


HPV Direct Flow Chip Kit (HS12)

**Screening dan Genotyping Human
Papillomavirus Berbasis Multiplex-PCR
dan Reverse Dot Blot Hybridization**

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

REF	Ref. MAD-003930MU-HS12-24		24 tests
	Ref. MAD-003930MU-HS12-48		48 tests
	Ref. MAD-003930MU-HS24-24		24 tests
	Ref. MAD-003930MU-HS24-48		48 tests

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

HPV Direct Flow CHIP adalah kit diagnostik untuk deteksi *in vitro* dari human papillomavirus (HPV). Deteksi HPV telah menjadi alat yang sangat penting dalam diagnostik karena infeksi virus ini berkaitan dengan faktor esensial karsinogenesis servikal dan anogenital.

Berdasarkan asosiasinya dengan tingkat lesi yang berbeda, HPV telah diklasifikasi sebagai HPV resiko tinggi atau onkogenik, yang dapat menginduksi karsinogenesis, dan HPV resiko rendah, yang menyebabkan kutil kelamin dan berkolaborasi dengan HPV resiko tinggi.

HPV Direct Flow CHIP dimaksudkan untuk deteksi simultan dan genotyping dari 36 tipe HPV (HPV resiko tinggi 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 dan 82 serta HPV resiko rendah 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84 dan 89) dengan PCR (polymerase chain reaction), diikuti dengan reverse dot blot hybridization, berdasarkan Teknologi DNA-Flow dengan instrumen semi-otomatis hybriSpot12. Pada protokol ini, sampel klinis dapat diamplifikasi secara langsung tanpa ekstraksi DNA.

Status mikrobiologi: produk non steril.

2. Prinsip Tes

Kit ini berbasiskan pada amplifikasi region konsensus L1 HPV dengan PCR dan hibridisasi kepada probe DNA spesifik terimobilisasi pada membran nilon. Alat DNA-Flow berbasis hibridisasi dapat mengikat DNA yang teramplifikasi ke probe komplemen pada lingkungan berpori 3 dimensi, yang dapat menyebabkan proses hibridisasi yang sangat cepat antara produk PCR dan probe spesifiknya. Produk PCR biotinylated dihibridisasi dengan probe spesifik dan sinyal hibridisasi 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. Teknologi ini memiliki sensitivitas sangat tinggi untuk deteksi HPV dan dapat dilakukan dalam waktu yang sangat singkat dibandingkan sistem lain, mengurangi waktu proses dari hitungan jam ke menit.

3. Komponen

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



3.1 Reagen untuk Multiplex PCR

- 24 Tes

MAD-003930MU-P-HS12-24		
HPV PCR mix	3 strips x 8 tubes	MAD-003930MU-MIX

Table 1: PCR reagents provided in the kit MAD-003930MU-HS12-24, compatible with the hybriSpot 12 platform.

MAD-003930MU-P-HS24-24		
HPV PCR mix	3 strips x 8 tubes	MAD-003930MU-MIX

Table 2: PCR reagents provided in the kit MAD-003930MU-HS24-24, compatible with the hybriSpot 24 and hybriSpot 12 PCR AUTO platforms.

- 48 Tes

MAD-003930MU-P-HS12-48		
HPV PCR mix	6 strips x 8 tubes	MAD-003930MU-MIX

Table 3: PCR reagents provided in the kit MAD-003930MU-HS12-48, compatible with the hybriSpot 12 platform.

MAD-003930MU-P-HS24-48		
HPV PCR mix	6 strips x 8 tubes	MAD-003930MU-MIX

Table 4: PCR reagents provided in the kit MAD-003930MU-HS24-48, compatible with the hybriSpot 24 and hybriSpot 12 PCR AUTO platforms.

HPV PCR Mix mengandung PCR buffer, dNTP (U/T), DNase/Rnase-free water, dan primer biotinylated. Primer yang termasuk di kit, spesifik untuk fragmen region L1 HPV yang dapat mendeteksi sekitar 36 genotipe HPV. Kit ini juga mengandung primer untuk mengamplifikasi fragmen DNA genomik manusia (gen beta-globin) sebagai kontrol internal.

3.2 Reagen untuk reverse dot blot hybridization

- 24 tes (MAD-003930M-H-HS12-24) & (MAD-003930M-H-HS24-24)

MAD-003930M-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
Reagent E	10 ml	MAD-003930ME
Washing Buffer II (Reagent F)	18 ml	MAD-003930MF-HS12-24
HPV Chip (HS)	1x 24 units	MAD-003930M-CH-HS-24

Table 5: Hybridization reagents supplied in the kits MAD-003930MU-HS12-24, compatible with the hybriSpot 12 platform.

MAD-003930M-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
Reagent E	10 ml	MAD-003930ME- HS24
HPV Chip (HS)	1x 24 units	MAD-003930M-CH-HS-24

Table 6: Hybridization reagents supplied in the kits MAD-003930MU-HS24-24, compatible with the hybriSpot 24 and hybriSpot 12 PCR AUTO platforms.

- 48 tes (MAD-003930M-H-HS12-48) & (MAD-003930M-H-HS24-48)

MAD-003930M-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
Reagent E	18 ml	MAD-003930ME-HS12-48
Washing Buffer II (Reagent F)	35 ml	MAD-003930MF-HS12-48
HPV Chip (HS)	2x 24 units	MAD-003930M-CH-HS-24

Table 7: Hybridization reagents supplied in the kits MAD-003930MU-HS12-48, compatible with the hybriSpot 12 platform.

MAD-003930M-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
Reagent E	18 ml	MAD-003930ME-HS24-48
HPV Chip (HS)	2x 24 units	MAD-003930M-CH-HS-24

Table 8: Hybridization reagents supplied in the kits MAD-003930MU-HS24-48, compatible with the hybriSpot 24 and hybriSpot 12 PCR AUTO platforms.

Penting: Semua reagen hibridisasi siap pakai kecuali reagen E1 dan E2 yang harus dicampur 1:1 sebelum digunakan, ke dalam vial kosong berlabel "Reagen E"

4. Peralatan dan Material yang Tidak Disediakan Dalam Kit

4.1 Reagen dan Material

- Reagen untuk purifikasi DNA bakteri
- Sarung tangan powder free
- Buffer PBS steril
- Tabung mikro 0.2 / 0.5 / 1.5 ml
- Tips pipet
- Air suling
- Paraffin Tissue Processing Kit, Ref: MAD-003952M (30 test)

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

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 41°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

HPV Direct Flow CHIP kit telah dioptimasi untuk penggunaan langsung dari sampel klinis, tanpa ekstraksi DNA sebelumnya. Walaupun tidak diperlukan, kit dapat digunakan dengan DNA yang telah dipurifikasi.

Sistem yang telah divalidasi dengan DNA yang dipurifikasi dari sampel klinis. Sistem ekstraksi berikut ini telah diuji:

- Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega): untuk purifikasi DNA dari sampel fresh dan terbungkus parafin.
- MagNa Pure (Roche): untuk purifikasi DNA dari sampel segar.

7.1 Cytological swab

- Siapkan satu 1.5-2ml tabung Eppendorf berisi **400 ul** 1X PBS buffer (ulangi untuk tiap sampel). Masukkan ujung swab atau sikat ke dalam larutan 1X PBS dan diremas secara perlahan dengan dinding tabung untuk melepaskan sel.
- Sentrifuse pada **2000 rpm selama 1 menit**. Buang seluruh supernatan.
- Encerkan pelet sel pada **25-50 ul** 1X PBS buffer (sesuai dengan ukuran pellet).
- Gunakan **4 ul** suspensi sel ini sebagai DNA template untuk reaksi PCR. Sisanya dapat disimpan dalam 4°C selama satu minggu atau -20°C selama 2 bulan.

7.2 Sitologi cair

- Biarkan sel diam pada bagian bawah vial. Tempatkan **150-200 ul** suspensi sel pada tabung 1.5-2 ml.
- Sentrifuse pada **2000 rpm selama 1 menit**. Buang supernatan secara hati-hati.
- Cuci pelet sel dengan mensuspensi sel dalam **400 ul** 1X PBS buffer. Sentrifuse pada **2000 rpm untuk 1 menit**. Buang supernatan secara hati-hati.
- Suspensi pelet sel pada **25-50 ul** 1X PBS buffer.
- Gunakan **4 ul** suspensi sel sebagai templat DNA untuk reaksi PCR. Sisanya dapat disimpan dalam 4°C untuk satu minggu atau pada -20°C untuk 2 bulan. Sistem ini telah divalidasi untuk PCR langsung dengan media berikut ini **Thinprep (Hologic), Surepath (Becton Dickinson), Novaprep (Novacyt) dan CellPrep (Biodyne)**

7.3 Digene Spesimen Transport Medium (STM)

- Tempatkan **500-1000 ul** suspensi sel ini pada tabung 1.5-2 ml.
- Sentrifuse pada **2000 rpm** untuk 1 menit. Buang supernatan dengan hati-hati.

- Cuci pelet sel dengan mensuspensi sel dalam **400 ul** 1X PBS buffer. Sentrifuse pada **2000 rpm selama 1 menit**. Buang seluruh supernatan dengan hati-hati.
- Suspensi pelet sel pada **25-50 ul** 1X PBS buffer.
- Gunakan **4 ul** suspensi sel ini sebagai DNA templat untuk reaksi PCR. Siisanya dapat disimpan dalam suhu 4°C selama satu minggu atau pada suhu -20°C selama 2 bulan.

7.4 Jaringan terbungkus paraffin

- Untuk ekstraksi DNA dari bagian terbungkus paraffin: ikuti metode standar. Gunakan **4 ul** dari DNA terpurifikasi sebagai templat PCR.
- Untuk PCR langsung dari sampel paraffin: direkomendasikan untuk menggunakan reagen yang terdapat pada **Paraffin Tissue Processing Kit (MAD- 003952M)** dan ikuti protokol:
- Ambil 1-3 bagian (tergantung dari ukuran jaringan) dengan ketebalan 10 um dan tempatkan pada 0.5 tabung Eppendorf menggunakan jarum atau alat bedah. Catatan: buang sebanyak mungkin paraffin pada bagian jaringan.
- Tambahkan **400 ul** mineral oil.
- Panaskan sampel pada **95°C** untuk **2 menit**.
- Sentrifuse pada **200 rpm selama 1 menit** dan buang sisa mineral oil.
- Tambahkan **60 ul Extraction Buffer** dan **1.5 ul DNA Release** ke dalam tabung.
- Panaskan sampel pada **60°C selama 30 menit** dan **98°C selama 10 menit**.
- Sentrifuse pada **2000 rpm selama 1 menit**.
- Bagian atas cairan akan mengandung sisa paraffin dan mineral oil dari sampel. Debris sel akan menjadi pelet di bagian bawah tabung dan DNA akan berada pada suspensi di bawah lapisan paraffin. Gunakan **4 ul** dari suspensi cair sebagai DNA templat. Sisa sampel dapat disimpan pada 4°C selama satu minggu atau - 20°C selama 2 bulan.

Prosedur Kerja

7.5 Reaksi Multiplex PCR

- Ambil tabung reagen PCR mix lyophilized sesuai jumlah sampel yang akan dianalisis.
- Tambahkan 30 ul sampel langsung ke tiap tabung.
- Jika mengandung **jaringan terbungkus paraffin**, tambahkan **27 ul DNase/RNase-free double distilled water** dan **3 ul** DNA dalam tabung reaksi.
- Homogenisasi mix dengan memipet dan sentrifuse untuk beberapa detik.
- Jika jumlah sampel kurang atau lebih dari 8, tabung dapat dipisahkan dari strip. Sisa tabung dapat disimpan selama maksimum 1 minggu dalam 4°C dalam kemasannya.
- Masukkan tabung ke dalam thermocycler dan set kondisi amplifikasi berikut:

1 cycle	25°C	10 min
1 cycle	94°C	3 min
15 cycles	94°C	30 s
	42°C	30 s
	72°C°	30 s
35 cycles	94°C	30 s
	60°C	30 s
	72°C	30 s
1 cycle	72°C	5 min
	8°C	∞

Table 6: 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.

7.6 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.

7.7 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. Denaturasi produk PCR dengan menghangatkannya pada 95°C untuk 10 menit pada thermocycler dan dinginkan dalam es selama 2 menit.
2. Hangatkan reagen A pada 41°C.
3. Tempatkan tiap HPV Chip pada posisi yang tepat dalam chamber (alat HS12)
4. 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
E1	200	700	1400	2200
E2	200	700	1400	2200

Table 7: Volumes of reagents E1 and E2 to be mixed in the vial E according to the number of samples to be processed.

Protokol hibridisasi manual:

- a) Atur suhu chamber pada suhu **41°C**. Tambahkan **300 ul** dari **reagen A** yang telah dihangatkan pada tiap chip, inkubasi pada **41°C** selama setidaknya **2 menit**.
- b) Buang reagen melalui vakum.
- c) Campurkan **270 ul** dari **reagen A** yang telah dihangatkan (**41°C**) dengan **30 ul** dari produk PCR yang didenaturasi. Tambahkan ke dalam HPV Chip.
- d) Inkubasi pada **41°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 (**41°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.

8. Prosedur Kontrol Kualitas

Probe	Control
B	Hybridization control
C	Endogenous amplification control

Table 7b: Control probes included in the HPV Flow Chip.

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

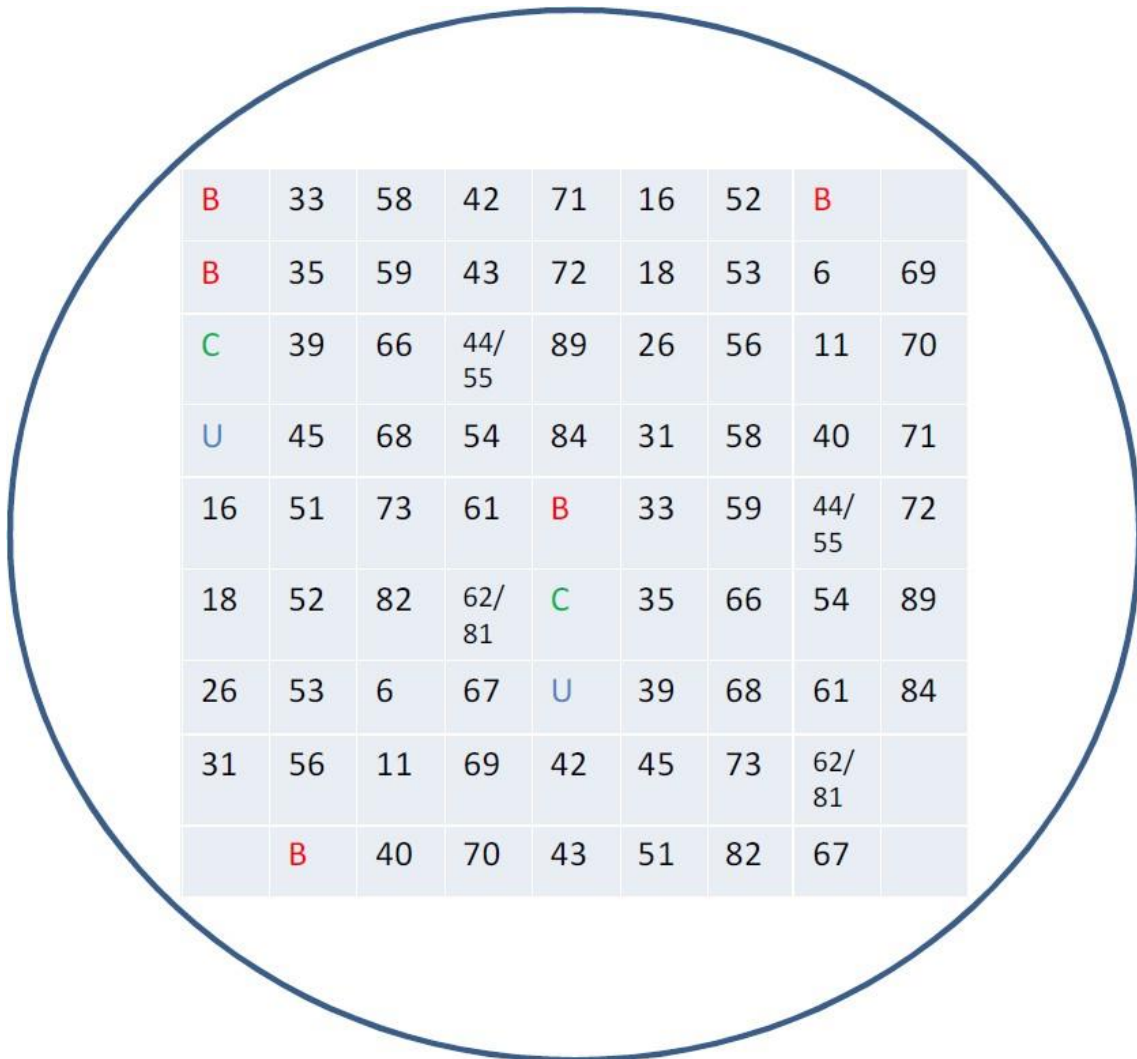
Kontrol hibridisasi: Chip HPV memiliki kontrol kualitas yang memastikan hasil yang didapat diinterpretasikan dengan benar. Setelah hibridisasi terjadi, sinyal harus muncul di lima posisi kontrol hibridisasi (B) yang mengindikasikan proses hibridisasi telah berjalan dengan baik. Jika tidak ada sinyal 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 Endogenus (C): Fragmen gen manusia *housekeeping* yang diamplifikasi 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 endogenus, 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.

9. Interpretasi Hasil

Gambar dibawah menunjukkan persebaran spot dalam HPV Chip:



“B” : kontrol hibridisasi

“C”: kontrol amplifikasi endogenus (gen manusia β -globin)

“U”: probe universal HPV

“X” : probe spesifik untuk tiap genotipe HPV

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
A	B	33	58	42	71	16	52	B	
B	B	35	59	43	72	18	53	6	69
C	C	39	66	44/55	89	26	56	11	70
D	U	45	68	54	84	31	58	40	71
E	16	51	73	61	B	33	59	44/55	72
F	18	52	82	62/81	C	35	66	54	89
G	26	53	6	67	U	39	68	61	84
H	31	56	11	69	42	45	73	62/81	
I		B	40	70	43	51	82	67	

Table 8a: Position of the probes included in HPV Direct Flow Chip

Expected results	Probe/positions (column-row)			
	HPV genotype probe	B	C	U*
HPV 16	1E-6A	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 18	1F-6B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 26	1G-6C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 31	1H-6D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 33	2A-6E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 35	2B-6F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV39	2C-6G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 45	2D-6H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 51	2E-6I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 52	2F-7A	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 53	2G-7B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 56	2H-7C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 58	3A-7D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 59	3B-7E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 66	3C-7F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 68	3D-7G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 73	3E-7H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 82	3F-7I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 6	3G-8B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 11	3H-8C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 40	3I-8D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 42	4A-5H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 43	4B-5I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 44/55	4C-8E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 54	4D-8F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 61	4E-8G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 62/81	4F-8H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 67	4G-8I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 69	4H-9B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 70	4I-9C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 71	5A-9D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 72	5B-9E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 89	5C-9F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 84	5D-9G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV POSITIVE GENOTYPE NOT DETERMINED	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G
NEGATIVE RESULTS	--	1A-1B-2K-6F-10A	1C-5F	--
BLANK/UNSUITABLE MATERIAL/INSUFFICIENT MATERIAL/ PCR INHIBITED	--	1A-1B-2K-6F-10A	--	--
HYBRIDIZATION FAILURE	--	--	--	--

Table 8b: Position of the probes included in HPV Direct Flow Chip and interpretation of results.



1. Keterbatasan









Metode ini telah divalidasi dengan sampel swab sitologi, sitologi cair dan jaringan terbungkus paraffin. Analisis dengan tipe sampel lain dapat menyebabkan hasil yang kurang baik dan harus divalidasi terlebih dahulu.

2. Penyelesaian Masalah

Masalah	Penyebab	Solusi
Tidak ada sinyal/ketiadaan sinyal pada kontrol hibridisasi	<ul style="list-style-type: none"> - Kegagalan pada protokol hibridisasi - Reagen hibridisasi kadaluarsa atau tidak disimpan dengan baik - Probe DNA oligo yang terdapat pada Chip dihancurkan oleh sisa reagen dekontaminan 	<ul style="list-style-type: none"> - Verifikasi semua reagen telah ditambahkan dengan baik selama proses hibridisasi. Verifikasi performa alat hybriSpot 12. Ulangi pengujian. - Verifikasi tanggal kadaluarsa dan kondisi penyimpanan reagen dan Chips. Ulangi pengujian. - 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	<ul style="list-style-type: none"> - Keberadaan inhibitor PCR pada sampel - Masalah pada amplifikasi PCR 	<ul style="list-style-type: none"> - Cek program PCR yang benar pada thermocycler. Siapkan reaksi PCR dengan benar. Verifikasi kondisi penyimpanan reagen PCR. Ulangi pengujian. - 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	<ul style="list-style-type: none"> - Kurangnya jumlah DNA pada spesimen klinis - Keberadaan inhibitor PCR pada sampel 	<ul style="list-style-type: none"> - 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.	<ul style="list-style-type: none"> - Reagen E (campuran E1 + E2) tidak disiapkan sebelum penggunaan. - Reagen E mengandung residual 	<ul style="list-style-type: none"> - Siapkan reagen E baru dan ulangi pengujian - Bersihkan vial E setelah setiap penggunaan dengan air suling untuk mencegah akumulasi presipitat setelah

		setiap pemakaian.
Sinyal hibridisasi lemah	<ul style="list-style-type: none"> - PCR dan/atau reagen hibridisasi kadaluarsa atau tidak disimpan dengan baik - Kesalahan pada protokol hibridisasi - Produk PCR tidak didenaturasi dengan benar sebelum hibridisasi - Kualitas/kuantitas rendah dari DNA sampel 	<ul style="list-style-type: none"> - Cek tanggal kadaluarsa dan kondisi penyimpanan reagen, ulangi pengujian. - Verifikasi proses hibridisasi dan performa alat hybriSpot 12. Ulangi pengujian. - Verifikasi apakah langkah denaturasi dikerjakan dengan benar. Ulangi pengujian. - Tambahkan jumlah sampel atau template DNA untuk PCR

3. Simbol

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