

Protocolo de preparación y envío de muestras PGT-A

1. Revise el kit PGT-A y asegúrese de que contiene el siguiente material:
 - *Wash Buffer* (1 ml, almacenar a temperatura ambiente)
 - 1 caja-gradilla con 20 tubos de 0,2 ml limpios y libres de ADNasas
 - 1 formulario de solicitud de servicio PGT-A y hoja de biopsia
 - 1 documento de consentimiento informado
 - 1 documento con recomendaciones para la realización de la biopsia embrionaria
 - 1 caja isotérmica para el envío de muestras
 - 2 acumuladores de frío
2. Complete el formulario de solicitud de servicio de PGT-A y la hoja de biopsia.
3. Complete el documento de consentimiento informado con los datos y **firma de la pareja**.
4. En casos en los que uno o ambos miembros de la pareja presenten un cariotipo anormal o reordenación cromosómica, es necesario el envío de un informe citogenético formal para poder confirmar que es posible detectar las ganancias y/o pérdidas de fragmentos involucrados en la anomalía cromosómica.
5. Realice la biopsia embrionaria y transfiera el material biopsiado de cada embrión a un tubo de 0,2 ml independiente. Los tubos deben permanecer cerrados todo lo posible para evitar contaminaciones realizando la adición de células a los mismos en un entorno estéril siempre que sea posible.
6. Se recomienda utilizar un sistema claro e inequívoco para la identificación de las biopsias obtenidas que asegure su correspondencia con el embrión del que derivan. Se sugiere rotular cada tubo con: número de historia de la paciente y número de embrión tanto en la tapa como en el lateral del tubo. Esta información ha de coincidir con la incluida en la hoja de biopsia.

IMPORTANTE: *Preserve el material biopsiado congelado hasta su envío lo antes posible. Se recomienda no mantener más de 7 días en su laboratorio.*

7. Envíe las células biopsiadas refrigeradas utilizando un transporte exprés con entrega al día siguiente. Incluya en el paquete el formulario de solicitud de servicio y hoja de biopsia completados y el documento de consentimiento informado firmado por la pareja.
8. Los resultados se enviarán por correo electrónico a la dirección proporcionada por su centro en la hoja de solicitud en 10 días laborables tras la recepción de la muestra.
9. Envíe un e-mail confirmando los detalles del envío a logistics@igls.net

Datos de contacto:

iGLS – Integrated Genetic Lab Services.
Avenida Ansaldo 12
03540 Alicante
España

Para cualquier duda o consulta, contacte con nosotros a través del correo electrónico lab@igls.net o en el teléfono 618 774 099.

Recomendaciones generales para biopsia embrionaria

1. Se recomienda utilizar ICSI en los casos de PGT para evitar fallos de diagnóstico por presencia de células maternas o paternas en el material embrionario biopsiado. Para el diagnóstico genético de enfermedades monogénicas (PGT-M) esto es imprescindible. En el caso del diagnóstico de aneuploidías (PGT-A), aunque no es recomendable, se acepta también la utilización de FIV convencional.
2. El PGT se realiza a partir de material biológico obtenido de biopsias celulares, ya sean corpúsculos polares o células embrionarias. Las biopsias pueden obtenerse mediante distintas aproximaciones metodológicas de micromanipulación: biopsia mecánica, química o láser.
3. Independientemente de la técnica de biopsia utilizada, es necesario extremar los cuidados para obtener células aptas para realizar el diagnóstico genético. Se recomienda retirar las células del cúmulo al realizar la biopsia y es **MUY IMPORTANTE** la utilización de guantes tanto en el proceso de marcaje y preparación de los tubos que van a contener las biopsias como en el entubado del material biopsiado y la preparación del kit para envío.
4. Una vez biopsiado, el material extraído ha de ser lavado. Se recomienda pasar las células por 2-3 microgotas (5-10 μ L cada una) del tampón de lavado proporcionado (*wash buffer*). Este buffer ha de almacenarse a temperatura ambiente hasta su utilización en el día de la biopsia. Es importante comprobar la fecha de caducidad del buffer proporcionado en el kit PGT.
5. El material biopsiado de cada embrión/ovocito ha de ser transferido a un tubo de 0,2 ml independiente, limpio y libre de ADNasas (proporcionado en el kit) con 1-2 μ L de tampón de lavado.
6. Los tubos de 0,2 ml proporcionados han de mantenerse cerrados todo lo posible para evitar contaminaciones (entrada de polvo, etc.). Se recomienda realizar la adición de las células al tubo en un espacio estéril y libre de polvo como, por ejemplo, una campana de flujo laminar.
7. Es necesario utilizar un sistema claro e inequívoco para la identificación de las biopsias obtenidas que asegure su correspondencia con el embrión del que derivan. Se sugiere rotular cada tubo con: número de historia de la paciente y número de embrión, tanto en la tapa como en el lateral del tubo.
8. Se recomienda la validación de todo el proceso por dos personas.
9. Para el análisis genético de embriones (PGT) se recomienda realizar biopsias en el estadio de blastocisto. Preferiblemente en día +5 o +6, cuando el blastocisto está expandido. En este estadio se recomienda biopsiar entre 5 y 10 células del trofoectodermo.
10. También se pueden obtener biopsias embrionarias en día +3 (estadio de mórula); en este caso se recomienda biopsiar una sola célula (blastómero).
11. Para el análisis genético en ovocitos (PGT) es necesario obtener biopsias del primer y segundo corpúsculo polar. Se recomienda biopsiar el primer corpúsculo polar el mismo día de la recuperación de ovocitos y el segundo corpúsculo polar puede biopsiarse a las 18-22 h tras ICSI. No se recomienda biopsiar ambos corpúsculos al mismo tiempo porque el primero puede haber degenerado en el día +1.
12. Una vez realizada la biopsia es importante comprobar que las células biopsiadas están intactas y que estas pueden visualizarse en el tubo. Esta información ha de anotarse en la hoja de biopsia proporcionada.

13. Los tubos con las células biopsiadas han de almacenarse a -20° C hasta su envío.
14. Una vez finalizada la biopsia de los embriones de una pareja, el material ha de ser enviado, adecuadamente rotulado, a 4° C utilizando un servicio 24 h.
15. En el día del envío, coloque los tubos en la caja-gradilla del kit PGT, asegúrese de que está bien sellada y póngala dentro de la caja isotérmica junto con dos acumuladores de frío que hayan sido previamente congelados a -20° C durante al menos 24 h.
16. Asegúrese de que las muestras están marcadas adecuadamente. Ponga especial atención en envíos de varios casos a la vez para asegurarse de que las distintas cajas y tubos están marcados con los nombres/números de los pacientes y de los embriones.
17. Además de las muestras, en el paquete ha de incluirse la siguiente documentación: la hoja de solicitud del servicio PGT que corresponda y hoja de biopsia completada y el documento de consentimiento informado firmado por la pareja.
18. Una vez recibidas las biopsias en nuestras instalaciones procederemos al análisis de las muestras y tendremos resultados en un máximo de 10 días laborables.

Protocolo recomendado de preparación de células biopsiadas

1. **LAVADO DE LAS CÉLULAS BIOPSIADAS.** Preparar una placa de Petri con varias gotas (5-10 µL) de tampón de lavado sin recubrimiento de aceite. Transferir la muestra biopsiada a la primera gota de lavado y lavar la punta de la pipeta aspirando y expulsando tampón de lavado. Repetir este proceso tres o cuatro veces para limpiar el interior de la pipeta. Una vez limpia, cargar la pipeta con 2 µL de tampón de lavado fresco y colocarla junto a la masa de células biopsiadas en la primera gota de lavado. Para minimizar el riesgo de perder las células de una biopsia, estas deben ser observadas constantemente durante el lavado. A continuación, expulsar un par de µL de solución de lavado fresca sobre el grupo de células biopsiadas. Esto generalmente hace que las células rueden y se muevan en la gota. Así, el tampón de lavado limpio de la pipeta baña las células y las empuja a las áreas de la gota que contienen tampón de lavado fresco.

Las células biopsiadas han de ser recogidas en un volumen relativamente pequeño de tampón de lavado. Para ello, asegúrese de cargar la pipeta previamente con volumen de tampón de lavado antes de coger las células. Esto ayuda a evitar que las células se dispongan demasiado cerca del menisco, facilitando la expulsión de la muestra sin soplar burbujas. Las células biopsiadas se transfieren entonces a la segunda gota de lavado. Se procurará reducir al mínimo la cantidad de tampón de lavado trasladado de una gota de lavado a la siguiente (es decir, hay que dejar de expulsar líquido tan pronto como el grupo de células deje la pipeta).

Una vez transferidas las células, se descarta el líquido restante de dentro de la pipeta y la pipeta se lava dos veces llenando y expulsando tampón de lavado fresco. A continuación, se precarga de nuevo la pipeta con unos pocos microlitros de tampón de lavado fresco y se coloca en la segunda gota de lavado que contiene el grupo de células biopsiadas. La muestra se lava como se describió anteriormente. Este proceso de lavado se repite hasta que las células biopsiadas han pasado a través de dos o tres gotas de tampón de lavado limpio. El lavado debe hacerse con sumo cuidado asegurando la eliminación de posibles contaminantes, pero garantizando la integridad de las células, sin lisar ni dañar las mismas. Las células lisadas a menudo no dan resultados.

- 2. TRANSFERENCIA AL TUBO DE 0,2 ML.** Después del último lavado, transferir el grupo de células biopsiadas a un tubo de 0,2 ml (suministrado en el kit PGT) en un volumen de 1-2 µl de tampón de lavado limpio. La suspensión de las células biopsiadas en un volumen superior a 2 µl de tampón de lavado podría afectar a los resultados impidiendo la correcta lisis y amplificación del ADN en el laboratorio de genética. Es muy importante cerrar el tubo inmediatamente tras la transferencia de las células. Tenga cuidado de no expulsar el aire pues las burbujas resultantes podrían hacer estallar o lisar las células. Etiquetar el tubo en la tapa y el lateral y centrifugar brevemente para depositar el contenido en la parte inferior del tubo. Si no se dispone de microcentrífuga para tubos de 0,2 ml en el laboratorio, depositar la muestra directamente con la pipeta en la parte inferior del tubo.

Una vez depositada la muestra en el tubo de 0.2 ml, éste se coloca cerrado en una gradilla y se procede con la preparación de la siguiente biopsia. Así cada muestra biopsiada se lava, se entuba y se pone en la gradilla hasta que finalice el caso. Una vez biopsiado un caso, las células se almacenan a -20° C hasta el envío. Si se envían varios casos en el mismo paquete asegúrese de que tanto las gradillas como los tubos están claramente etiquetados con el nombre de cada paciente y que las gradillas están muy bien selladas.

NOTA: *Para PGT-A no es necesario la inclusión de controles negativos. Pero esto es esencial para casos de PGT-M.*

En el caso de biopsias de casos de PGT-M, introducir en un tubo limpio de 0,2 ml, 2 µl de la última gota de tampón utilizada para lavar las células biopsiadas. Esto se debe hacer para cada embrión biopsiado. Estos tubos deben ir rotulados con las siglas CN (control negativo) y el código del embrión correspondiente.

IMPORTANTE: *Este documento contiene recomendaciones generales. Para más detalles específicos, revisar “ESHRE PGT consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group good practice recommendations”.*

REFERENCIA

ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, G. Kokkali, G. Coticchio, F. Bronet, C. Celebi, D. Cimadomo, V. Goossens, J. Liss, S. Nunes, I. Sfontouris, N. Vermeulen, E. Zakharova, M. De Rycke. Hum Reprod Open, Vol 2020, Issue 3.