

RNAscopeTM ISH Probe High Risk HPV

REF 200450

För användning vid *in vitro*-diagnostik.
Endast för amerikansk export.

AVSEDD ANVÄNDNING

RNAscope ISH Probe High Risk HPV används vid analys av typen *in situ*-hybridisering (ISH) för kvalitativ detektering av HPV E6/E7-mRNA i formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) vävnadsprover med hjälp av ljusmikroskop. Analysen detekterar högrisk-HPV av typerna 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 och 82. RNAscope ISH Probe High Risk HPV är avsedd för användning i kliniska laboratorier med BOND RNAscope brun detektering på den automatiska färgningsmaskinen Leica Biosystems BOND-III.

RNAscope ISH Probe High Risk HPV indikeras för användning på patienter diagnostiserade med skivepitelkarinom i huvud och hals (OPSCC) för att underlätta identifiering av högrisk-HPV. Den kliniska tolkningen av alla hybridiseringssignaler eller frånvaro av dessa ska utföras av en kvalificerad patolog med lämpliga kontroller, och kompletteras med histologisk undersökning och relevant klinisk information.

PROCEDURSPRINCIP

RNAscope ISH Probe High Risk HPV innehåller oligonukleotidsonder utformade för att hybridisera nukleinsyresekvenser med högrisk-HPV E6/E7 i FFPE-vävnadssektioner.¹ Sonden visualiseras med hjälp av detekteringsreagenserna i BOND RNAscope brun detektering, vilket leder till en brun kromogen signal som kan utvärderas med hjälp av ett ljusmikroskop.^{2,3} Positiva och negativa kontrollsonder används för att utvärdera RNA-integritet i provet och för att utvärdera bakgrundsfärgning och/eller icke-specifik färgning.

REAGENS SOM TILLHANDAHÅLLS

RNAscope ISH Probe High Risk HPV tillhandahålls som en färdig lösning på 14 mL med en oligonukleotidsond i hybridiseringsbuffert innehållande formamid. Kvantiteten som tillhandahålls räcker för att utföra 30 tester. Ingen rekonstitution, blandning, spädning eller titrering krävs.

FÖRVARING OCH STABILITET

- Förvara sonden i 2–8 °C vid mottagande och omedelbart efter användning.
- Öppnad sond är stabil till och med utgångsdatumet som står tryckt på flaskan. Får inte användas efter utgångsdatumet.
- Sonden är stabil i minst tre veckor efter överföring till en BOND Open Container när den förvaras i 2–8 °C efter användning.

MATERIAL SOM KRÄVS, MEN SOM INTE TILLHANDAHÅLLS

- RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (katalognummer 200460)
- RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (katalognummer 200470)
- BOND RNAscope Brown Detection (Leica Biosystems, DS9815)
- 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) med BOND-programvara v. 5.1 eller senare och BDD v. 82 eller senare.



Tillverkad av
Advanced Cell Diagnostics
7707 Gateway Blvd.,
Newark, CA 94560
USA
+1 510-576-8800
bio-technique.com



IVD



Qarad Suisse SA
Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne
Schweiz



QbD RepS BV
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgien

Avsnittet "Using BOND Reagents" (Använda BOND-reagenser) i BOND-bruksanvisningen identifierar vanliga material som krävs för att utföra proceduren på BOND-instrumentet.

TESTPROVER

Prover måste vara formalinfixerad, paraffinbäddad (FFPE) human orofarynxkarcinomvävnad. Fixera vävnader i 10% neutralbuffrad formalin (NBF) och sektionsvävnadsblock i 4–5 µm tjocklek. Färga proverna inom tre veckor efter att de monterats på objektglasen när de förvaras i rumstemperatur (20–25 °C).

FÄRGNINGSPROCEDUR

Provfärgning ska utföras av laboratoriepersonal som utbildats i histologiska procedurer och användning av BOND-III-instrumentet.

Positiva och negativa vävnadskontroller

Färga separata HPV-positiva och HPV-negativa FFPE-vävnadskontroller med RNAscope ISH Probe High Risk HPV för varje körning av patientprover i den automatiska färgningsmaskinen. Kontrollvävnader tillhandahålls av användaren baserat på tidigare tester med RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Dessa kontroller verifierar att testet genererar förväntade positiva och negativa resultat med kända HPV-positiva och HPV-negativa prover som testas med HPV-målsonden.

Positiva och negativa kontrollsonder med varje patientprov

Testa varje patientprov med positiva och negativa kontrollsonder på angränsande seriella sektioner från samma vävnadsblock som används för RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Testet kräver tre objektglas för varje patientprov. Ett för den positiva kontrollsonden, ett för den negativa kontrollsonden och ett för HPV-målsonden.

Positiv kontrollsond

Den positiva kontrollsonden utvärderar RNA-integriteten i provet genom att mäta förekomsten av RNA från en vanlig essentiell gen. Den rekommenderade positiva kontrollsonden är RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (katalognummer 200460), som riktar in sig på mRNA-transkriptionen i den humana ubikvitin C-genen (UBC) (342-1503, åtkomstnummer NM_021009).

Negativ kontrollsond

Den negativa kontrollsonden utvärderar specificiteten för all observerad färgning med sonden för högrisk-HPV och används för att utvärdera bakgrunds-färgning och icke-specifik färgning i provet. Den rekommenderade negativa kontrollsonden är RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (katalognummer 200470), som riktar in sig på mRNA-transkriptionen av dihydrodipikolinatreduktasgenen (dapB) (414-862; åtkomstnummer EF_191515) i *Bacillus subtilis*.

Förfarandet

1. Överför RNAscope ISH-sonden till en ny, oanvänd BOND Open Container (30 mL).
2. Följ instruktionerna för BOND-instrumentet för att registrera reagenser och sonder, skapa fall och objektglas, märka objektglas, ladda reagenser, sonder och objektglas och starta körningen.



3. Använd följande protokoll för färgning av HPV- och kontrollsonder:

Protokolltyp	Protokollnamn
Färgning	*RNAscope DAB ISH Protocol B
Förberedelse	*Bake and Dewax
HIER	*RNAscope Target Retrieval (95)
Enzym	*RNAscope Enzyme
Denaturation	---
Hybridisering	*RNAscope Hybridization

Obs! Asterisken "*" i varje protokollnamn inkluderas i BOND-programvaran för att beteckna protokoll som tillhandahålls av Leica Biosystems.

4. Efter slutförd körning ska objektglaset tas ut ur BOND-färgningsmaskinen, läggas att dra i alkohol och xylen och förses med täckglas enligt fastställd laboratorieprocess.

TOLKNING AV RESULTATEN

Tolkning av prover ska utföras av en kvalificerad anatomipatolog.

Vävnadskörningskontroller

Körningsvaliditet fastställs med hjälp av HPV-positiva och HPV-negativa vävnadskontroller enligt algoritmen i figur 1.

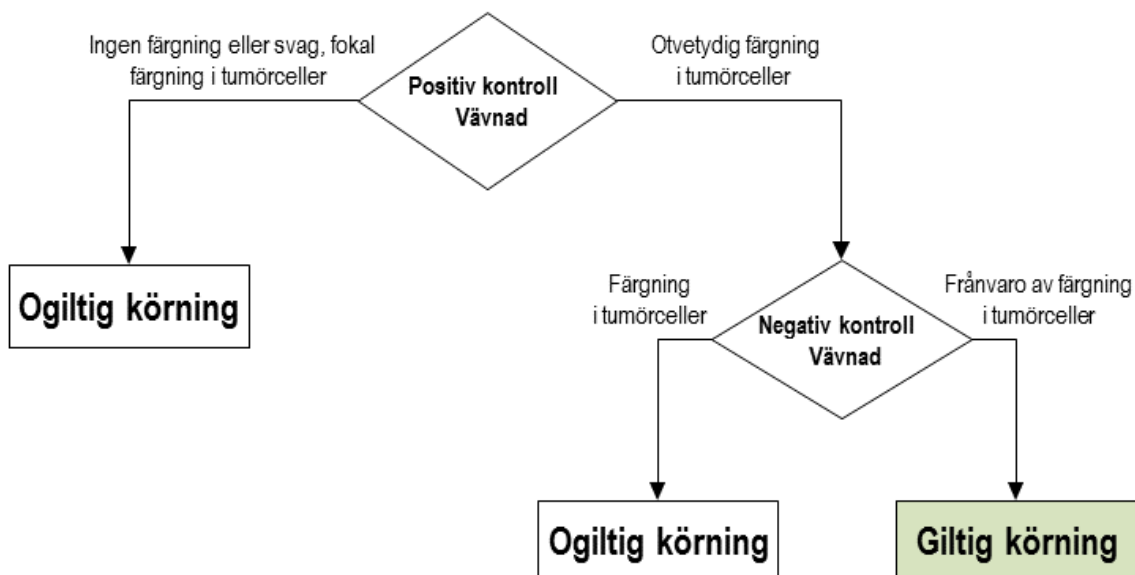
- Undersök det HPV-positiva objektglaset för vävnadskontroll under en objektslins på 20X eller 40X. Ett godkänt resultat är otvetydig färgning (stora nukleära, bruna prickar och/eller granulära, nukleära/cytoplasmatiske bruna prickar) i tumörceller med färgning diffust över tumören inom kontexten för angränsande negativ färgning inom skvamöst epitel som inte är tumör och i stromaceller, fibroblaster, lymfocyter och endotelceller som inte är tumörer, samtidigt som artefaktisk färgning tas med i beräkningen.
- Undersök det HPV-negativa objektglaset för vävnadskontroll under en objektslins på 20X eller 40X. Ett godkänt resultat är frånvaro av otvetydig färgning inuti tumörceller.
- Körningen är giltig om både det HPV-positiva och det HPV-negativa vävnadskontrollobjektglaset är godkänt.
- Körningen är ogiltig om antingen det HPV-positiva eller det HPV-negativa vävnadskontrollobjektglaset inte är godkänt.

Undersökning och tolkning av patientprovresultat:

Tolka resultat enligt poängsättningsalgoritmen i figur 2 för att avgöra om provet är positivt eller negativt för HPV. Bedömning av HPV-sondobjektglasresultat ska följas av tolkning av de positiva och negativa sondkontrollerna (UBC- och dapB-sonder) enligt beskrivningen.

- Genom att använda en så kallad H&E-färg (hematoxylin och eosin), bekräfta att provet är skivepitelkarinom med som minst 50 tumörceller för att vara lämpligt för testning med RNAscope ISH Probe High Risk HPV.
- Undersök objektglaset med målsonden (RNAscope ISH Probe High Risk HPV) under en objektivlins på 20X. Om färgning inte syns tydligt under 20X-objektivet, undersök objektglaset under en objektivlins på 40X.





Figur 1: Tolkning av positiva och negativa vävnadskontroller färgade med RNAscope ISH Probe High Risk HPV.

3. Ett positivt ISH-resultat avseende högrisk-HPV kräver att otvetydig färgning identifieras (stora nukleära, bruna prickar och/eller granulära, nukleära/cytoplasmatiska bruna prickar) i tumörceller med färgning diffust över tumören inom kontexten för angränsande negativ färgning inom skvamöst epitel som inte är tumör och i stromaceller, fibroblaster, lymfocyter och endotelceller som inte är tumörer, samtidigt som artefaktisk färgning tas med i beräkningen. Avsevärd artefaktisk färgning av tumörceller och/eller icke-tumörceller av epiteliskt eller icke-epiteliskt ursprung kan försvåra tolkning ett positivt resultat.

Om otvetydig färgning förekommer på objektglaset för högrisk-HPV ska du utvärdera dapB-objektglaset enligt följande:

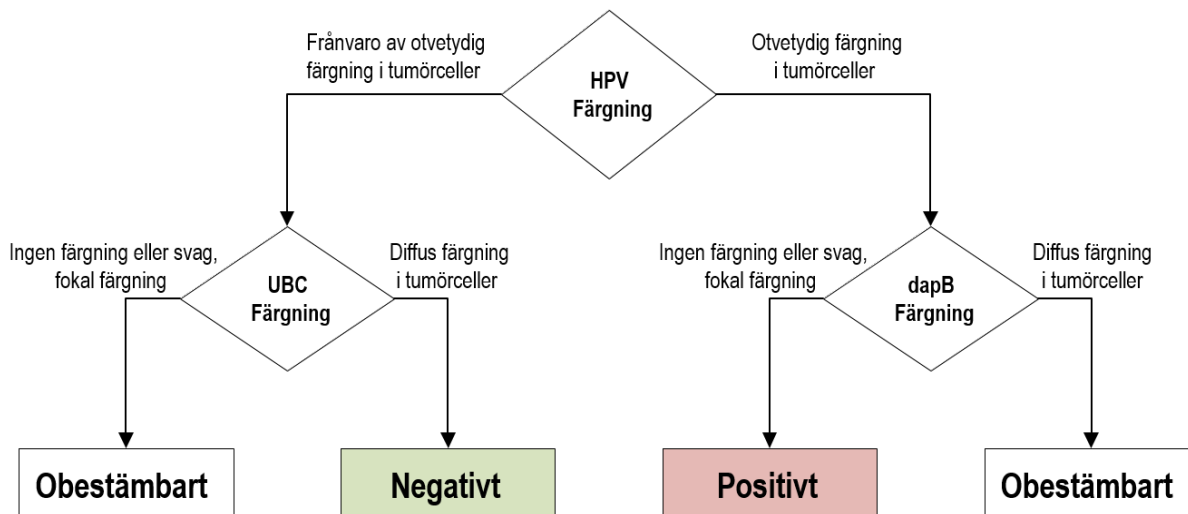
- i. Om ingen färgning förekommer, eller om endast svag och/eller fokal färgning i tumörceller förekommer, rapporteras provet som HPV-positivt.
- ii. Om färgning förekommer i tumörceller där även signal förekommer diffust över tumören rapporteras provet som obestämbart för HPV.

4. Ett negativt ISH-resultat för högrisk-HPV är frånvaro av otvetydig färgning (varken stora nukleära, bruna prickar eller granulära, nukleära/cytoplasmatiska bruna prickar) i tumörceller, inom kontexten för godkänd provkvalitet som fastställts med hjälp av den positiva UBC-kontrollen.

Om otvetydig färgning förekommer på objektglaset för högrisk-HPV ska du utvärdera UBC-objektglaset enligt följande:

- i. Om färgning förekommer i tumörceller där även signal förekommer diffust över tumören rapporteras provet som HPV-negativt.
- ii. Om ingen färgning förekommer, eller om endast svag, fokal färgning i tumörceller förekommer, rapporteras provet som obestämbart för HPV.





Figur 2: Tolkning av RNAscope HPV-testet

PRESTANDAEGENSKAPER

Analytisk specificitet

Analytisk specificitet har testats för att mäta analysens förmåga att detektera undertyper av högrisk-HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 och 82), och inte detektera undertyper av lågrisk-HPV (6, 11, 40, 42, 43 och 44). Plasmider innehållande E6/E7-regionen av HPV-genomet för varje HPV-undertyp identifierades och tvärbands till objektglas. RNAscope ISH Probe High Risk HPV har testats på plasmidobjektglaset. Samtliga 18 högriskundertyper detekterades av RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Ingen korsreaktivitet observerades med undertyper av lågrisk-HPV.

Analytisk precision

Reproducerbarheten för färgningsprestanda för RNAscope ISH Probe High Risk HPV har utvärderats under flera dagar, på olika instrument och med olika sondpartier.

Precisionen mellan dagar bedömdes över fem dagar, med hjälp av ett sondparti och ett BOND-III-instrument. Tre vävnadssektioner av fem fall av karcinom i huvud och hals (3 positiva, 2 negativa) färgades varje dag. Den totala procentuella överensstämmelsen för ISH-signal mellan dagar beräknades som 100% för 75 utvärderade sektioner. Även repeterbarhet mellan dagar undersöktes. Den totala procentuella överensstämmelsen för ISH-signal inom körningar beräknades som 100% för 75 utvärderade sektioner.

Precisionen mellan instrument bedömdes med hjälp av ett sondparti och tre BOND-III-instrument. Tre vävnadssektioner av fem fall av karcinom i huvud och hals (3 positiva, 2 negativa) färgades på varje instrument. Den totala procentuella överensstämmelsen för ISH-signal mellan instrument beräknades som 100% för 45 utvärderade sektioner.

Precisionen mellan partier bedömdes med hjälp av tre sondpartier. Två vävnadssektioner av fem fall av karcinom i huvud och hals (3 positiva, 2 negativa) färgades på varje instrument. Den totala procentuella överensstämmelsen för ISH-signal mellan partier beräknades som 100% för 30 utvärderade sektioner.



Diagnostisk sensitivitet och specificitet

RNAscope ISH Probe High Risk HPV har jämförts med p16-immunhistokemi (IHC) med hjälp av 48 fall av karcinom i huvud och hals. Specifikt färgades seriella sektioner från fall av tonsill, orofarynx, mjukgom, bakre delen av svalget och tungbasen med RNAscope ISH Probe High Risk HPV och kontrollsonder, samt p16-IHC. Ett prov uteslöts på grund av ej godkänd RNA-integritet enligt UBC-kontrollsonden. Jämförande RNAscope och p16-resultat summeras i följande tabell:

		p16-IHC	
		Positivt	Negativt
RNAscope ISH Probe High Risk HPV	Positivt	24	0
	Negativt	3	20

Procentandelen positiv överensstämmelse var 89% (24/27).

Procentandelen negativ överensstämmelse var 100% (20/20).

Den överensstämmelse som observerats mellan RNAscope ISH Probe High Risk HPV och p16-IHC motsvarar förväntningarna på att vissa p16-positiva fall ska vara negativa enligt ISH.⁴⁻⁶ De tre avvikande fallen kan bero på p16-aktivering genom en ej HPV-relaterad mekanism. p16 är en indirekt surrogatmarkör för HPV; andra mekanismer kan reglera upp p16-uttrycket för att ge ett p16-IHC-resultat vid frånvaro av HPV. ISH å andra sidan är ett direkt mått på HPV-mRNA och förväntas därför inte generera positiva resultat via banor som inte är HPV-banor.

BEGRÄNSNINGAR

1. Metoden har optimerats för användning på Leica Biosystems BOND-III automatisk färgningsmaskin med hjälp av BOND RNAscope brun detektering och BOND-hjälpreagenser. Användare måste utbildas i hur BOND-III ska användas.
2. Ändringar av procedurerna rekommenderas inte och kan ge felaktiga resultat.
3. Analysen har validerats med mänskliga FFPE-vävnadsprover från karcinom i huvud och hals. Andra provtyper har inte utvärderats.
4. Användning av positiva och negativa kontrollsonder krävs för korrekt tolkning av analysen. Den positiva kontrollsonden verifierar RNA-integriteten i provet. Den negativa kontrollsonden bekräftar att provet är fritt från icke-specifik signal eller störande substanser som försvårar tolkningen.
5. Analysen utför inte genotypning av undertyperna av högrisk-HPV som detekteras.
6. Vävnads- och cellfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnadsprovet före färgning. Felaktig fixering, frysning, tining, tvättning, torkning, uppvärmning, uppdelning eller kontamination med andra vävnader eller vätskor kan generera artefakter, falska positiva eller falska negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, eller på inneboende oregelbundenheter i vävnadsprovet.
7. Nedbrytning av mRNA i vävnaderna över tid kan orsaka falskt negativa resultat. Färga proverna inom tre veckor efter att vävnaderna monterats på objektglasen när de förvaras i rumstemperatur (20–25 °C).



VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Formamide (≤ 50%).



Signalord: Fara.

Riskdeklaration(er)

H351 Misstänks kunna orsaka cancer.

H360 Kan skada fertiliteten eller det ofödda barnet.

H373 Kan orsaka skador på lever, njure och blod.

Skyddsangivelse(r):

P201 Inhämta särskilda instruktioner före användning.

P202 Använd inte produkten innan du har läst och förstått säkerhetsanvisningarna.

P281 Använd föreskriven personlig skyddsutrustning.

P308+P313 Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta läkare.

P314 Sök läkarhjälp vid obehag.

P405 Förvaras inlåst.

P501 Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning i enlighet med lokala/regionala/nationella/internationella bestämmelser.

1. Undvik direkt kontakt med sonden. Använd lämplig personlig skyddsutrustning för att förhindra exponering för ögon, hud och slemhinnor. Om exponering uppstår ska man skölja med rikligt med vatten.
2. Sonden innehåller material av animaliskt ursprung. Betrakta allt material av humant och animaliskt ursprung som en risk för överföring av smitta. Vidta lämpliga försiktighetsåtgärder för hantering och korrekt kassering.
3. Mikrobiell kontamination kan leda till felaktiga resultat.
4. Se säkerhetsdatabladet för ytterligare säkerhetsinformation på www.bio-techne.com.
5. Rådfråga relevanta myndigheter och läs relevanta förordningar gällande korrekt kassering av sonden.

FELSÖKNING

Om förväntade resultat inte erhålls med kontrollvävnad ska testet upprepas.

För information om felsökning, kontakta teknisk support på support.acd@bio-techne.com.

SYMBOLDEFINITIONER

 Katalognummer	 Temperaturgräns	 Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik
 Tillverkare	 Batchkod	 CE-märkning
 Förbrukningsdatum	 Läs bruksanvisningen	 Auktoriserad representant inom EU
 Allvarlig hälsorisk	 Schweiziskt auktoriserat ombud	

IMMATERIELLA RÄTTIGHETER

ACD och RNAscope är varumärken som tillhör Advanced Cell Diagnostics, Inc.

BOND är ett varumärke som tillhör Leica Biosystems.

REFERENSER

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.

PUBLICERINGSDATUM

27 februari 2026



Tillverkad av
Advanced Cell Diagnostics
7707 Gateway Blvd.,
Newark, CA 94560
USA
+1 510-576-8800
bio-technie.com



Qarad Suisse SA
Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne
Schweiz



QbD RepS BV
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgien