum digunakan. Reagen stabil hingga tanggal kadaluarsa. Reagen ini harus disimpan jauh dari sumber DNA kontaminan (produk PCR). Hindari pembekuan lebih dari 5 kali. Untuk menghindari pembekuan berulang, direkomendasikan untuk menambahkan Multiplex PCR Mix 1 & 2, Hotstart DNA Polymerase dan Uracil DNA Glycosylase dan dialikuot dalam campuran (36 ul/alikuot) ke dalam tabung PCR dan simpan dalam -20°C maksimal 3 bulan.

Reagen Hibridisasi: Dikirim dan disimpan dalam suhu 2-8°C. Jangan dibekukan. Reagen dan chip stabil hingga tanggal kadaluarsa. Larutan harus disiapkan sebelum digunakan. Reagen A harus dibawa ke suhu 51°C sebelum digunakan dan reagen hibridisasi lainnya harus digunakan dalam suhu ruang (20-25°C).

#### 6. Peringatan dan Pencegahan

- Baca instruksi sebelum menggunakan produk ini.
- Rekomendasi keamanan:

Instruksi keamanan dan pembuangan ditulis dalam Safety Data Sheet. Produk ini dimaksudkan untuk penggunaan di laboratorium saja. Produk ini tidak dimaksudkan untuk digunakan sebagai obat.

- Pertimbangan umum untuk menghindari kontaminasi produk PCR:

Sumber paling umum untuk kontaminasi adalah produk PCR yang dikerjakan dalam laboratorium. Untuk menghindari ini, sangat penting untuk memisahkan area kerja yang berbeda: pre dan post PCR. Dalam pre-PCR area, sampel klinis dimanipulasi dan ditambahkan setelah penambahan DNA polymerase ke dalam tabung PCR. Produk yang telah diamplifikasi akan dimanipulasi dan dihibridisasi dalam area post-PCR. Dua zona ini harus dipisahkan secara fisik dan sangat penting untuk tidak berbagi menggunakan material apapun pada kedua zona tersebut. Ini sangat penting untuk menghindari kasus positif palsu karena kontaminasi produk PCR. Untuk menghindari kontaminasi dengan produk PCR sebelumnya, kit ini mengandung enzim Uracil-DNA-Glycosylase yang dapat memecahkan produk PCR yang mengandung dUTP.

**Direkomendasikan untuk memasukkan kontrol negatif (mengandung semua komponen PCR kecuali DNA) saat amplifikasi.**

#### 7. Preparasi Sampel Kultur Darah Positif

Kit Sepsis Flow Chip telah didesain untuk digunakan **Direct PCR** dengan sampel **kultur darah**. Untuk botol kultur darah dewasa, kami merekomendasikan menggunakan pengenceran 1:10.

- Kocok botol kultur darah hingga mendapatkan sampel homogen, ambil 500 ul dan pindahkan ke



tabung eppendorf.

- Encerkan botol kultur dalam air steril atau serum fisiologis dengan volume akhir 1 ml: 1:10 (100 ul kultur darah + 900 ul air), kemudian divorteks.
- Gunakan 4 ul sampel terdilusi masing-masing untuk 4 ul Mix1 PCR dan Mix2 PCR.
- Lakukan amplifikasi PCR.

Jika terdapat inhibisi PCR, kami merekomendasikan pengenceran 1:100 dari botol kultur (10 ul kultur darah + 990 ul air, kemudian divorteks). Gunakan 4 ul sampel terdilusi masing-masing untuk 4 ul Mix1 PCR dan Mix2 PCR.

Jika menggunakan botol kultur darah pediatrik, kami merekomendasikan melakukan pengenceran 1:100 secara rutin (10 ul kultur darah + 990 ul air, kemudian divorteks). Gunakan 4 ul sampel terdilusi masing-masing untuk 4 ul Mix1 PCR dan Mix2 PCR.

Jika kultur darah tidak langsung dianalisa, dapat disimpan dalam aliquot dilusi 1:10 pada 4°C maksimal 2 hari atau beku pada -20°C selama 3 bulan maksimal. Setelah dicairkan setelah beku, direkomendasi untuk vorteks untuk menghomogenisasi sampel.

### Swab Rektal

Protokol juga telah divalidasi untuk digunakan secara langsung dengan swab rektal tanpa ekstraksi DNA:

- Tempatkan swab dalam 0.5 ml air steril atau larutan fisiologis.
- Putar swab dalam tabung untuk mendispersi sel dalam cairan.
- Encerkan 1:10 suspensi dengan air steril atau larutan fisiologis : 50 ul sampel + 450 ul air.
- Gunakan 4 ul sampel untuk PCR Mix 1 dan 4 ul untuk PCR Mix 2.
- Amplifikasi dengan PCR.

Jika swab tidak digunakan langsung, dapat disimpan beku dalam -20°C selama 3 bulan. Setelah dibekukan, tambahkan 0.5 ml air steril atau larutan fisiologis dan homogenisasi sampel sebelum diencerkan. Sampel yang terdilusi dapat disimpan dalam 4°C untuk maksimal dua hari atau beku -20°C selama 3 bulan. Jika setelah pengenceran 1:10 masih terdapat inhibitor, direkomendasikan untuk purifikasi DNA dari suspensi awal (0.5 ml).

### Koloni Bakteri

- Ambil koloni dengan ose steril.
- Resuspensi sampel dalam 50 ul air steril atau larutan fisiologis.
- Vorteks sampel hingga mendapatkan suspensi sel homogen.
- Gunakan 4 ul sampel untuk PCR Mix 1 dan 4 ul untuk PCR Mix 2.
- Amplifikasi PCR.

Sistem yang belum divalidasi harus divalidasi terlebih dahulu sebelum digunakan.

Kultur darah dan swab rektal harus ditangani sebagai potensi infeksius. Petunjuk untuk menangani tipe sampel ini dapat ditemukan pada publikasi CDC. Buang semua material yang terkontaminasi secara aman.



## 8. Prosedur Kerja

### 8.1 Reaksi Multiplex PCR

Untuk menghindari pembekuan berulang, direkomendasikan untuk mengalikot Mix multiplex PCR .

- Cairkan Mix 1 & 2 multiplex PCR dalam es.
- Tambahkan untuk tiap mix multiplex PCR, Hot Start DNA Polymerase dan Uracil DNA Glycosylase sesuai volume yang dijabarkan berikut ini:

| Component                | Mix 1 PCR | Mix 2 PCR |
|--------------------------|-----------|-----------|
| Mix 1 Multiplex PCR      | 950 µl    | -----     |
| Mix 2 Multiplex PCR      | -----     | 950 µl    |
| Hot Start DNA Polymerase | 10.8 µl   | 10.8 µl   |
| Uracil-DNA Glycosylase   | 16.2 µl   | 16.2 µl   |

Table 6: Volumes to be added to the PCR Mix.

- Campurkan dengan membolakbalik beberapa kali dan sentrifuse beberapa detik.
- Bagi 36 ul ke tiap tabung PCR dan simpan dalam suhu -20°C (stabil untuk 6 bulan).
- Cairkan 2 tabung, 1 tabung PCR Mix 1 dan 1 Mix 2 per sampel dan tabmahkan 4 ul sampel DNA ke dalam tiap tabung.

Jika PCR Mix disiapkan pada saat akan digunakan, campurkan menurut instruksi berikut ini:

| Component                             | PCR Mix 1<br>Volume per reaction | PCR Mix 2<br>Volume per reaction |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Mix 1 Multiplex PCR                   | 35 µl                            | -----                            |
| Mix 2 Multiplex PCR                   | -----                            | 35 µl                            |
| Hot Start DNA Polymerase              | 0.4 µl                           | 0.4 µl                           |
| Uracil-DNA Glycosylase                | 0.6 µl                           | 0.6 µl                           |
| Diluted Blood culture or purified DNA | 4 µl                             | 4 µl                             |

Table 7: PCR Mix reactions.



Sangat penting untuk melakukan semua proses dalam es untuk mencegah degradasi enzim yang terdapat pada Multiplex PCR Mix

Tempatkan tabung pada thermocycler dan amplifikasi DNA menurut kondisi berikut:

|           |      |        |
|-----------|------|--------|
| 1 cycle   | 25°C | 10 min |
| 1 cycle   | 94°C | 5 min  |
| 40 cycles | 94°C | 30 s   |
|           | 55°C | 45s    |
|           | 72°C | 1 min  |
| 1 cycle   | 72°C | 7 min  |
|           | 8°C  | ∞      |

Table 8: PCR program.

Simpan produk PCR pada 8-10°C setelah reaksi selesai. Sampel dapat dihibridisasi segera atau disimpan pada kulkas post-PCR pada 8-10°C selama 1-2 hari. Untuk penyimpanan yang lebih lama, direkomendasikan untuk menyimpan pada suhu - 20°C.

## 8.2 Preparasi Reagen Hibridisasi

Seluruh reagen hibridisasi disediakan dalam format siap pakai.

Reagen E disuplai sebagai dua reagen (E1 dan E2) yang harus dicampur dengan rasio 1:1 dalam vial "Reagent E" sebelum digunakan dengan volume sesuai dengan jumlah sampel yang akan diproses. **Setelah selesai penggunaan, vial harus dibersihkan dengan air suling untuk mencegah akumulasi presipitat pada penggunaan berulang.**

Membran hanya bisa dipakai satu kali dan harus ditangani dengan sarung tangan.

## 8.3 Flow-through reverse hybridization

Prosedur hibridisasi dilakukan semi-otomatis pada hybriSpot 12 (HS12). Manajemen sampel, pengambilan gambar, analisis, laporan dan koneksi LIS dilakukan oleh software hybriSoft.

Atur instrumen sesuai dengan petunjuk pada instruksi pengguna.

### Sebelum memulai prosedur hibridisasi:

1. Hangatkan **Reagen A (larutan hibridisasi)** pada suhu 51°C.
2. Tempatkan tiap **Sepsis Chip** pada posisi di chamber (alat HS12).
3. Siapkan volume larutan E dengan mencampur reagen E1 dan E2 (1:1) dengan volume yang sesuai. Tabel dibawah menunjukkan volume yang dibutuhkan untuk reagen E1 dan E2 untuk jumlah tes yang berbeda:

|           | vol (µl)/1 test | vol (µl)/4 tests | vol (µl)/8 tests | vol (µl)/12 tests |
|-----------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| <b>E1</b> | 200             | 700              | 1400             | 2200              |
| <b>E2</b> | 200             | 700              | 1400             | 2200              |

Table 9: Volumes of reagents E1 and E2 to be mixed in the vial E according to the number of samples to be processed.

4. Campurkan produk PCR dari Mix 1 dan Mix 2 untuk tiap sampel. Produk PCR didenaturasi dengan memanaskannya pada 95°C selama 10 menit dalam thermocycler dan dinginkan dalam es selama 2 menit.

**Protokol hibridisasi manual:**

- a) Atur suhu chamber pada suhu **51°C**. Tambahkan **300 ul** dari **reagen A** yang telah dihangatkan pada tiap chip, inkubasi pada **51°C** selama setidaknya **2 menit**.
- b) Buang reagen melalui vakum.
- c) Campurkan **230 ul** dari **reagen A** yang telah dihangatkan (**51°C**) dengan **50 ul** dari produk PCR yang didenaturasi (Mix 1 PCR + Mix 2 PCR). Tambahkan ke dalam Sepsis Chip.
- d) Inkubasi pada **51°C selama 8 menit**.
- e) Buang reagen melalui vakum (pastikan pompa menyala setidaknya 30 detik).
- f) Lakukan **3** kali pencucian dengan **300 ul reagen A** yang dipanaskan (**51°C**).
- g) **Atur suhu chamber pada suhu 29°C**.
- h) Tambahkan **300 ul reagen B (larutan blocking)** ke dalam tiap Chip dan inkubasi **5 menit**.
- i) Buang reagen dengan vakum.
- j) Ketika suhu mencapai **29°C**, tambahkan **300 ul reagen C (Streptavidin-Alkaline Phosphatase)** ke dalam tiap Chip.
- k) Inkubasi selama **5 menit pada 29°C**.
- l) Buang reagen dengan vakum.
- m) **Atur suhu chamber pada 36°C**.
- n) Lakukan 4 kali pencucian dengan **300 ul reagen D (Washing buffer I)**.
- o) Ketika chamber mencapai 36°C, tambahkan **300 ul reagen E (developing solution)** ke dalam tiap Chip. Inkubasi pada **36°C selama 8 menit**.
- p) Buang reagen dengan vakum.
- q) Lakukan 2 kali pencucian dengan **300 ul reagen F (Washing buffer II)** ke dalam tiap Chip.
- r) Ambil gambar dan analisis dengan software hybriSoft. Ikuti petunjuk pada instruksi pengguna HS12.

**9. Prosedur Kontrol Kualitas**

Sepsis Flow Chip kit memiliki beberapa kontrol untuk memonitor kualitas hasil.

| Probe | Control                          |
|-------|----------------------------------|
| B     | Hybridization control            |
| CI    | Exogenous amplification control  |
| BG    | Endogenous amplification control |

Table 10: Control probes included in Sepsis Chip.

**Kontrol hibridisasi:** Chip Sepsis memiliki kontrol kualitas yang memastikan hasil yang didapat diinterpretasikan dengan benar. Setelah hibridisasi terjadi, sinyal harus muncul di lima posisi kontrol hibridisasi (B) yang mengindikasikan proses hibridisasi telah berjalan dengan baik. Jika tidak ada sinyal yang muncul, artinya telah terjadi error selama proses hibridisasi atau reagen hibridisasi yang tidak digunakan dengan baik. Sinyal-sinyal ini memungkinkan software membaca panel di posisi yang tepat untuk memastikan analisis yang tepat.

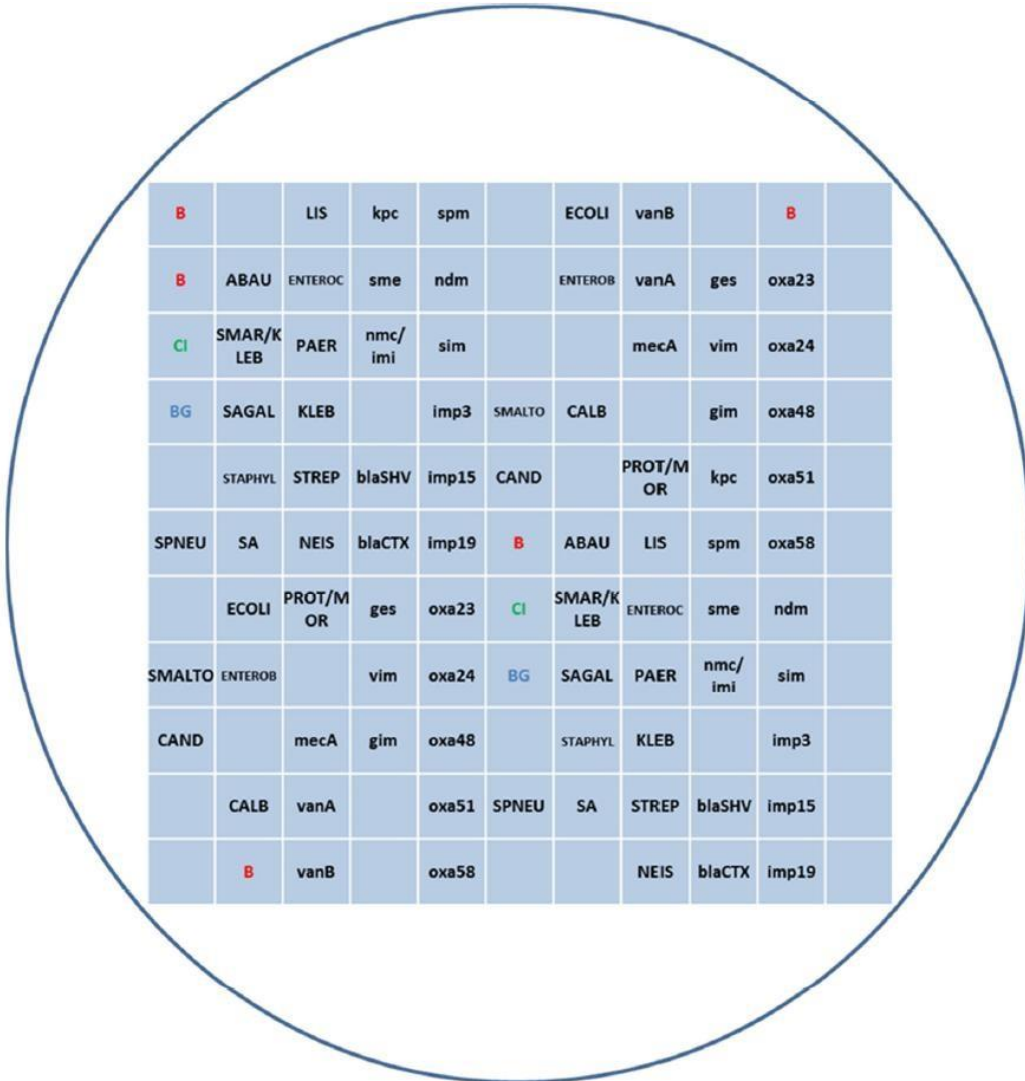
**Kontrol Amplifikasi Exogenus (CI):** probe untuk deteksi DNA sintetik yang terdapat pada reaksi PCR. DNA ini di amplifikasi bersama dengan material genetik dari sampel. Dua sinyal positif pada kontrol amplifikasi exogenous (CI) mengindikasikan PCR telah berjalan dengan baik. Tidak munculnya sinyal pada kontrol ini dapat menandakan adanya inhibitor PCR. Dalam kasus ini, dalam laporan terdapat pesan “presence of PCR inhibitors” dan pengguna harus memverifikasi proses dan kualitas sampel sebelum memvalidasi hasil.

**Kontrol Amplifikasi Endogenus (BG):** Fragmen gen manusia *housekeeping* yang di amplifikasi dalam PCR sebagai kontrol amplifikasi endogenus (gen beta globin). Sinyal positif menandakan amplifikasi bekerja dengan baik dan sampel klinis mengandung DNA manusia. Ketiadaan sinyal ini mengindikasikan kegagalan amplifikasi, kualitas rendah DNA yang digunakan dalam amplifikasi atau ketidakadaan DNA manusia dalam sampel. Ketiadaan DNA manusia pada amplifikasi mungkin terjadi ketika volume darah pada kultur darah terlalu rendah. Dalam kasus ini, sebuah pesan muncul pada laporan (analisis software *hybriSoft*): *absence of human control DNA*”. Hasil negatif dari kontrol ini tidak membatalkan hasil teknik ini jika kontrol exogenous teramplifikasi dengan baik.

Ketika sampel positif untuk bakteri/fungi yang terdapat pada kit, namun tidak ada sinyal untuk kontrol exogenous dan endogenous, sebuah pesan akan muncul pada laporan: *“absence of human control DNA/presence of PCR inhibitors”* dan pengguna harus memverifikasi proses dan kualitas sampel sebelum memvalidasi hasil.

### 10. Interpretasi Hasil

Gambar dibawah menunjukkan persebaran spot dalam Sepsis Chip:



“B” : kontrol hibridisasi

“CI” : kontrol exogenus

“BG” : kontrol endogenus (gen beta globin)

“X” : probe spesifik untuk tiap marker bakteri/fungi/resistensi

Semua probe dicetak secara duplikat untuk memastikan reliabilitas pada analisis otomatis hasil. Kontrol hibridisasi (B) diulang pada 5 posisi untuk memungkinkan software untuk membaca hasil pada posisi yang tepat.

Tabel berikut ini menunjukkan posisi probe dalam Chip dan interpretasi hasil:

|   | 1      | 2         | 3        | 4       | 5     | 6      | 7         | 8        | 9       | 10    |
|---|--------|-----------|----------|---------|-------|--------|-----------|----------|---------|-------|
| A | B      |           | LIS      | kpc     | spm   |        | ECOLI     | vanB     |         | B     |
| B | B      | ABAU      | ENTEROC  | sme     | ndm   |        | ENTEROB   | vanA     | ges     | oxa23 |
| C | CI     | SMAR/KLEB | PAER     | nmc/imi | sim   |        |           | mecA     | vim     | oxa24 |
| D | BG     | SAGAL     | KLEB     |         | imp3  | SMALTO | CALB      |          | gim     | oxa48 |
| E |        | STAPHYL   | STREP    | blaSHV  | imp15 | CAND   |           | PROT/MOR | kpc     | oxa51 |
| F | SPNEU  | SA        | NEIS     | blaCTX  | imp19 | B      | ABAU      | LIS      | spm     | oxa58 |
| G |        | ECOLI     | PROT/MOR | ges     | oxa23 | CI     | SMAR/KLEB | ENTEROC  | sme     | ndm   |
| H | SMALTO | ENTEROB   |          | vim     | oxa24 | BG     | SAGAL     | PAER     | nmc/imi | sim   |
| I | CAND   |           | mecA     | gim     | oxa48 |        | STAPHYL   | KLEB     |         | imp3  |
| J |        | CALB      | vanA     |         | oxa51 | SPNEU  | SA        | STREP    | blaSHV  | imp15 |
| K |        | B         | vanB     |         | oxa58 |        |           | NEIS     | blaCTX  | imp19 |

Table 11a: Position of the probes included in Sepsis Chip

| Expected results (Organism/Resistance)  | Probe       | Probe/positions (column-row) |                 |       |            |
|---|-------------|------------------------------|-----------------|-------|------------|
|   |             | Pathogen probe               | B               | CI    | BG         |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>         | SPNEU       | 1F-6J                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>     | SMALTO      | 1H-6D                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Candida spp.</i>                     | CAND        | 1I-6E                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>          | ABAU        | 2B-7F                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Serratia marcescens</i>              | SMAR/KLEB   | 2C-7G                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>            | SMAR/KLEB   | 2C-7G-3D-8I                  | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>            | KLEB        | 3D-8I                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>         | SAGAL       | 2D-7H                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Coagulase-negative Staphylococci</i> | STAPHYL     | 2E-7I                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Staphylococcus aureus</i>            | SA          | 2F-7J                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>    | ECOLI       | 2G-7A                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Enterobacteria</i>                   | ENTEROB     | 2H-7B                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Candida albicans</i>                 | CALB        | 2J-7D                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Listeria monocytogenes</i>           | LIS         | 3A-8F                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Enterococcus</i>                     | ENTEROC     | 3B-8G                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | PAER        | 3C-8h                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Streptococcus spp.</i>               | STREP       | 3E-8J                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Neisseria meningitidis</i>           | NEIS        | 3F-8K                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Proteus spp.</i>                     | PROT/MOR    | 3G-8E                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| <i>Morganella morganii</i>              | PROT/MOR    | 3G-8E-2H-7B                  | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| METHICILLIN RESISTANT GENE <i>mecA</i>  | <i>mecA</i> | 3I-8C                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| VANCOMYCIN RESISTANCE GENE <i>vanA</i>  | <i>vanA</i> | 3J-8B                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |

| Expected results (Organism/Resistance)          | Probe   | Probe/positions (column-row) |                 |       |            |
|---|---------|------------------------------|-----------------|-------|------------|
|   |         | Pathogen probe               | B               | CI    | BG         |
| VANCOMYCIN RESISTANCE GENE vanB                 | vanB    | 3K-8A                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS A CARBAPENEMASE KPC                       | kpc     | 4A-9E                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS A CARBAPENEMASE SME                       | sme     | 4B-9G                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS A CARBAPENEMASE NMC/IMI                   | nmc/imi | 4C-9H                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| β-LACTAMASE SHV                                 | blaSHV  | 4E-9J                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| BROAD ESPECTRUM β-LACTAMASE CTX-M               | blaCTX  | 4F-9K                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS A CARBAPENEMASE GES                       | ges     | 4G-9B                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE VIM                       | vim     | 4H-9C                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE GIM                       | gim     | 4I-9D                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE SPM                       | spm     | 5A-9F                        | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE NDM                       | ndm     | 5B-10G                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE SIM                       | sim     | 5C-10H                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE IMP3                      | imp3    | 5D-10I                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE IMP15                     | imp15   | 5E-10J                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS B CARBAPENEMASE IMP19                     | imp19   | 5F-10K                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS D CARBAPENEMASE OXA23                     | oxa23   | 5G-10B                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS D CARBAPENEMASE OXA24                     | oxa24   | 5H-10C                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS D CARBAPENEMASE OXA48                     | oxa48   | 5I-10D                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS D CARBAPENEMASE OXA51                     | oxa51   | 5J-10E                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| CLASS D CARBAPENEMASE oxa58                     | oxa58   | 5K-10F                       | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| NEGATIVE RESULTS                                | --      | --                           | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | -- / 1D-6H |
| NOT VALID RESULTS (PCR INHIBITORS)              | --      | --                           | 1A-1B-2K-6F-10A | --    | --         |
| NEGATIVE RESULTS (ABSENCE OF HUMAN CONTROL DNA) | --      | --                           | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-6G | --         |
| HYBRIDIZATION FAILURE                           | --      | --                           | --              | --    | --         |

Table 11b: Position of the probes included in Sepsis Chip and interpretation of results.

Sepsis Flow Chip Kit tidak akan membedakan *Escherichia coli* dari *Shigella* spp. Ketika pasien yang positif *E.coli* dan dicurigai terjangkit *Shigella*, kemungkinan infeksi *Shigella* harus diuji.

Hasil yang mungkin lainnya:

1. Ketika sampel positif untuk *S.pneumoniae*, dua probe yang berbeda dapat menjadi positif dalam Sepsis Chip: SPNEU: spesifik untuk *S.pneumoniae* dan STREP: generik untuk genus

- Streptococcus*. Namun, kami tidak dapat memungkiri kemungkinan ko-infeksi sampel dengan *Streptococcus spp.* yang berbeda dari spesies tersebut.
2. Ketika sampel positif untuk *S.agalactiae* dua probe yang berbeda dapat menjadi positif pada Sepsis Chip, SAGAL: spesifik untuk *S.agalactiae* dan STREP: generik untuk genus *Streptococcus*. Namun, kami tidak dapat memungkiri kemungkinan ko-infeksi sampel dengan *Streptococcus spp.* yang berbeda dari spesies tersebut.
  3. Ketika sampel positif untuk *S.aureus* dua probe yang berbeda dapat dideteksi pada membran, SA: spesifik untuk *S.aureus* dan STAPHYL: generik untuk genus *Staphylococcus*. Namun, kami tidak dapat memungkiri kemungkinan ko-infeksi sampel dengan coagulase-negative staphylococci.
  4. Ketika ada sinyal positif untuk probe STAPHYL saja, mecA saja atau keduanya, interpretasinya adalah coagulase-negative staphylococci.
  5. Gen resistensi Oxa51 telah dideteksi hanya pada: *A.baumannii*, *E.coli*, dan *P.aeruginosa*. *A. Baumannii* mengandung gen resistensi oxa51 pada kromosom, namun pada *E.coli* dan *P.aeruginosa* ada pada DNA plasmid. Ketika sampel positif untuk *A.baumannii*, dua probe yang berbeda harus positif pada Sepsis Chip, ABAU dan oxa51. Namun, beberapa mutasi pada region 16S dari *A.baumannii* dideskripsikan, berkoresponden dengan region dimana probe ABAU berada. Maka, jika hanya sinyal positif untuk oxa51 yang muncul pada Chip, dengan tidak adanya sinyal untuk probe spesifik *A.baumannii*, *E.coli*, atau *P.aeruginosa*; dapat berkoresponden dengan *Acinetobacter baumannii* strain dengan mutasi pada region 16S. Dalam kasus ini, direkomendasi untuk mengidentifikasi patogen dengan metode lain.
  6. Ketika sampel positif untuk *K.pneumoniae*, *E.coli*, *S.marcescens* atau *Morganella morganii* dua probe yang berbeda akan positif pada Sepsis Chip: i) probe spesifik untuk tiap bakteri (KLEB, ECOLI, SMAR/KLEB, PORT/MOR) dan ii) probe generik untuk Enterobacteriaceae (ENTEROB). Karena probe Enterobacteriaceae telah divalidasi untuk mendeteksi Enterobacteria lainnya seperti Citrobacter, Salmonella, K. Oxytoca dan Enterobacter, ada kemungkinan ko-infeksi dari sampel dengan Enterobacteria lainnya, berbeda dari *K.pneumoniae*, *E. coli*, *S.marcescens* atau *Morganella morganii* tidak dapat dikeluarkan.
  7. PROT/MOR probe dapat mendeteksi baik *Proteus mirabilis* dan *Morganella morganii*. Dalam sampel dengan infeksi tunggal dengan salah satu dari dua patogen tersebut, pembedaan dapat dilakukan karena *Morganella morganii* juga dikenali oleh probe ENTEROB namun *Proteus mirabilis* tidak. Namun, itu tidak dapat memisahkan *Morganella morganii* dari sampel yang memiliki ko-infeksi dengan *Proteus* dan Enterobacteria lainnya.
  8. Probe SMAR/KLEB dapat mendeteksi *K.pneumoniae* dan *S.marcescens*. Pada sampel dengan infeksi tunggal dengan salah satu dari dua patogen ini, pemisahan mungkin dilakukan karena *K.pneumoniae* juga memberikan sinyal positif untuk probe spesifik KLEB, sementara *S.marcescens* hanya memberi sinyal untuk probe SMAR/KLEB. Namun, tidak dapat mengenali *K.pneumoniae* dari sampel dengan ko-infeksi *K.pneumoniae* dan *S.marcescens*.
  9. SHV-1 adalah beta-laktamase spektrum rendah yang ditemukan pada frekuensi tinggi (80-90%) pada *Klebsiella pneumoniae*. Untuk alasan ini, ketika sampel positif *K. Pneumoniae*, normalnya gen SHV akan juga dideteksi. Namun adanya gen SHV tidak selalu berarti adanya bukti fenotip produksi ESBL.



10. Karena metode ini memiliki sensitivitas tinggi, sinyal rendah untuk probe *Enterobacterica* dan *P. Aeruginosa* dapat terkadang teramati karena adanya bekas DNA mikrobial ke dalam Taq DNA Polymerase. Sinyal rendah lainnya untuk probe *Staphylococcus spp.* dan *Streptococcus spp.* dapat muncul karena kontaminasi ketika menangani spesimen.

Bakteriamia normalnya disebabkan oleh patogen tunggal. Terkadang, sulit untuk mendeteksi dua atau tiga mikroorganisme pada sampel kultur darah, untuk kasus ini salah satu dapat menjadi agen penyebab infeksi dan yang lainnya dapat muncul dari kontaminasi ketika penanganan sampel darah.

Probe genetik ini telah diuji dengan spesies berikut ini:

1. Probe STAPHYL telah divalidasi untuk deteksi dari:

- *S. epidermidis*
- *S. haemolyticus*
- *S. capitis*
- *S. hominis-hominis*
- *S. intermedius*

2. Probe ENTEROC telah divalidasi untuk deteksi dari

- *E. faecalis*
- *E. faecium*

3. Probe STREP telah divalidasi untuk deteksi dari:

- *S. pasteurianus*
- *S. dysgalactiae*
- *S. gallolyticus*
- *S. macedonicus*
- *S. mitis/oralis*
- *S. salivarius*
- *S. infantarium*
- *S. pyogenes*
- *S. intermedius*

4. Spesies *Streptococcus* lainnya yang telah dites dan tidak dideteksi oleh probe STREP:

- *S. viridans*
- *S. anginosus*



- *S.parasanguinis*

5. Probe ENTEROB telah divalidasi untuk deteksi dari:

- *E.aerogenes*

- *E.cloacae*

- *K. Oxytoca*

- *K.pneumoniae*

- *Morganella morganii*

- *E. coli*

- *S. marcescens*

- *Citrobacter*

- *Salmonella enterica*

6. Probe CAND telah divalidasi untuk deteksi dari:

- *C.tropicalis*

7. Spesies *Candida* lainnya yang telah diuji dan tidak dideteksi dengan probe CAND:

- *C. Parapsilosis*

- *C. Glabrata*

### 11. Keterbatasan









Penggunaan sampel yang kurang cocok: metode ini telah divalidasi dengan kultur darah, materi genetik yang dipurifikasi dari swab rektal dan rektal swab langsung. Analisis menggunakan tipe sampel yang lain dapat mengakibatkan hasil yang kurang baik karena adanya penghambat dari reaksi PCR oleh bahan kimia.

### 12. Penyelesaian Masalah

| Masalah  | Penyebab   | Solusi   |
|--|--|--|
| Tidak ada sinyal/ketiadaan sinyal pada kontrol hibridisasi | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kegagalan pada protokol hibridisasi</li> <li>- Reagen hibridisasi kadaluarsa atau tidak disimpan dengan baik</li> <li>- Probe DNA oligo yang terdapat pada Chip dihancurkan oleh sisa reagen</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verifikasi semua reagen telah ditambahkan dengan baik selama proses hibridisasi. Verifikasi performa alat hybriSpot 12. Ulangi pengujian.</li> <li>- Verifikasi tanggal kadaluarsa dan kondisi</li> </ul> |

|  |  |   |
|--|--|---|
|  | dekontaminan   | penyimpanan reagen dan Chips. Ulangi pengujian.<br>- Jika permukaan telah dibersihkan dengan bleach, DNA dapat dihancurkan. Bersihkan dengan banyak air suling dan ulangi pengujian.  |
| Deteksi patogen/resistensi pada kontrol negatif                                      | Masalah kontaminasi pada area pre-PCR dan post-PCR   | Bersihkan area kerja, ulangi pengujian.   |
| Ketiadaan sinyal pada kontrol amplifikasi Exogenus                                   | - Keberadaan inhibitor PCR pada sampel<br>- Masalah pada amplifikasi PCR   | - Cek program PCR yang benar pada thermocycler. Siapkan reaksi PCR dengan benar. Verifikasi kondisi penyimpanan reagen PCR. Ulangi pengujian.<br>- Jika input sampel sesuai dengan pengenceran 1:10 dari suspensi rektal swab. Murnikan DNA dengan sistem yang sudah divalidasi, ulangi pengujian.            |
| Ketiadaan sinyal pada kontrol amplifikasi Endogenus                                  | - Kurangnya jumlah DNA pada spesimen klinis<br>- Keberadaan inhibitor PCR pada sampel  | - Ulangi PCR dengan menambah sampel atau mengurangi pengenceran awal. Jangan gunakan pengenceran lebih rendah dari 1:10 untuk kultur darah  |
| Keberadaan presipitat kromogen pada Chip setelah menyelesaikan protokol hibridisasi. | - Reagen E (campuran E1 + E2) tidak disiapkan sebelum penggunaan.<br>- Reagen E mengandung residual  | - Siapkan reagen E baru dan ulangi pengujian<br>- Bersihkan vial E setelah setiap penggunaan dengan air suling untuk mencegah akumulasi presipitat setelah setiap pemakaian.  |
| Sinyal hibridisasi lemah   | - PCR dan/atau reagen hibridisasi kadaluarsa atau tidak disimpan dengan baik<br>- Kesalahan pada protokol hibridisasi<br>- Produk PCR tidak didenaturasi dengan benar sebelum hibridisasi<br>- Kualitas/kuantitas rendah dari DNA sampel | - Cek tanggal kadaluarsa dan kondisi penyimpanan reagen, ulangi pengujian.<br>- Verifikasi proses hibridisasi dan performa alat hybriSpot 12. Ulangi pengujian.<br>- Verifikasi apakah langkah denaturasi dikerjakan dengan benar. Ulangi pengujian.<br>- Tambahkan jumlah sampel atau template DNA untuk PCR |

**13. Simbol**

|   |                             |   |                   |
|---|-----------------------------|---|-------------------|
|  | For in vitro diagnostic use |  | Expiration date   |
|  | Catalog number              |  | Temperature range |
|  | Batch code                  |  | Manufacturer      |
|  | Instructions for use        |  | Number of assays  |

**14. Singkatan**

DNA: deoxyribonucleic acid

PCR: polymerase chain reaction

HS12: hybriSpot 12

NBT-BCIP: nitroblue tetrazolium chloride- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

MgCl<sub>2</sub>: magnesium chloride

dNTPs: Deoxynucleotide triphosphates

DNase: deoxyribonuclease

RNase: ribonuclease

dUTP: Deoxyuridine Triphosphate

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

TP: true positives

TN: true negatives

FP: false positives

FN: false negatives

ATCC: American Type Culture Collection