

RNAscope™ ISH Probe High Risk HPV

REF 200450

Per uso diagnostico *in vitro*.
Solo per l'esportazione negli Stati Uniti.

USO PREVISTO

RNAscope ISH Probe High Risk HPV viene utilizzato in un test di ibridazione *in situ* (ISH) per il rilevamento qualitativo dell'mRNA di HPV E6/E7 in campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) mediante microscopia ottica. Il test rileva i tipi di HPV ad alto rischio 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. RNAscope ISH Probe High Risk HPV è destinato all'uso in laboratori clinici con BOND RNAscope Brown Detection sul coloratore automatizzato Leica Biosystems BOND-III.

RNAscope ISH Probe High Risk HPV è indicato per l'uso in pazienti con diagnosi di carcinoma orofaringeo a cellule squamose (OPSCC) per contribuire all'identificazione di HPV ad alto rischio. L'interpretazione clinica di un eventuale segnale di ibridazione o della sua assenza deve essere eseguita da un patologo qualificato con controlli adeguati, integrata da esame istologico e informazioni cliniche pertinenti.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

RNAscope ISH Probe High Risk HPV contiene sonde oligonucleotidiche progettate per ibridarsi con sequenze di acidi nucleici HPV E6/E7 ad alto rischio in sezioni di tessuto FFPE.¹ La sonda viene visualizzata utilizzando i reagenti di rilevamento di BOND RNAscope Brown Detection, generando un segnale cromogeno marrone che può essere valutato mediante un microscopio ottico.^{2,3} Le sonde di controllo positivo e negativo vengono utilizzate per valutare l'integrità dell'RNA nel campione e valutare rispettivamente la colorazione di fondo e/o non specifica.

REAGENTE FORNITO

RNAscope ISH Probe High Risk HPV viene fornito come una soluzione pronta per l'uso da 14 mL di sonda oligonucleotidica in tampone di ibridazione contenente formammide. La quantità fornita è sufficiente per eseguire 30 test. Non sono richieste ricostituzione, miscelazione, diluizione o titolazione.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare la sonda a 2-8 °C al ricevimento e subito dopo l'uso.
- Prima dell'apertura, la sonda è stabile fino alla data di scadenza stampata sul flacone. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
- Una volta trasferita in un BOND Open Container, la sonda è stabile per almeno 3 settimane se conservata a 2-8 °C dopo l'uso.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (N. cat. 200460)
- RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (N. cat. 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) dotato di software BOND v5.1 o successiva con BDD v82 o successiva.



La sezione "Using BOND Reagents" (Uso dei reagenti BOND) nel Manuale d'uso del sistema BOND identifica i materiali comuni necessari per eseguire la procedura sullo strumento BOND.

CAMPIONI PER IL TEST

Utilizzare campioni di tessuto di carcinoma orofaringeo umano fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Fissare i tessuti in formalina tamponata neutra al 10% (NBF) e sezionare blocchi di tessuto con uno spessore di 4-5 µm. Colorare i campioni entro 3 settimane dal montaggio sui vetrini se conservati a temperatura ambiente (20-25 °C).

PROCEDURA DI COLORAZIONE

La colorazione del campione deve essere eseguita da personale di laboratorio con adeguata formazione sulle procedure istologiche e sull'uso dello strumento BOND-III.

Controlli tissutali positivi e negativi

Colorare i controlli tissutali FFPE HPV-positivi e HPV-negativi separati con RNAscope ISH Probe High Risk HPV per ogni ciclo di colorazione automatizzata dei campioni dei pazienti. I tessuti di controllo vengono forniti dall'utente sulla base di test precedenti con RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Questi controlli verificano che il test produca i risultati positivi e negativi previsti con campioni HPV-positivi e HPV-negativi noti analizzati con la sonda target HPV.

Sonde di controllo positivo e negativo con ciascun campione del paziente

Analizzare ogni campione del paziente con sonde di controllo positivo e negativo su sezioni seriali adiacenti dello stesso blocco di tessuto utilizzato per RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Il test richiede 3 vetrini per ogni campione del paziente, uno per la sonda di controllo positivo, uno per la sonda di controllo negativo e uno per la sonda target HPV.

Sonda di controllo positivo

La sonda di controllo positivo valuta l'integrità dell'RNA nel campione misurando la presenza di RNA di un gene costitutivo comune. La sonda di controllo positivo consigliata è RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (N. cat. 200460), che ha come target la trascrizione dell'mRNA del gene dell'ubiquitina C (UBC) umana (342-1503, N. accessione NM_021009).

Sonda di controllo negativo

La sonda di controllo negativo valuta la specificità di qualsiasi colorazione osservata con la sonda HPV ad alto rischio e viene utilizzata per determinare la colorazione di fondo o non specifica nel campione. La sonda di controllo negativo consigliata è RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (N. cat. 200470), che ha come target la trascrizione dell'mRNA del gene della diidrodipicolinato reductasi (dapB) (414-862; N. accessione EF_191515) di *Bacillus subtilis*.

Esecuzione della procedura

1. Trasferire la sonda ISH RNAscope in un BOND Open Container (30 mL) nuovo e mai utilizzato.
2. Seguire le istruzioni dello strumento BOND per registrare reagenti e sonde, creare custodie e vetrini, etichettare i vetrini, caricare reagenti, sonde e vetrini e avviare l'esecuzione.



3. Utilizzare i seguenti protocolli per la colorazione dell'HPV e delle sonde di controllo:

Tipo di protocollo	Nome protocollo
Colorazione	*RNAscope DAB ISH Protocol B
Preparazione	*Bake and Dewax
HIER	*RNAscope Target Retrieval (95)
Enzima	*RNAscope Enzyme
Denaturazione	---
Ibridazione	*RNAscope Hybridization

Nota: l'asterisco "*" accanto a ogni nome di protocollo è utilizzato nel software BOND per indicare i protocolli forniti da Leica Biosystems.

4. Al termine dell'esecuzione, scaricare i vetrini dal coloratore BOND, disidratare in alcol e xilene e coprire con vetrini coprioggetti secondo il processo di laboratorio approvato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'interpretazione dei campioni deve essere eseguita da un patologo anatomico qualificato.

Controlli di esecuzione del tessuto

La validità dell'esecuzione viene determinata utilizzando controlli tissutali HPV-positivi e HPV-negativi in base all'algoritmo della Figura 1.

- Esaminare il vetrino di controllo tissutale HPV-positivo sotto la lente di un obiettivo 20X o 40X. Un risultato accettabile è dato dalla colorazione inequivocabile (grandi punti marroni nucleari e/o punti marroni nucleari/citoplasmatici granulari) nelle cellule tumorali, con colorazione presente diffusamente nell'area tumorale nel contesto della colorazione negativa adiacente all'interno dell'epitelio squamoso non tumorale e in cellule stromali non tumorali, fibroblasti, linfociti e cellule endoteliali, escludendo la colorazione artefatta.
- Esaminare il vetrino di controllo tissutale HPV-negativo sotto la lente di un obiettivo 20X o 40X. Un risultato accettabile è dato dall'assenza di una colorazione inequivocabile all'interno delle cellule tumorali.
- L'esecuzione è valida se i vetrini di controllo tissutale HPV-positivi e HPV-negativi sono accettabili.
- L'esecuzione non è valida se i vetrini di controllo tissutale HPV-positivi o HPV-negativi non sono accettabili.

Esame e interpretazione dei risultati dei campioni dei pazienti

Per determinare se il campione è HPV positivo o negativo, interpretare i risultati secondo l'algoritmo di punteggio della Figura 2. La valutazione dei risultati del vetrino della sonda HPV deve essere seguita dall'interpretazione dei controlli positivo e negativo (sonde UBC e dapB) come descritto.

- Utilizzando una colorazione con ematosilina ed eosina (H&E), verificare che nel campione sia presente un carcinoma a cellule squamose con un minimo di 50 cellule tumorali affinché sia idoneo per il test con RNAscope ISH Probe High Risk HPV.
- Esaminare il vetrino della sonda target (RNAscope ISH Probe High Risk HPV) sotto la lente di un obiettivo 20X. Se la colorazione non è facilmente visibile con l'obiettivo 20X, esaminare il vetrino sotto la lente di un obiettivo 40X.



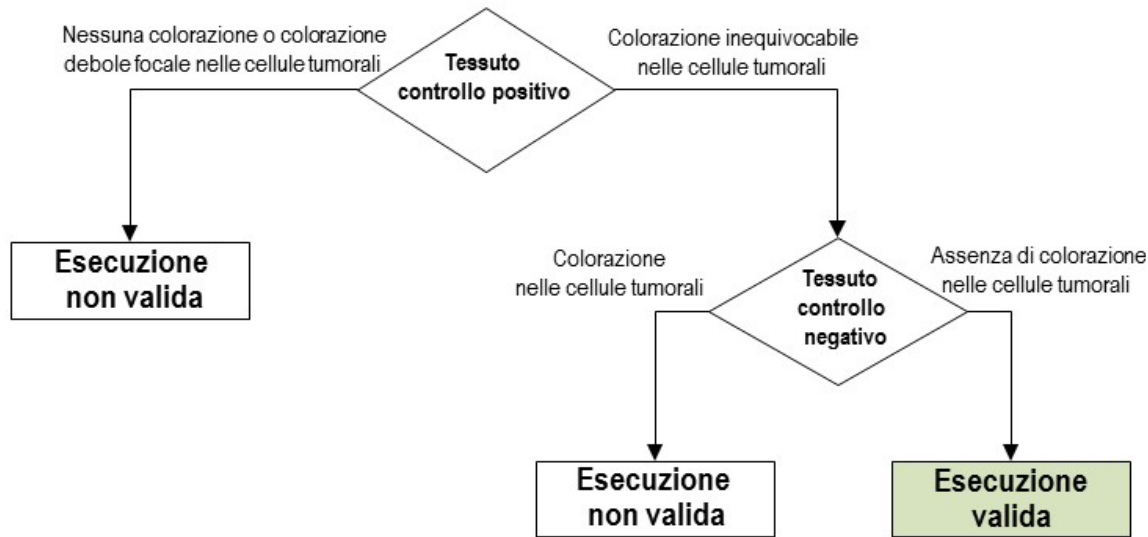


Figura 1: Interpretazione dei controlli tissutali positivi e negativi colorati con RNAscope ISH Probe High Risk HPV.

3. Un risultato ISH positivo per HPV ad alto rischio richiede il riscontro di una colorazione inequivocabile (grandi punti marroni nucleari e/o punti marroni nucleari/citoplasmatici granulari) nelle cellule tumorali con colorazione presente diffusamente nell'area tumorale nel contesto della colorazione negativa adiacente all'interno dell'epitelio squamoso non tumorale e in cellule stromali non tumorali, fibroblasti, linfociti e cellule endoteliali, escludendo la colorazione artefatta. Una colorazione artificiale sostanziale di cellule tumorali e/o non tumorali di origine epiteliale o non epiteliale può precludere l'interpretazione di un risultato positivo.

Se nel vetrino HPV ad alto rischio è presente una colorazione inequivocabile, valutare il vetrino dapB come segue:

- i. Se non è presente alcuna colorazione o se è presente solo una colorazione debole e/o focale nelle cellule tumorali, il campione viene refertato come HPV positivo.
- ii. Se la colorazione è presente nelle cellule tumorali, con segnale presente diffusamente nell'area tumorale, il campione viene refertato come indeterminato per HPV.

4. Un risultato ISH negativo per HPV ad alto rischio è dato dall'assenza di colorazione inequivocabile (né grandi punti marroni nucleari né punti marroni granulari nucleari/citoplasmatici) all'interno delle cellule tumorali, nel contesto di una qualità accettabile del campione determinata dal controllo positivo UBC.

Se non è presente una colorazione inequivocabile nel vetrino HPV ad alto rischio, valutare il vetrino UBC come segue:

- i. Se la colorazione è presente nelle cellule tumorali, con segnale presente diffusamente nell'area tumorale, il campione viene refertato come HPV negativo.
- ii. Se non è presente alcuna colorazione o se è presente solo una colorazione debole e focale nelle cellule tumorali, il campione viene refertato come indeterminato per HPV.



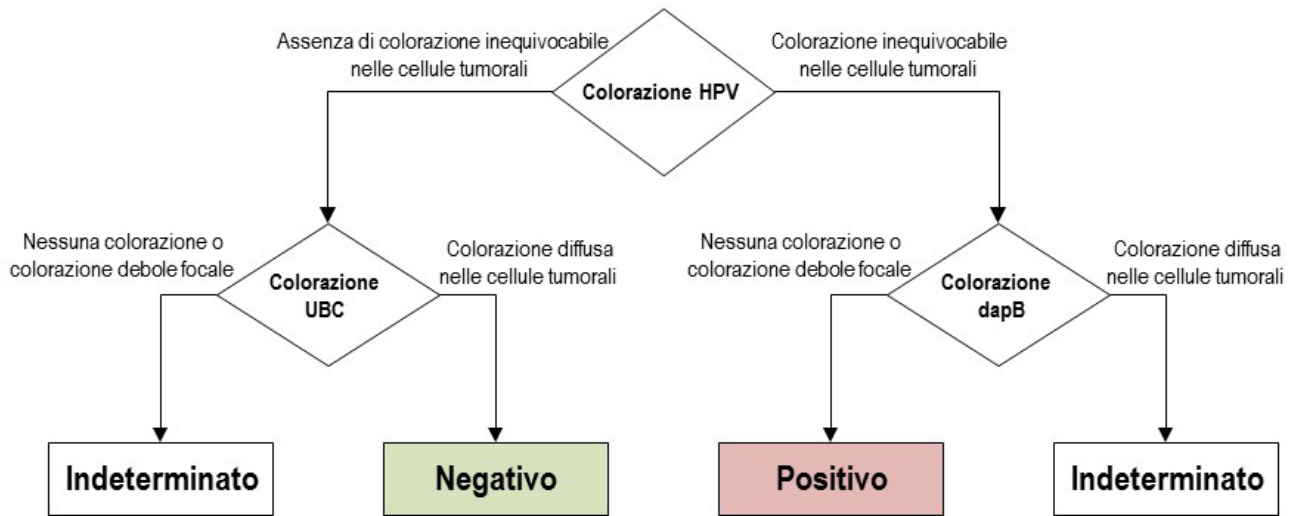


Figura 2: Interpretazione del test RNAscope HPV

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Specificità analitica

La specificità analitica è stata testata misurando la capacità del test di rilevare i sottotipi di HPV ad alto rischio (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82) e di non rilevare i sottotipi di HPV a basso rischio (6, 11, 40, 42, 43 e 44). I plasmidi contenenti la regione E6/E7 del genoma dell'HPV per ciascun sottotipo di HPV sono stati individuati e reticolati sui vetrini. RNAscope ISH Probe High Risk HPV è stato testato sul vetrino plasmidico. Tutti i 18 sottotipi ad alto rischio sono stati rilevati da RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con i sottotipi di HPV a basso rischio.

Precisione analitica

La riproducibilità delle prestazioni di colorazione di RNAscope ISH Probe High Risk HPV è stata valutata in più giorni, su strumenti diversi e con lotti di sonde diversi.

La precisione intergiornaliera è stata condotta nell'arco di cinque giorni, utilizzando un unico lotto di sonde e un unico strumento BOND-III. Ogni giorno sono state colorate tre sezioni di tessuto di ciascuno dei cinque casi di carcinoma orofaringeo (3 positivi, 2 negativi). La concordanza percentuale complessiva per il segnale ISH tra i giorni è stata calcolata nella misura del 100% per 75 sezioni valutate. È stata inoltre valutata la ripetibilità intragiornaliera. La concordanza percentuale complessiva per il segnale ISH all'interno delle esecuzioni è stata calcolata nella misura del 100% per 75 sezioni valutate.

La precisione tra gli strumenti è stata condotta utilizzando un lotto della sonda e tre strumenti BOND-III. Sono state colorate tre sezioni di tessuto di ciascuno dei cinque casi di carcinoma orofaringeo (3 positivi, 2 negativi) su ogni strumento. La concordanza percentuale complessiva per il segnale ISH tra gli strumenti è stata calcolata nella misura del 100% per 45 sezioni valutate.

La precisione tra i lotti è stata condotta utilizzando tre lotti di sonde. Sono state colorate due sezioni di tessuto di ciascuno dei cinque casi di carcinoma orofaringeo (3 positivi, 2 negativi) su ogni strumento. La concordanza percentuale complessiva per il segnale ISH tra i lotti è stata calcolata nella misura del 100% per 30 sezioni valutate.



Sensibilità e specificità diagnostiche

RNAscope ISH Probe High Risk HPV è stato confrontato con l'immunoistochimica (IHC) p16 utilizzando 48 casi di carcinoma orofaringeo. In particolare, sezioni seriali di casi di tonsille, orofaringe, palato molle, parte posteriore della faringe e base della lingua sono state colorate con RNAscope ISH Probe High Risk HPV e sonde di controllo, nonché IHC p16. Un campione è stato escluso a causa dell'integrità dell'RNA inaccettabile, come indicato dalla sonda di controllo UBC. La tabella seguente riassume i risultati comparativi di RNAscope e p16.

		IHC p16	
		Positivo	Negativo
RNAscope ISH Probe High Risk HPV	Positivo	24	0
	Negativo	3	20

La concordanza percentuale positiva è stata del 89% (24/27).

La concordanza percentuale negativa è stata del 100% (20/20).

La concordanza osservata tra RNAscope ISH Probe High Risk HPV e IHC p16 è coerente con il fatto che, secondo le attese, alcuni casi p16-positivi sono risultati negativi per ISH.⁴⁻⁶ I tre casi discrepanti possono essere il risultato dell'attivazione di p16 attraverso un meccanismo non correlato all'HPV. p16 è un marker surrogato indiretto dell'HPV; altri meccanismi possono sovraregolare l'espressione di p16 per fornire un risultato positivo di IHC p16 in assenza di HPV. Per contro, ISH è una misura diretta dell'mRNA di HPV e quindi non dovrebbe produrre risultati positivi attraverso percorsi non HPV.

LIMITAZIONI

1. Il metodo è stato ottimizzato per l'uso sul coloratore automatizzato BOND-III Leica Biosystems utilizzando BOND RNAscope Brown Detection e reagenti BOND ausiliari. Gli utenti devono aver ricevuto adeguata formazione sull'uso del sistema BOND-III.
2. Si raccomanda di non apportare modifiche alle procedure in quanto possono produrre risultati imprecisi.
3. Il test è stato convalidato con campioni di tessuto FFPE umano di carcinoma orofaringeo. Non sono stati valutati altri tipi di campioni.
4. L'uso di sonde di controllo positive e negative è necessario per la corretta interpretazione del test. La sonda di controllo positivo verifica l'integrità dell'RNA nel campione. La sonda di controllo negativo verifica che il campione sia privo di segnali non specifici o sostanze interferenti che complicherebbero l'interpretazione.
5. Il test non genotipizza i sottotipi di HPV ad alto rischio rilevati.
6. La colorazione dei tessuti e delle cellule dipende dalla manipolazione e dall'elaborazione del campione di tessuto prima della colorazione. Procedure di fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, sezionamento o contaminazione eseguite in modo improprio con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, risultati falsi positivi o falsi negativi. Risultati incoerenti possono essere dovuti a variazioni nei metodi di fissazione e inclusione o a irregolarità intrinseche all'interno del campione di tessuto.
7. La degradazione, nel tempo, dell'mRNA nei tessuti, può causare risultati falsi negativi. Colorare i campioni entro 3 settimane dal montaggio dei tessuti sui vetrini se conservati a temperatura ambiente (20-25 °C).



AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Formamide (≤ 50%).



Parola di segnalazione:
Pericolo.

Indicazioni di pericolo

H351 Sospettato di provocare il cancro.

H360 Può nuocere alla fertilità o al feto.

H373 Può causare danni al fegato, ai reni e al sangue.

Consigli di prudenza

P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P202 Non maneggiare prima di aver letto e compreso tutte le precauzioni di sicurezza.

P281 Utilizzare i dispositivi di protezione individuale richiesti.

P308+P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico.

P314 In caso di malessere, consultare un medico.

P405 Conservare sotto chiave.

P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.











1. Evitare il contatto diretto con la sonda. Utilizzare dispositivi di protezione individuale (DPI) adeguati per prevenire l'esposizione degli occhi, della pelle e delle mucose. In caso di esposizione, lavare abbondantemente con acqua.
2. La sonda contiene materiale di origine animale. Considerare tutti i materiali di origine umana o animale come a rischio di trasmissione dell'infezione. Adottare precauzioni adeguate per la manipolazione e garantire il corretto smaltimento.
3. La contaminazione microbica può portare a risultati imprecisi.
4. Per ulteriori informazioni sulla sicurezza, fare riferimento alla scheda di dati di sicurezza disponibile all'indirizzo www.bio-techne.com.
5. Per il corretto smaltimento della sonda, consultare le autorità e le normative locali pertinenti.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Se non si ottengono i risultati attesi con il tessuto di controllo, ripetere il test.

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi, contattare il supporto tecnico all'indirizzo support.acd@bio-techne.com.

DEFINIZIONI DEI SIMBOLI

 Numero di catalogo	 Limite di temperatura	 Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
 Produttore	 Codice lotto	 Conformità europea
 Usare entro la data	 Consultare le istruzioni per l'uso	 Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
 Pericoloso per la salute		

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

ACD e RNAscope sono marchi di Advanced Cell Diagnostics, Inc.
BOND è un marchio di Leica Biosystems.

RIFERIMENTI

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.

DATA DI RILASCIO

20 Maggio 2022

