



**ZytoLight**

**SPEC DiGeorge/Phelan McDermid Dual Color  
Probe**

REF Z-2299-50

Σ 5 (0,05 ml)

Pour la détection qualitative des suppressions affectant les gènes humains HIRA et SHANK3 par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)



Dispositif médical de diagnostic in vitro  
En accord avec la directive européenne 98/79/CE

## 1. Utilisation prévue

ZytoLight SPEC DiGeorge/Phelan McDermid Dual Color Probe (PL252) est prévu pour être utilisé pour la détection qualitative des suppressions du gène HIRA chez l'homme ainsi que du gène SHANK3 chez l'homme dans des spécimens cytologiques par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). La sonde est prévue pour être utilisée avec le kit d'implémentation ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20).

L'interprétation des résultats doit être effectuée dans le contexte de l'histoire clinique du patient par rapport à d'autres données cliniques et pathologiques du patient par un pathologiste/généticien humain qualifié.

## 2. Pertinence clinique

Le syndrome de délétion 22q11.2 (22q11.2DS), également appelé syndrome vélocardiofacial (VCFS) et syndrome de DiGeorge, est un trouble génétique causé par des microdélétions hémizygotiques sur le chromosome 22q11.2, avec une prévalence dans la population d'environ 1 à 4 000 naissances. Le phénotype caractéristique du 22q11.2DS comprend des anomalies cardiaques, une insuffisance vélopharyngienne, un déficit immunitaire dû à une aplasie thymique, un retard de croissance et des déficits des capacités cognitives. La délétion du 22q11.2 se produit généralement par des recombinaisons homologues méiotiques non alléliques entre des répétitions à faible nombre de copies sur le chromosome 22q11.2 appelé LCR22. Il existe huit LCR22 qui couvrent la région 22q11.2 appelée LCR22A jusqu'à LCR22H. La majorité (90 %) des patients atteints du syndrome 22q11.2DS présentent une délétion récurrente de 3 Mb entre LCR22A et LCR22D, qui abrite le gène HIRA. Le syndrome de délétion 22q13.3 (syndrome de Phelan-McDermid) résulte généralement de délétions de 100 kb à 9 Mb impliquant le bras long distal du chromosome 22. Presque toutes ces délétions comprennent le gène SHANK3 qui encode une protéine d'échafaudage dans les densités postsynaptiques des synapses excitatrices, reliant les récepteurs membranaires au cytosquelette de l'actine. Ce syndrome est caractérisé par des déficits neurologiques, qui comprennent un retard de développement global, une déficience intellectuelle modérée à grave, une absence ou un retard grave de la parole et une hypotonie néonatale.

## 3. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringentes. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

## 4. Réactifs fournis

ZytoLight SPEC DiGeorge/Phelan McDermid Dual Color Probe est composé de :

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~10 ng/μl), qui ciblent une séquence de 22q11.21\* (chr22:19,191,435-19,506,869) hébergeant la région génétique HIRA (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~4,5 ng/μl), qui ciblent une séquence de 22q13.33\* (chr22:50,924,766-51,188,029) hébergeant la région génétique SHANK3 (voir figure 1).

- Tampon d'hybridation à base de formol

\* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

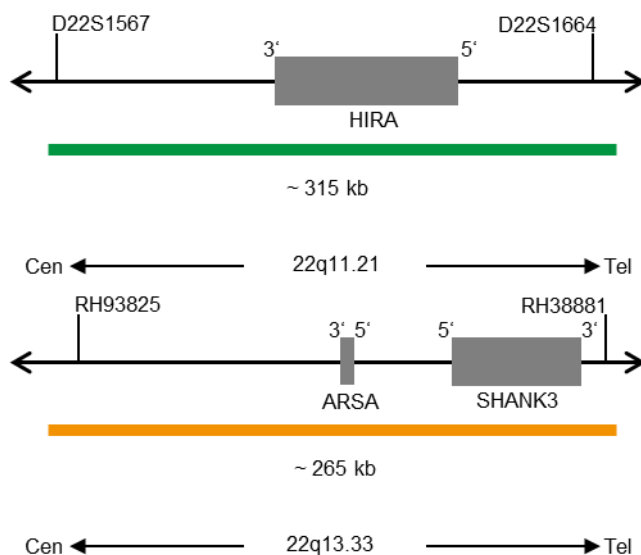


Fig. 1: En haut : Carte de la sonde SPEC HIRA; En bas : Carte de la sonde SPEC SHANK3 (pas à l'échelle)

ZytoLight SPEC DiGeorge/Phelan McDermid Dual Color Probe est disponible en une taille :

- Z-2299-50 : 0,05 ml (5 réactions de 10 μl chacune)

## 5. Matériel requis mais non fourni

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20)
- Échantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, non coatées
- Bain-marie (70 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 μl, 25 μl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Formaldéhyde 37 % sans acide ou formol 10 % tamponné (pH neutre)
- Citrate de sodium salin 2x (SSC), par exemple: 20x SSC Solution (Référence WB-0003-50)

- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple: Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

## 6. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale et à l'abri de la lumière.

Utiliser à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

## 7. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire).
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs.
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- La sonde ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant une longue période ; chaque étape doit être faite, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques.

### Mentions de danger et conseils de prudence :

Le composant dangereux déterminant est le formol.



### Danger

H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

## 8. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- L'interprétation clinique de la présence ou de l'absence de marquage doit être faite en tenant compte du contexte Clinique, de la morphologie, et d'autres critères histo-pathologiques ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste/ généticien qualifié de connaître les sondes FISH, les réactifs, les tableaux de diagnostic et les

méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et sous licence sous la supervision d'un pathologiste/généticien ayant la responsabilité d'examiner les lames colorées et d'assurer l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.

- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artéfacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.

- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 4. « Réactifs fournis ».

- Les performances ont été validées en utilisant les instructions décrites dans cette notice. Les modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

## 9. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une auto fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

## 10. Préparation des échantillons

Préparer les échantillons en suivant les instructions d'utilisation du ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

## 11. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt-à-l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

## 12. Protocole

### Prétraitement de l'échantillon

Effectuer le prétraitement de l'échantillon selon les instructions d'utilisation du ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

### Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 µl de sonde sur chaque échantillon prétraité.
  2. Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.
- Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.*
3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 5 min à 72 °C.
  4. Transférer les lames dans une chambre humide et hybrider toute la nuit à 37 °C (par exemple dans un four à hybridation).

*Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.*

### Post-hybridation

Effectuer l'étape de post-hybridation (lavage, contre-coloration et visualisation au microscope à fluorescence) en suivant les instructions d'utilisation du ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

## 13. Interprétation des résultats

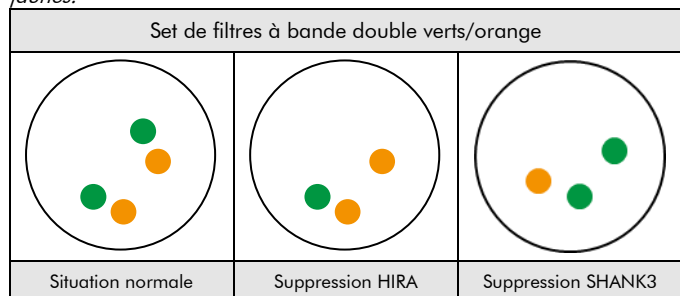
Au moyen de l'utilisation de sets de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (région du gène HIRA) et en orange (région du gène SHANK3).

**Situation normale :** Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans une suppression impliquant les régions géniques respectives, deux signaux orange et deux signaux verts apparaissent (voir figure 2).

**Situation aberrante :** Dans une cellule présentant des délétions affectant la région du gène HIRA, un nombre réduit de signaux verts sera observé. Les délétions affectant seulement certaines parties de la région du gène HIRA peuvent donner lieu à un schéma de signal normal avec des signaux verts de taille réduite. Dans une cellule avec des délétions affectant la région du gène SHANK3, un nombre réduit de signaux oranges sera observé. Les délétions qui n'affectent que certaines parties de la région du gène

SHANK3 peuvent donner lieu à une signalisation normale avec des signaux oranges de taille réduite (voir figure 2).

*Des signaux se chevauchant peuvent apparaître comme étant des signaux jaunes.*



**Fig. 2 : Résultats attendus dans les noyaux en interphase normale et présentant une aberration**

Une autre distribution de signal peut être observée dans certains échantillons anormaux qui pourraient entraîner un motif de signal différent de celui décrit ci-dessus, ce qui indique des variations de réarrangements. Les modèles de signaux inattendus devraient être étudiés de manière plus approfondie.

**Veillez noter :**

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux FISH simples peuvent apparaître comme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance  $\leq 1$  au diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Ne pas prendre en compte les chevauchements de noyaux.
- Ne pas compter les noyaux trop digérés (reconnaissables par des zones noires visibles dans le noyau).
- Ne pas compter des noyaux ayant une forte auto-fluorescence, ce qui entrave la reconnaissance du signal.
- Un résultat négatif ou équivoque peut être causé par différents facteurs (voir chapitre 17).
- Afin d’interpréter correctement les résultats, l’utilisateur doit valider ce produit avant de l’utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

**14. Procédures de contrôle qualité recommandées**

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes n’indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

**Contrôle interne:** Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal.

**Contrôle externe:** Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

**15. Caractéristiques de performances**

**Précision :** La localisation de l’hybridation de la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d’hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, la sonde s’est hybridée uniquement aux loci attendus. Il n’a été observé aucun signal supplémentaire et aucune hybridation croisée supplémentaire. Par conséquent, l’exactitude calculée était de 100 %.

**Sensibilité analytique :** Pour l’évaluation de la sensibilité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d’hommes normaux du point de vue du caryotype. Tous les noyaux ont présenté un modèle de signaux normaux attendus dans tous les échantillons testés. Par conséquent, la sensibilité analytique calculée était de 100 %.

**Spécificité analytique :** Pour l’évaluation de la spécificité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d’hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, tous les signaux se sont hybridés uniquement aux loci cibles attendus et pas d’autres loci. Par conséquent, la spécificité analytique calculée était de 100 %.

**16. Elimination**

L’élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

**17. Assistance**

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout.

**Faible signal ou aucun signal**

Cause possible	Action
Pas de séquence cible disponible	Utiliser les contrôles appropriés
La protéolyse, la dénaturation, l’hybridation ou le lavage stringent ont été faits à une mauvaise température	Vérifier la température de tous vos instruments utilisés, en utilisant un thermomètre calibré
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d’incubation de la pepsine, l’augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation
Le tampon de lavage stringent a une concentration trop basse	Vérifier la concentration du tampon de lavage stringent
Anciennes solutions de déshydratation	Préparer des nouvelles solutions de déshydratation
Microscope à fluorescence mal réglé	Régler correctement
Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. <i>Les sets de filtres à triple bande passante offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à simple ou double bande passante. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à triple bande passante</i>
Sondes/fluorochromes endommagés par la lumière	Effectuer les étapes d’hybridation et de lavage dans l’obscurité

**Signaux d’hybridation croisée ; bruit de fond**

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop important	Réduire le temps d’incubation de la pepsine
Volume de sonde par zone trop important	Réduire le volume de sonde par coupe/zone, distribuer la sonde en gouttelettes pour éviter la concentration locale
Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer les lames rapidement à 37 °C
Concentration du tampon de lavage stringent trop élevée	Vérifier la concentration du tampon de lavage stringent
Température de l’étape de lavage suivant l’hybridation trop basse	Vérifier la température et l’augmenter si nécessaire

Déshydratation des échantillons entre les différentes étapes d'incubation	Eviter la déshydratation en scellant les lames et en effectuant les étapes d'incubation dans un environnement humide
---------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Morphologie dégradée**

Cause possible	Action
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

**Contre coloration faible**

Cause possible	Action
Solution DAPI faiblement concentrée	Utiliser à la place le produit <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Temps d'incubation avec le DAPI trop court	Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI

**18. Bibliographie**

- Burnside RD (2015) *Cytogenet Genome Res* 146: 89-99.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Morrow BE, et al. (2018) *Am J Med Genet A* 176: 2070-81.
- Phelan K & McDermid HE (2012) *Mol Syndromol* 2: 186-201.
- Scambler PJ, et al. (1991) *Genomics* 10: 201-6.
- Watt JL, et al. (1985) *J Med Genet* 22: 283-7.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.  
Merci de nous contacter à [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Allemagne  
Téléphone : +49 471 4832-300  
Fax : +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Courriel : [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Marques déposées :**

ZytoVision® et ZytoLight® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.