

RNAscopeTM ISH Probe High Risk HPV

REF 200450

Pour usage diagnostic *in vitro*.

Pour exportation vers les États-Unis uniquement

UTILISATION PRÉVUE

La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV s'utilise dans un test d'hybridation *in situ* (HIS) pour la détection qualitative d'ARNm des antigènes E6 et E7 du HPV dans des échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) en recourant à la microscopie optique. Le test détecte les types de HPV à haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82. La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV est destinée à être utilisée dans les laboratoires cliniques avec le système BOND RNAscope Brown Detection sur le colorateur automatisé BOND-III de Leica Biosystems.

La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV est indiquée pour les patients chez lesquels a été diagnostiqué un carcinome épidermoïde oropharyngé (CEO) afin de faciliter l'identification du HPV à haut risque. L'interprétation clinique de tout signal d'hybridation ou de son absence doit être effectuée par un pathologiste qualifié avec des mesures de contrôle adéquates et complétées par un examen histologique et des informations cliniques pertinentes.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV contient des sondes oligonucléotidiques conçues pour s'hybrider avec des séquences d'acide nucléique des antigènes E6 et E7 du HPV dans des coupes de tissus FFPE.¹ La sonde est visualisée en utilisant des réactifs de détection du système BOND RNAscope Brown Detection, ce qui donne un signal chromogène marron qui peut être évalué à l'aide d'un microscope optique.^{2,3} Des sondes de contrôle positif et négatif sont utilisées pour évaluer l'intégrité de l'ARN dans l'échantillon et la coloration de fond et/ou non spécifique, respectivement.

RÉACTIF FOURNI

La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV est fournie sous la forme d'une solution prête à l'emploi de 14 mL de sonde oligonucléotidique dans un tampon d'hybridation contenant du formamide. La quantité fournie est suffisante pour la réalisation de 30 tests. Aucune reconstitution ou dilution, ni aucun mélange ou titrage n'est nécessaire.

CONSERVATION ET STABILITÉ

- Conserver la sonde à une température comprise entre 2 et 8 °C dès réception et immédiatement après utilisation.
- Toute sonde non ouverte est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur le flacon. Ne pas utiliser après la date de péremption.
- La sonde est stable pendant une durée d'au moins 3 semaines après son transfert dans un récipient BOND Open Container lorsqu'elle est conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C après utilisation.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (n° de cat. 200460)
- RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (n° de cat. 200470)
- BOND RNAscope Brown Detection (Leica Biosystems, DS9815)



Fabriqué par
Advanced Cell Diagnostics
7707 Gateway Blvd.,
Newark, CA 94560
États-Unis
+1 510-576-8800
bio-technne.com



IVD



Qarad Suisse SA
Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne
Suisse



QbD RepS BV
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgique

- BOND Open Container 30 mL (Leica Biosystems, OP309700)
- BOND Epitope Retrieval 2 (Leica Biosystems, AR9640)
- BOND Dewax Solution (Leica Biosystems, AR9222)
- 10X BOND Wash (Leica Biosystems, AR9590)
- BOND-III Slide Stainer (Leica Biosystems) utilisant le logiciel BOND v5.1 ou supérieur avec BDD v82 ou supérieur.

La section «Using BOND Reagents» (Utilisation des réactifs BOND) du Manuel d'utilisation BOND identifie le matériel courant nécessaire à la réalisation de la procédure sur l'instrument BOND.

ÉCHANTILLONS DE TEST

Les échantillons doivent être des tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) de carcinome oropharyngé humain. Fixer les tissus dans du formol neutre tamponné à 10% (FNT) et couper des blocs de tissus à une épaisseur de 4 à 5 µm. Colorer les échantillons dans un délai de 3 semaines après le montage des tissus sur des lames lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (20-25 °C).

PROCÉDURE DE COLORATION

La coloration des échantillons doit être effectuée par un personnel de laboratoire formé aux procédures histologiques et à l'utilisation de l'instrument BOND-III.

Tissus de contrôle positif et négatif

Colorer des tissus de contrôle FFPE positif au HPV et négatif au HPV séparés avec la sonde cible RNAscope ISH Probe High Risk HPV pour chaque processus de coloration automatisée d'échantillons de patients. Les tissus de contrôle sont fournis par l'utilisateur sur la base de tests antérieurs avec la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Ces contrôles vérifient que le test produit les résultats positifs et négatifs attendus avec des échantillons connus comme étant positifs au HPV et négatifs au HPV testés avec la sonde cible HPV.

Sondes de contrôle positif et négatif avec chaque échantillon de patient

Tester chaque échantillon de patient avec des sondes de contrôle positif et négatif sur des coupes sériées adjacentes provenant du même bloc de tissu utilisé pour la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Le test nécessite 3 lames pour chaque échantillon de patient : une pour la sonde de contrôle positif, une pour la sonde de contrôle négatif et une pour la sonde cible HPV.

Sonde de contrôle positif

La sonde de contrôle positif évalue l'intégrité de l'ARN dans l'échantillon en mesurant la présence de l'ARN à partir d'un gène domestique commun. La sonde de contrôle positif recommandée est la sonde RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (n° de cat. 200460), qui cible le produit de la transcription d'ARNm du gène de l'ubiquitine C (UBC) humain (342-1503, n° d'ordre NM_021009).

Sonde de contrôle négatif

La sonde de contrôle négatif évalue la spécificité de toute coloration observée avec la sonde HPV à haut risque et elle est utilisée pour évaluer la coloration de fond ou non spécifique dans l'échantillon. La sonde de contrôle négatif recommandée est la sonde RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (n° de cat. 200470), qui cible le produit de la transcription d'ARNm du gène de la dihydrodipicolinate réductase (dapB) (414-862 ; n° d'ordre EF_191515) de *Bacillus subtilis*.



Réalisation de la procédure

1. Transférer la sonde RNAscope ISH dans un nouveau BOND Open Container (30 mL) non utilisé.
2. Suivre les instructions de l'instrument BOND pour enregistrer des réactifs et des sondes, créer des cas et des lames, étiqueter les lames, charger des réactifs, des sondes et des lames et lancer le processus.
3. Utiliser les protocoles suivants pour la coloration des sondes HPV et de contrôle :

Type de protocole	Nom du protocole
Coloration	*RNAscope DAB ISH Protocol B
Préparation	*Bake and Dewax
HIER	*RNAscope Target Retrieval (95)
Enzyme	*RNAscope Enzyme
Dénaturation	---
Hybridation	*RNAscope Hybridization

Remarque : L'astérisque (« * ») figurant dans chaque nom de protocole est inclus dans le logiciel BOND pour indiquer les protocoles fournis par Leica Biosystems.

4. À la fin du processus, décharger les lames du colorateur BOND, les déshydrater dans de l'alcool et du xylène, et appliquer les lamelles couvre-objet conformément au processus de laboratoire établi.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des échantillons doit être effectuée par un anatomopathologiste qualifié.

Contrôles du tissu

La validité du processus est déterminée en utilisant des tissus de contrôle positif HPV et négatif HPV selon l'algorithme de la figure 1.

1. Examiner la lame de tissus de contrôle positif HPV sous un objectif 20X ou 40X. Un résultat acceptable consiste en une coloration non équivoque (gros points marron nucléaires et/ou points marron granulaires nucléaires/cytoplasmiques) dans les cellules tumorales avec une coloration présente de manière diffuse dans la tumeur en contexte de coloration négative adjacente dans l'épithélium pavimenteux non tumoral et dans les cellules stromales non tumorales, les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules endothéliales, tout en écartant les colorations artéfactuelles.
2. Examiner la lame de tissus de contrôle négatif HPV sous un objectif 20X ou 40X. Un résultat acceptable consiste en l'absence de coloration non équivoque dans les cellules tumorales.
3. Le processus est valide si les lames de tissus de contrôle positif HPV et négatif HPV sont toutes deux acceptables.
4. Le processus est invalide si l'une ou l'autre des lames de tissus de contrôle positif HPV ou négatif HPV n'est pas acceptable.

Examen et interprétation de résultats d'échantillons du patient :

Interpréter les résultats selon l'algorithme de notation de la figure 2 pour déterminer si l'échantillon est positif ou négatif au HPV. L'évaluation des résultats de lames de sondes HPV doit être suivie de l'interprétation des sondes de contrôle positif et négatif (sondes UBC et dapB) conformément à ce qui est décrit.



1. En utilisant une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), confirmer que l'échantillon est un carcinome épidermoïde présentant un minimum de 50 cellules tumorales afin de pouvoir être testé avec la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV.
2. Examiner la lame de la sonde cible (sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV) sous un objectif 20X. Si la coloration n'est pas facilement visible sous l'objectif 20X, examiner la lame sous un objectif 40X.

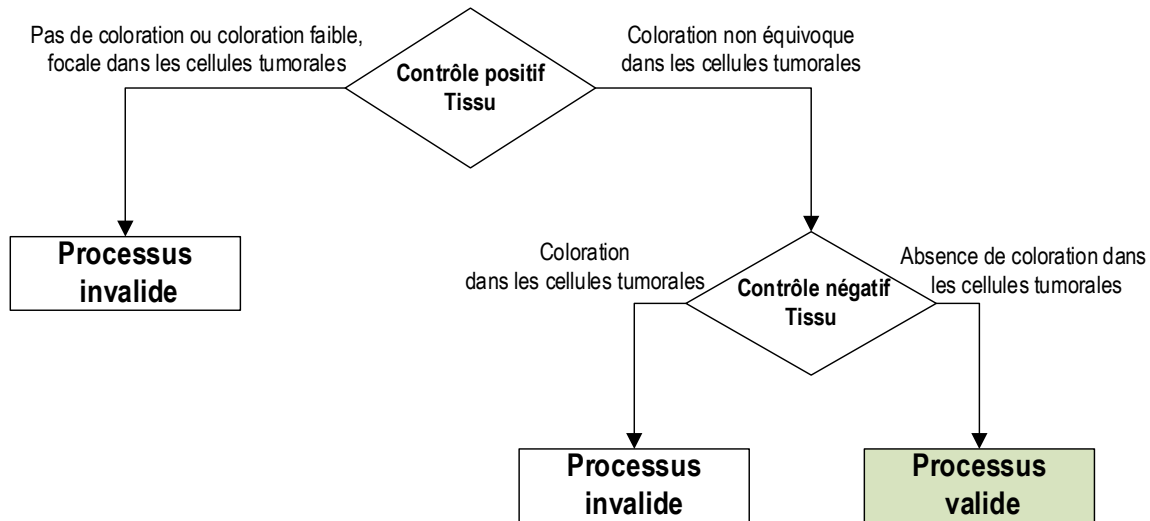


Figure 1 : Interprétation des contrôles de tissus positifs et négatifs colorés avec la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV.

3. Un résultat positif de détection par HIS du HPV à haut risque nécessite l'observation d'une coloration non équivoque (gros points marron nucléaires et/ou points marron granulaires nucléaires/cytoplasmiques) dans les cellules tumorales avec une coloration présente de manière diffuse dans la tumeur en contexte de coloration négative adjacente dans l'épithélium pavimenteux non tumoral et dans les cellules stromales non tumorales, les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules endothéliales, tout en écartant les colorations artéfactuelles. Une coloration artéfactuelle substantielle de cellules tumorales et/ou non tumorales d'origine épithéliale ou non épithéliale peut exclure l'interprétation d'un résultat positif.

Si une coloration non équivoque est présente sur la lame HPV à haut risque, évaluer la lame dapB comme suit :

- i. S'il n'y a pas de coloration ou s'il n'y a qu'une coloration faible et/ou focale dans les cellules tumorales, l'échantillon est déclaré positif au HPV.
 - ii. Si la coloration est présente dans les cellules tumorales et que le signal est présent de manière diffuse dans la tumeur, l'échantillon est déclaré comme étant indéterminé pour ce qui concerne le HPV.
4. Un résultat négatif de détection par HIS du HPV à haut risque consiste en l'absence de coloration non équivoque (ni gros points bruns nucléaires, ni points bruns granulaires nucléaires/cytoplasmiques) dans les cellules tumorales, dans le contexte d'une qualité d'échantillon acceptable telle que déterminée par le contrôle positif UBC.



Si aucune coloration non équivoque n'est présente sur la lame HPV à haut risque, évaluer la lame UBC comme suit :

- Si la coloration est présente dans les cellules tumorales et que le signal est présent de manière diffuse dans la tumeur, l'échantillon est déclaré négatif au HPV.
- S'il n'y a pas de coloration ou s'il y a seulement une faible coloration focale dans les cellules tumorales, l'échantillon est déclaré comme étant indéterminé pour ce qui concerne le HPV.

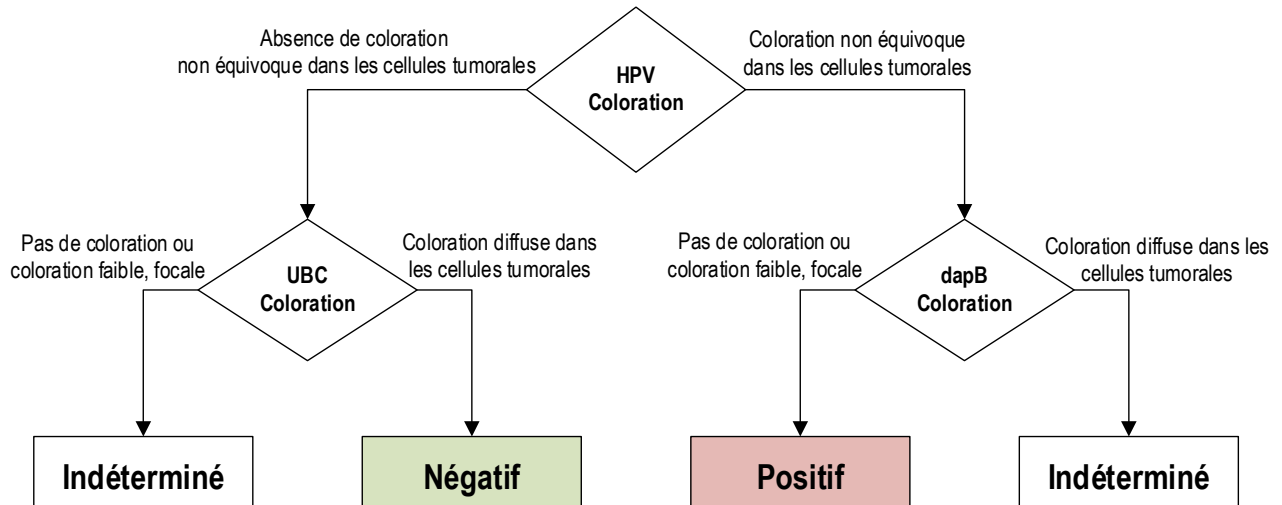


Figure 2 : Interprétation du test RNAscope HPV

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Spécificité analytique

La spécificité analytique a été testée pour mesurer la capacité du test à détecter les sous-types du HPV à haut risque (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82), et ne pas détecter les sous-types du HPV à faible risque (6, 11, 40, 42, 43 et 44). Des plasmides contenant la région E6/E7 du génome du HPV pour chaque sous-type du HPV ont été marqués et réticulés sur des lames de verre. La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV a été testée sur la lame de plasmide. Les 18 sous-types à haut risque ont tous été détectés par la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les sous-types de HPV à faible risque.

Précision analytique

La reproductibilité de la performance de coloration de la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV a été évaluée sur plusieurs jours, sur différents instruments et sur différents lots de sondes.

La précision inter-journalière a été réalisée sur cinq jours, en utilisant un lot de sondes et un instrument BOND-III. Trois coupes de tissu de chacun des cinq cas de carcinome oropharyngé (3 positifs, 2 négatifs) ont été colorées chaque jour. Le pourcentage global de concordance pour le signal HIS entre les jours a été calculé à 100% pour 75 coupes évaluées. La répétabilité intra-journalière a également été évaluée. Le pourcentage global de concordance pour le signal HIS au sein des processus a été calculé à 100% pour 75 coupes évaluées.



La précision inter-instruments a été réalisée en utilisant un lot de sondes et trois instruments BOND-III. Trois coupes de tissu de chacun des cinq cas de carcinome oropharyngé (3 positifs, 2 négatifs) ont été colorées sur chaque instrument. Le pourcentage global de concordance pour le signal HIS entre les instruments a été calculé à 100% pour 45 coupes évaluées.

La précision inter-lot a été réalisée en utilisant trois lots de sondes. Deux coupes de tissu de chacun des cinq cas de carcinome oropharyngé (3 positifs, 2 négatifs) ont été colorées sur chaque instrument. Le pourcentage global de concordance pour le signal HIS entre les lots a été calculé à 100% pour 30 coupes évaluées.

Sensibilité et spécificité du diagnostic

La sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV a été comparée à l'immunohistochimie (IHC) de p16 en utilisant 48 cas de carcinome oropharyngé. Des coupes sériées de cas d'amygdale, d'oropharynx, de palais mou, de l'arrière du pharynx et de la base de la langue ont tout spécifiquement été colorées avec la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV et des sondes de contrôle, ainsi qu'avec l'IHC de p16. Un échantillon a été exclu en raison de l'intégrité inacceptable de l'ARN indiquée par la sonde de contrôle UBC. Les résultats comparatifs du RNAscope et de p16 sont résumés dans le tableau suivant.

		IHC p16	
		Positif	Négatif
Sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV	Positif	24	0
	Négatif	3	20

Le pourcentage de concordance positive était de 89% (24/27).

Le pourcentage de concordance négative était de 100% (20/20).

La concordance observée entre la sonde RNAscope ISH Probe High Risk HPV et l'IHC de p16 correspond aux attentes : certains cas positifs pour p16 sont négatifs par HIS.⁴⁻⁶ Les trois cas contradictoires peuvent être le résultat de l'activation de p16 via un mécanisme non lié au HPV. p16 est un marqueur indirect, de substitution pour le HPV ; d'autres mécanismes peuvent réguler à la hausse l'expression de p16 pour fournir un résultat positif à l'IHC de p16 en l'absence de HPV. En revanche, l'HIS constitue une mesure directe de l'ARNm du HPV, de sorte qu'il n'est pas prévu qu'elle produise des résultats positifs par des voies non liées au HPV.

RESTRICTIONS

1. La méthode a été optimisée pour être utilisée sur le colorateur automatisé BOND-III de Leica Biosystems, en utilisant le système BOND RNAscope Brown Detection et les réactifs auxiliaires BOND. Les utilisateurs doivent être formés à l'utilisation du BOND-III.
2. Aucune modification des procédures n'est recommandée car elles sont susceptibles de produire des résultats inexacts.
3. Le test a été validé avec des échantillons de tissus FFPE de carcinome oropharyngé humain. Aucun autre type d'échantillon n'a été évalué.
4. L'utilisation de sondes de contrôle positif et négatif est nécessaire pour interpréter correctement le test. La sonde de contrôle positif vérifie l'intégrité de l'ARN dans l'échantillon. La sonde de contrôle négatif confirme que l'échantillon est exempt de signal non spécifique ou de substances interférentes susceptibles de perturber l'interprétation.



5. Le test ne géotype pas les sous-types de HPV à haut risque qui sont détectés.
6. La coloration des tissus et des cellules dépend de la manipulation et du traitement de l'échantillon de tissu avant la coloration. Toute action incorrecte de fixation, de congélation, de décongélation, de lavage, de séchage, de chauffage, de coupe ou toute contamination avec d'autres tissus ou fluides risquent de produire des artéfacts, des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. L'incohérence des résultats peut être due à des variations des méthodes de fixation et d'enrobage, ou à des irrégularités inhérentes à l'échantillon de tissu.
7. La dégradation de l'ARNm dans les tissus au fil du temps peut donner lieu à des résultats faussement négatifs. Colorer les échantillons dans un délai de 3 semaines après le montage des tissus sur des lames lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (20-25 °C).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Formamide (≤ 50%).



Mention d'avertissement :
Danger.

Mention(s) de danger

H351 Susceptible de provoquer le cancer.

H360 Risques présumés pour la fertilité ou pour le fœtus.

H373 Risques présumés d'effets graves pour le foie, les reins et le sang.

Conseil(s) de prudence :

P201 Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.

P202 Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.

P281 Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.

P314 Consulter un médecin en cas de malaise.

P405 Garder sous clef.

P501 Éliminer le contenu/récipient conformément aux réglementations locales/régionales/internationales.

1. Éviter tout contact direct avec la sonde. Utiliser un équipement de protection individuelle (EPI) approprié pour éviter toute exposition des yeux, de la peau et des membranes muqueuses. En cas d'exposition, laver abondamment à l'eau.
2. La sonde contient des matières d'origine animale. Considérer toute matière d'origine humaine ou animale comme présentant un risque de transmission d'infections. Prendre des précautions adéquates pour la manipulation et pour garantir une élimination appropriée.
3. La contamination microbienne peut conduire à des résultats inexacts.
4. Pour de plus amples informations ayant trait à la sécurité, se reporter à la fiche de données de sécurité disponible sur www.bio-techne.com.
5. Consulter les autorités et les réglementations locales pertinentes pour une élimination appropriée de la sonde.

DÉPANNAGE

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus avec le tissu de contrôle, répéter le test.

Pour obtenir des informations de dépannage, contacter l'assistance technique à l'adresse suivante : support.acd@bio-techne.com.



DÉFINITIONS DES SYMBOLES

 Numéro de catalogue	 Limite de température	 Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
 Fabricant	 Code du lot	 Conformité européenne
 Date limite d'utilisation	 Consulter le mode d'emploi	 Représentant autorisé au sein de l'Union européenne
 Risque grave pour la santé	 Représentant autorisé en Suisse	

PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

ACD et RNAscope sont des marques commerciales d'Advanced Cell Diagnostics, Inc.

BOND est une marque commerciale de Leica Biosystems.

RÉFÉRENCES

1. Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer*. 2020 Feb;122(3):306-314.
2. Wilkinson DG. The theory and practice of in situ hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ Hybridization. A practical approach*. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18-20.
3. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2012 Jan;14(1):22-9.
4. Craig SG, Anderson LA, Schache AG, Moran M, Graham L, Currie K, Rooney K, Robinson M, Upile NS, Brooker R, Mesri M, Bingham V, McQuaid S, Jones T, McCance DJ, Salto-Tellez M, McDade SS, James JA. Recommendations for determining HPV status in patients with oropharyngeal cancers under TNM8 guidelines: a two-tier approach. *Br J Cancer*. 2019 Apr;120(8):827-833.
5. Bishop JA, Ma XJ, Wang H, Luo Y, Illei PB, Begum S, Taube JM, Koch WM, Westra WH. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *Am J Surg Pathol*. 2012 Dec;36(12):1874-82.
6. Bussu F, Ragin C, Boscolo-Rizzo P, Rizzo D, Gallus R, Delogu G, Morbini P, Tommasino M. HPV as a marker for molecular characterization in head and neck oncology: Looking for a standardization of clinical use and of detection method(s) in clinical practice. *Head Neck*. 2019 Apr;41(4):1104-1111.

DATE DE PUBLICATION

27 février 2026



Fabriqué par
Advanced Cell Diagnostics
7707 Gateway Blvd.,
Newark, CA 94560
États-Unis
+1 510-576-8800
bio-technne.com



Qarad Suisse SA
Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne
Suisse



QbD RepS BV
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgique