

RNAscope™ ISH Probe High Risk HPV

REF 200450

Para diagnóstico *in vitro*.
Solo para exportación en Estados Unidos.

USO PREVISTO

La sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV se utiliza en un ensayo de hibridación *in situ* (ISH) para la detección cualitativa del ARNm de E6/E7 del HPV en muestras de tejido fijado con formol e incluido en parafina (FFPE) mediante microscopía óptica. El ensayo detecta los tipos de HPV de alto riesgo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. La sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV está pensada para usarse en laboratorios clínicos con el sistema de detección RNAscope marrón BOND en el sistema de tinción automatizado BOND-III de Leica Biosystems.

La sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV se emplea para ayudar a identificar el HPV de alto riesgo en pacientes con un diagnóstico de carcinoma orofaríngeo de células escamosas (OPSCC). La interpretación clínica de la presencia o ausencia de cualquier señal de hibridación debe hacerla un anatomopatólogo cualificado con controles adecuados, y complementarse con el examen histológico y la información clínica pertinente.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV contiene sondas de oligonucleótidos diseñadas para hibridar con secuencias de ácido nucleico de E6/E7 del HPV de alto riesgo en cortes de tejido FFPE¹. La sonda se visualiza utilizando los reactivos del sistema de detección RNAscope marrón BOND, con los que se obtiene una señal cromogénica marrón que se puede observar al microscopio óptico^{2,3}. Las sondas de control positivo y negativo se utilizan para determinar la integridad del ARN de la muestra y para evaluar la tinción de fondo y/o inespecífica, respectivamente.

REACTIVO SUMINISTRADO

La sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV se suministra en forma de una solución de sonda de oligonucleótidos de 14 mL lista para usar en un tampón de hibridación que contiene formamida. La cantidad suministrada es suficiente para 30 ensayos. No se requiere ningún tipo de reconstitución, mezcla, dilución ni valoración.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- La sonda debe almacenarse a 2-8 °C en el momento de recibirla e inmediatamente después de usarla.
- La sonda sin abrir es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el frasco. No use el producto pasada la fecha de caducidad.
- Después de usarse y transferirse a un BOND Open Container, la sonda es estable durante al menos 3 semanas a 2-8 °C.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (n.º ref. 200460)
- RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (n.º ref. 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) con el software BOND v5.1 o superior con BDD v82 o superior.

En el apartado «Using BOND Reagents» (Uso de reactivos BOND) del manual de usuario de BOND se indican qué materiales corrientes hacen falta para llevar a cabo el procedimiento en el sistema BOND.

MUESTRAS DE ANÁLISIS

Las muestras deben ser tejido de carcinoma orofaríngeo humano fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE). Fijar los tejidos con formol amortiguado neutro (FAN) al 10% y cortar los bloques de tejido en secciones de 4-5 µm de grosor. Una vez montadas en portaobjetos y conservadas a temperatura ambiente (20-25 °C), teñir las muestras de tejido antes de 3 semanas.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

La tinción de las muestras debe hacerla personal de laboratorio con formación en procedimientos histológicos y usando el sistema BOND-III.

Tejidos de control positivo y negativo

Cada vez que se analicen muestras de pacientes en el sistema de tinción automatizada, teñir por separado tejidos FFPE de control positivo y negativo para el HPV con la sonda selectiva RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Los tejidos de control los suministra el usuario basándose en ensayos previos con la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV. Estos controles son necesarios para verificar, usando la sonda selectiva para el HPV, que el ensayo produce los resultados positivos y negativos esperados al analizar muestras positivas y negativas conocidas.

Sondas de control positivo y negativo con cada muestra del paciente

Analice cada muestra de un paciente con sondas de control positivo y negativo en cortes seriados adyacentes del mismo bloque de tejido utilizado con la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV. El ensayo requiere 3 portaobjetos de cada muestra del paciente: uno para la sonda de control positivo, otro para la sonda de control negativo y otro para la sonda del HPV.

Sonda de control positivo

La sonda de control positivo evalúa la integridad del ARN de la muestra midiendo la presencia del ARN de un gen de mantenimiento común. La sonda de control positivo recomendada es la sonda RNAscope ISH Probe UBC (Positive Control) (n.º ref. 200460), dirigida contra el transcrito de ARNm del gen de la ubiquitina C (UBC) humana (342-1503, n.º acceso NM_021009).

Sonda de control negativo

La sonda de control negativo determina la especificidad de cualquier tinción que se pueda observar con la sonda del HPV de alto riesgo, y sirve para evaluar la tinción de fondo o inespecífica de la muestra. La sonda de control negativo recomendada es la sonda RNAscope ISH Probe dapB (Negative Control) (n.º ref. 200470), dirigida contra el transcrito de ARNm del gen de la dihidropicolinato reductasa (dapB) (414-862, n.º acceso EF_191515) de *Bacillus subtilis*.



Cómo realizar el procedimiento

1. Transfiera la sonda RNAscope ISH a un nuevo BOND Open Container (30 mL) sin usar.
2. Siga las instrucciones del sistema de tinción BOND para registrar los reactivos y las sondas, crear casos y portaobjetos, etiquetar portaobjetos, cargar reactivos, sondas y portaobjetos e iniciar el análisis.
3. Use los siguientes protocolos para teñir el HPV y las sondas de control:

Tipo de protocolo	Nombre del protocolo
Tinción	*RNAscope DAB ISH Protocol B
Preparación	*Bake and Dewax
HIER	*RNAscope Target Retrieval (95)
Enzima	*RNAscope Enzyme
Desnaturalización	---
Hibridación	*RNAscope Hybridization

Nota: El «*» que figura en los nombres de protocolo se incluye en el software BOND para indicar los protocolos proporcionados por Leica Biosystems.

4. Al finalizar el análisis, descargue los portaobjetos del sistema de tinción BOND, deshidráteles en alcohol y xileno, y coloque el cubreobjetos siguiendo el procedimiento establecido en el laboratorio.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de las muestras debe hacerla un anatomopatólogo cualificado.

Controles analíticos de los tejidos

La validez de la prueba se determina utilizando tejidos de control positivos y negativos para el HPV siguiendo el algoritmo de la figura 1.

1. Examinar el portaobjetos del tejido de control positivo para el HPV con un objetivo 20X o 40X. Un resultado aceptable es la tinción inequívoca (grandes puntos marrones nucleares y/o puntos marrones granulares nucleares/citoplásmicos) de las células tumorales con el colorante distribuido de forma difusa por todo el tumor, junto con una tinción negativa adyacente dentro del epitelio escamoso no tumoral y en las células del estroma, fibroblastos, linfocitos y células endoteliales no tumorales, al tiempo que se descarta una tinción artefactual.
2. Examinar el portaobjetos del tejido de control negativo para el HPV con un objetivo 20X o 40X. Un resultado aceptable es la ausencia de una tinción inequívoca dentro de las células tumorales.
3. El análisis es válido si son aceptables tanto el portaobjetos del tejido de control positivo para el HPV como el negativo.
4. El análisis no es válido si el portaobjetos del tejido de control positivo o negativo para el HPV no es aceptable.

Examen e interpretación de los resultados de las muestras de los pacientes:

Interprete los resultados siguiendo el algoritmo de puntuación de la figura 2 para determinar si la muestra es positiva o negativa para el HPV. La evaluación de los resultados del portaobjetos con la sonda del HPV debe ir seguida de la interpretación de las sondas de control positivo y negativo (sondas UBC y dapB), tal y como se ha descrito.



1. Utilizando una tinción de hematoxilina y eosina (H/E), confirmar que la muestra es de un carcinoma de células escamosas con al menos 50 células tumorales para que se pueda analizar con la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV.
2. Examinar el portaobjetos de la sonda selectiva (sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV) con un objetivo 20X. Si la tinción no se ve claramente con el objetivo 20X, examinar el portaobjetos con un objetivo 40X.

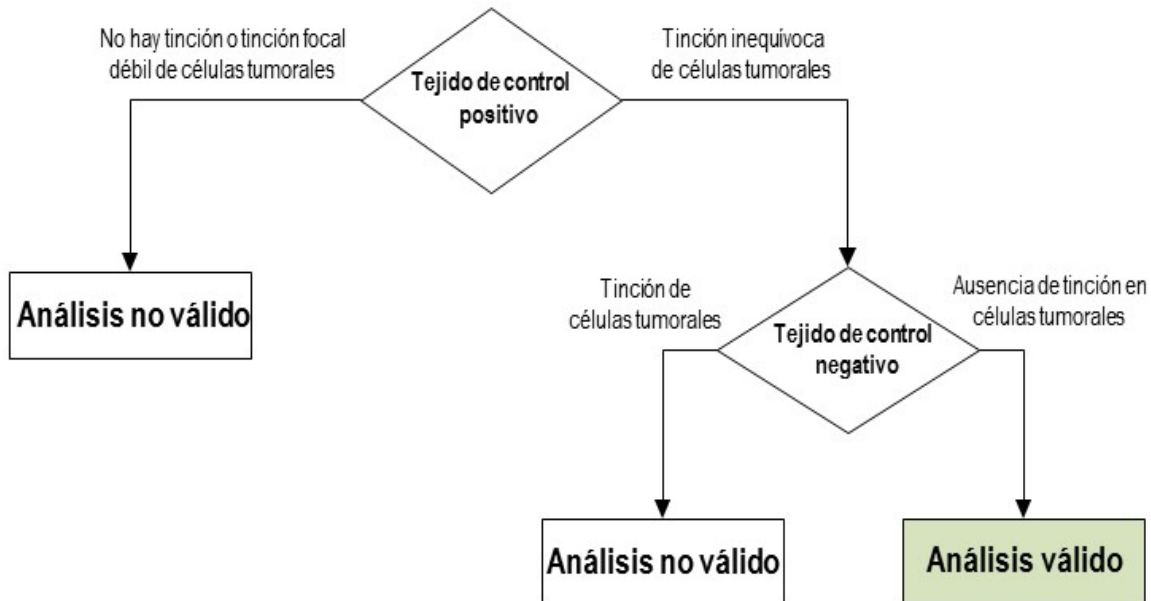


Figura 1. Interpretación de los tejidos de control positivo y negativo teñidos con la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV.

3. Para que el resultado de la ISH sea positivo para el HPV de alto riesgo se requiere una tinción inequívoca (grandes puntos marrones nucleares y/o puntos marrones granulares nucleares/citoplásmicos) de las células tumorales con el colorante distribuido de forma difusa por todo el tumor, junto con una tinción negativa adyacente dentro del epitelio escamoso no tumoral y en las células del estroma, fibroblastos, linfocitos y células endoteliales no tumorales, al tiempo que se descarta una tinción artefactual. Una tinción artefactual sustancial de células tumorales y/o no tumorales de origen epitelial o no epitelial puede impedir interpretar un resultado positivo.

Si la tinción del portaobjetos del HPV de alto riesgo es inequívoca, evaluar el portaobjetos de dapB como sigue:

- i. Si no hay tinción o hay una tinción focal débil en las células tumorales, la muestra se considera positiva para el HPV.
 - ii. Si la tinción está presente en las células tumorales y aparece una señal difusa en el tumor, la muestra se considera indeterminada para el HPV.
4. Un resultado negativo de la ISH del HPV de alto riesgo viene determinado por la ausencia de una tinción inequívoca (ni puntos marrones nucleares grandes ni puntos marrones nucleares/citoplásmicos granulares) dentro de las células tumorales, si la calidad de la muestra es aceptable según el control positivo de UBC.



Si no hay una tinción inequívoca en el portaobjetos del HPV de alto riesgo, evaluar el portaobjetos de UBC como sigue:

- i. Si la tinción está presente en las células tumorales y aparece una señal difusa por el tumor, la muestra se considera negativa para el HPV.
- ii. Si no hay tinción o hay una tinción focal débil en las células tumorales, la muestra se considera indeterminada para el HPV.

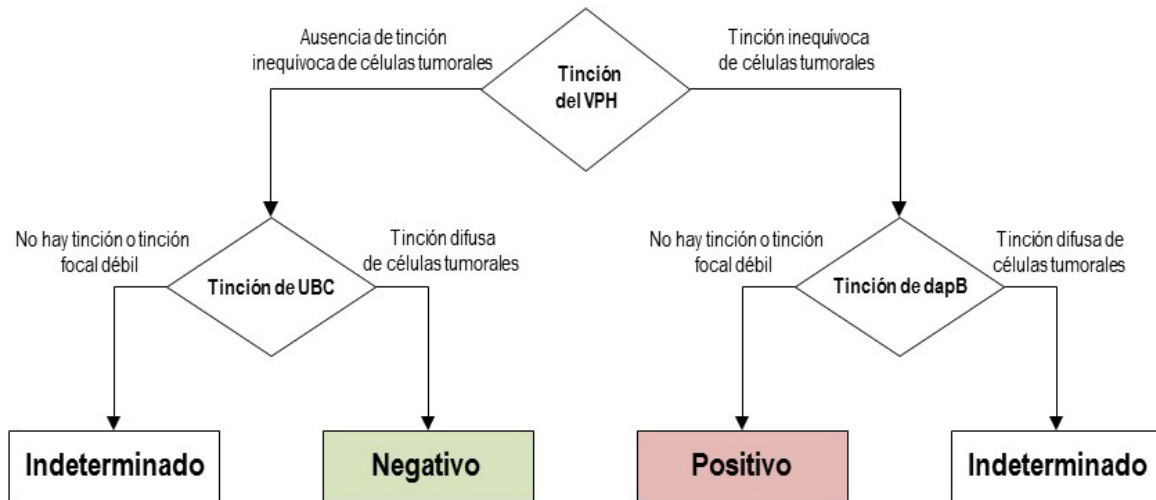


Figura 2. Interpretación del ensayo RNAscope para el HPV

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad analítica

Se evaluó la especificidad analítica para medir la capacidad del ensayo de detectar los subtipos del HPV de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82) y no detectar los subtipos del HPV de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43 y 44). Se distribuyeron en puntos e inmovizaron en portaobjetos de vidrio, plásmidos que contenían la región E6/E7 del genoma del HPV para cada subtipo del virus. El portaobjetos de los plásmidos se analizó con la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV. La sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV detectó los 18 subtipos de alto riesgo. No se observó reactividad cruzada con los subtipos del HPV de bajo riesgo.

Precisión analítica

La reproducibilidad del rendimiento de la tinción de la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV se evaluó a lo largo de varios días, en diferentes sistemas de tinción y con sondas de diferentes lotes.

Para evaluar la precisión interdiaria se realizaron ensayos durante cinco días utilizando sondas de un lote y un sistema de tinción BOND-III. Se tiñeron diariamente tres cortes de tejido de cada uno de cinco casos de carcinoma orofaríngeo (3 positivos, 2 negativos). El porcentaje total de concordancia interdiaria de la señal de ISH calculado fue del 100% de 75 cortes evaluados. También se evaluó la repetibilidad intradiaria. El porcentaje total de concordancia intraserial de la señal de ISH calculado fue del 100% de 75 cortes evaluados.

Para determinar la precisión entre instrumentos se utilizaron sondas de un lote y tres sistemas de tinción BOND-III. Se tiñeron tres cortes de tejido de cada uno de cinco casos de carcinoma orofaríngeo (3 positivos, 2 negativos) en cada sistema de tinción. El porcentaje total de concordancia entre instrumentos de la señal de ISH calculado fue del 100% de 45 cortes evaluados.

La precisión entre lotes se determinó utilizando sondas de tres lotes. Se tiñeron dos cortes de tejido de cada uno de cinco casos de carcinoma orofaríngeo (3 positivos, 2 negativos) en cada sistema de tinción. El porcentaje total de concordancia entre lotes de la señal de ISH calculado fue del 100% de 30 cortes evaluados.

Sensibilidad y especificidad diagnósticas

Se comparó la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV con la inmunohistoquímica (IHC) de p16 en 48 casos de carcinoma orofaríngeo. En concreto, se tiñeron cortes seriados de casos de la amígdala, la orofaringe, el velo del paladar, la parte posterior de la faringe y la base de la lengua con sondas RNAscope ISH Probe High Risk HPV y sondas de control, así como con IHC de p16. Se excluyó una de las muestras porque la sonda de control de UBC indicaba que la integridad del ARN no era aceptable. Los resultados comparativos de RNAscope y p16 se resumen en la tabla a continuación.

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

El porcentaje de concordancia positiva fue del 89% (24/27).

El porcentaje de concordancia negativa fue del 100% (20/20).

La concordancia observada entre la sonda RNAscope ISH Probe High Risk HPV y la IHC de p16 está en consonancia con la expectativa de que algunos casos positivos de p16 sean negativos por ISH⁴⁻⁶. Los tres casos discrepantes pueden ser el resultado de la activación de p16 a través de un mecanismo no relacionado con el HPV. p16 es un marcador indirecto del HPV y existen otros mecanismos que pueden aumentar la expresión de p16 y hacer que se obtenga un resultado positivo en la IHC de p16 en ausencia del HPV. Por el contrario, la ISH es una medida directa del ARNm del HPV y, por lo tanto, no es previsible que se obtengan resultados positivos a través de vías no relacionadas con el HPV.

LIMITACIONES

1. El método se ha optimizado para usarse con el sistema de tinción automatizado BOND-III de Leica Biosystems, utilizando el sistema de detección RNAscope marrón BOND y reactivos auxiliares BOND. Los usuarios deben estar familiarizados con el uso de BOND-III.
2. No se recomienda modificar los procedimientos, ya que podrían obtenerse resultados inexactos.
3. El ensayo ha sido validado con muestras de tejido FFPE de carcinoma orofaríngeo humano. No se han evaluado otros tipos de muestras.
4. Para interpretar correctamente el ensayo es necesario usar sondas de control positivo y negativo. La sonda de control positivo comprueba la integridad del ARN de la muestra. La sonda de control negativo confirma que la muestra no produce una señal inespecífica ni tiene interferentes analíticos que pudieran confundir la interpretación.
5. El ensayo no permite determinar el genotipo de los subtipos de HPV de alto riesgo que se detectan.



6. La tinción de tejidos y células depende de la manipulación y del procesamiento de la muestra de tejido antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o corte inadecuados, o una contaminación con otros tejidos o líquidos, pueden producir artefactos y resultados positivos o negativos falsos. Los resultados discrepantes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, o a irregularidades inherentes a la muestra de tejido.
7. La degradación del ARNm de los tejidos a lo largo del tiempo puede dar lugar a resultados negativos falsos. Una vez montados los tejidos en portaobjetos y conservados a temperatura ambiente (20-25 °C), teñir las muestras antes de 3 semanas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Formamide ($\leq 50\%$).



Palabra de advertencia:
Peligro.

Indicaciones de peligro:

H351 Se sospecha que provoca cáncer.

H360 Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto.

H373 Puede provocar daños en el hígado, los riñones y la sangre.

Consejos de prudencia:

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P202 No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.

P281 Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.

P308+P313 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: consultar a un médico.

P314 Consultar a un médico en caso de malestar.

P405 Guardar bajo llave.

P501 Eliminar el contenido/el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

1. Debe evitarse el contacto directo con la sonda. Usar un equipo de protección individual (EPI) adecuado para evitar la exposición de los ojos, la piel y las membranas mucosas. En caso de exposición, lavar con agua abundante.
2. La sonda contiene material de origen animal. Cualquier material de origen humano o animal debe considerarse un posible riesgo de transmisión de infecciones. Tomar las precauciones adecuadas para manipularlo y desecharlo correctamente.
3. La contaminación microbiana puede hacer que se obtengan resultados inexactos.
4. Consulte la ficha de datos de seguridad para obtener información de seguridad adicional disponible en www.bio-techne.com.
5. Para eliminar correctamente la sonda, consulte la normativa y a las autoridades locales pertinentes.











RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Si no se obtienen los resultados esperados con el tejido de control, repetir la prueba.

Para obtener información sobre la resolución de problemas, póngase en contacto con el Servicio Técnico en support.acd@bio-techne.com.



DEFINICIONES DE LOS SÍMBOLOS

 Número de referencia	 Límite de temperatura	 Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
 Fabricante	 Código de lote	 Conformidad con la Unión Europea
 Fecha de caducidad	 Consultar las instrucciones de uso	 Representante autorizado en la Comunidad Europea
 Riesgo sanitario grave		

PROPIEDAD INTELECTUAL

ACD y RNAscope son marcas comerciales de Advanced Cell Diagnostics, Inc.
BOND es una marca comercial de Leica Biosystems.

BIBLIOGRAFÍA

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. En: 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.

FECHA DE PUBLICACIÓN

20 Mayo 2022

