

NORMAS PARA LA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS DE GENÉTICA PREIMPLANTACIONAL

ANEXO 3

1) LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Aspectos Generales

Toda persona que decida someter a sus gametos a un procedimiento de Diagnóstico Genético, así como la pareja que decida hacer esto mismo con sus embriones debe recibir con antelación la suficiente información de forma oral y escrita como para poder firmar un consentimiento informado.

Personal

El Laboratorio de Diagnóstico Genético debe contar con un Director responsable con las calificaciones adecuadas para la tarea. Debe elaborar y mantener actualizado un Manual de Procedimientos en el que aparezcan todas las técnicas que utiliza el laboratorio y un programa de control de calidad para el funcionamiento del equipamiento, seguimiento de los procedimientos relevantes, protección de la información y para el entrenamiento del personal.

El personal del laboratorio debe tener un programa de entrenamiento reconocido. Este entrenamiento debe ser supervisado por el Director y debe ser registrado en un documento individual para cada integrante del equipo. Todos los integrantes deben demostrar competencias suficientes antes del inicio de la manipulación de muestras clínicas. Una vez entrenado, cada

integrante del equipo debe ser evaluado una vez al año. Se recomiendan programas de entrenamiento continuo.

Instalaciones:

El laboratorio contará con instalaciones adecuadas para realizar con comodidad el número de procedimientos esperados. Debe ser un área destinada exclusivamente a este fin.

Operación

El Laboratorio del Centro debe contar con las habilitaciones pertinentes dispuestas por la autoridad sanitaria del país y cumplir las reglamentaciones que imponga la ley local.

Es particularmente importante que el Manual de Procedimientos contenga un protocolo que asegure la trazabilidad de las muestras, la validación de materiales, reactivos y medios de cultivo. Se llevará un registro pormenorizado, en papel, del protocolo utilizado para el seguimiento de un paciente, desde la inducción de la ovulación y monitoreo hasta la transferencia y crioconservación de embriones. Se debe identificar al personal que interviene en cada paso del procedimiento. Es de crucial importancia mantener la trazabilidad (identidad) de todo el material biológico (gametos y embriones).

Todos los registros del laboratorio deben identificar a la persona que lo escribió y la fecha y hora de la anotación (Aclaración importante: un registro es válido solamente si está claramente escrito con identificación del operador y momento de su realización)

Este Manual debe incluir las políticas a seguir cuando los resultados del estudio sean inconcluyentes (falla del método, cantidad de material biológico insuficiente o degradación celular) y cuando los embriones no sobrevivan al tratamiento.

Debe definir la tasa de error (sensibilidad y especificidad) del método, la tasa de sobrevivencia de los embriones luego de la biopsia y el destino de los embriones anormales o no transferidos

Equipos:

Debe existir un cronograma de mantenimiento preventivo para todos los instrumentos con sus requisitos y registros correspondientes.

Debe existir un cronograma de validación de instrumentos con funciones críticas (estufas, calentadores, congeladoras, flujo laminar, baños termostáticos, centrifugas, termocicladores, etc) Control y certificación de calidad

Todos los procedimientos deben ser revisados por el Director del Laboratorio y demás personal involucrado al menos anualmente. Se debe guardar copias del protocolo original y de sus modificaciones.

Debe existir una revisión periódica (al menos semestral, según el número de casos realizados) de las variables del laboratorio (tasa de error del método de diagnóstico, tasa de sobrevivencia luego de la biopsia y/o congelamiento)) y clínicas (número de embriones transferidos, tasa de embarazo, implantación, aborto y tasa de embarazo múltiple) para ser comparadas con los estándares mínimos establecidos para el centro. Participaran en esta revisión el Director Médico y el Director de Laboratorio. Se deberá guardar un breve registro de estas reuniones en las que se especifique las conclusiones de la reunión y las medidas correctivas aplicadas ante cualquier problema o desviación.

Todos los instrumentos deben recibir un mantenimiento adecuado y su funcionamiento debe ser registrado en forma diaria, mensual o anual según corresponda. Se debe guardar un registro de las fallas de funcionamiento y de las medidas correctivas aplicadas.

1 Personal involucrado en un Programa de PGD.

1.1. La biopsia debe ser realizada por un embriólogo clínico que se dedique a embriología humana en forma rutinaria

1.2 Las técnicas empleadas para el diagnóstico, ya sea FISH (hibridación in situ fluorescente), PCR (reacción en cadena de la polimerasa), aCGH (hibridación genómica comparativa array), etc., deben ser realizadas por personas calificadas, con conocimientos en citogenética y, biología molecular, además de la supervisión de un citogenetista competente. Las personas que realizan el diagnóstico deben tener el entrenamiento apropiado en diagnóstico sobre una célula única o varias células. En el caso de FISH, La fijación puede ser realizada por un embriólogo o por la persona que haya sido entrenado específicamente para ello. De igual manera, para el caso de aCGH o PCR, la amplificación del ADN debe ser realizada en condiciones adecuadas y por personal debidamente acreditado y capacitado.

2 Criterios de inclusión /exclusión para pacientes que realizan PGS/PGD.

2.1 PGD

La decisión de incluir o excluir pacientes del programa de PGD debe ser tomada por un equipo conformado por científicos y clínicos (genetistas, biólogos moleculares, citogenetistas, especialistas en medicina reproductiva y embriólogos).

2.1.1 Inclusión:

2.1.1.1 Se incluirán aquellos pacientes, que por estudios citogenéticos, presenten anomalías estructurales balanceadas (por ejm., translocaciones balanceadas), en alguno de los miembros de la pareja.

2.1.1.2 Se incluirán aquellos pacientes que presenten estudios moleculares (PCR, secuenciación de ADN), plataformas genómicas (aCGH, aSNP o secuenciación de nueva generación) donde se constate una mutación

correspondiente a una enfermedad genética, que represente un riesgo incrementado para la descendencia.

2.1.2 Exclusión:

2.1.2.1 Son criterios de exclusión si el diagnóstico de la enfermedad no es técnicamente posible.

2.1.2.2 Cada centro debe considerar la posibilidad de excluir una pareja si la probabilidad de éxito o de seguridad son muy bajas, Ej: edad, baja reserva ovárica, contraindicación para realizar FIV/ICSI, IMC extremo.

2.1.2.3. El PGD no se considera apropiado si alguno de los integrantes presenta problemas físicos, mentales, psiquiátricos o psicológicos severos relacionados con la enfermedad genética por la cual se solicita el PGD.

2.2 PGS

2.2.1 Criterios de inclusión

Aunque el PGS es controvertido, se han reportado las siguientes indicaciones para su uso:

- 2.2.1.1 Aborto recurrente (AR) (2 abortos o más ((Grifo et al., 2012)) (el criterio para AR debe ser determinado por cada centro). Se debe informar a las parejas con aborto recurrente que existen altas probabilidades de llevar adelante un embarazo evolutivo naturalmente sin el uso de PGD (Brigham et al., 1999; Carp et al., 2001).

- 2.2.1.2 Falla recurrente de implantación (FRI). La falla de implantación se define como la ausencia de un saco gestacional por ecografía 5 semanas o más después de la transferencia embrionaria. Algunos consideran que se produce FRI cuando existen >3 transferencias embrionarias con embriones de buena calidad o transferencia de ≥ 10 embriones en múltiples transferencias (Harper et al., 2006). El criterio para FRI debe ser determinado por cada centro.

- 2.2.1.3 Edad materna avanzada (ejemplo > 36 años, Harper et al., 2006). El criterio de EMA debe ser determinado por cada Centro.

2.2.2 Consideraciones especiales para PGS

Se realizan las siguientes recomendaciones:

2.2.2.1 Existe un proceso de toma de decisión de tres pasos a realizar por el ginecólogo en cooperación con el embriólogo y el genetista, luego de la consulta de los pacientes:

1. Previo a iniciar la hiperestimulación ovárica controlada se debe solicitar estudio citogenético a toda pareja y discutir si el PGS es apropiado. 2. Luego de la punción folicular se debe discutir si es conveniente realizar el PGS, al igual que luego de evaluar la fecundación y el desarrollo embrionario.

3. Luego de obtener los resultados genéticos se debe discutir cuáles ovocitos /embriones deben ser seleccionados para cultivo y transferencia posterior.

3. Asesoramiento

3.1 Aspectos generales relacionados con el asesoramiento genético:

3.1.1 Como el PGS/PGD involucra a ambos miembros de la pareja, los dos deberían concurrir a las consultas.

3.1.2 El asesoramiento genético debe ser dado por un genetista clínico o un asesor en genética. La información acerca de la FIV la provee un especialista en medicina reproductiva. Los casos de PGS pueden ser asesorados por un especialista en medicina reproductiva que esté entrenado en PGS.

3.1.3 La pareja debe acceder a información por escrito acerca del PGS/PGD previo a la consulta y debe recibir por escrito la información dada oralmente en la consulta.

3.1.4 El asesoramiento no debe ser directivo, permitiendo que la pareja obtenga su propia conclusión acerca de la factibilidad del tratamiento.

3.1.5 El asesoramiento se debe dar tanto antes como después del ciclo de FIV/ PGS/ PGD, así como un asesoramiento adicional puede ser necesario al completar la evaluación de laboratorio, para discutir los límites de la propuesta terapéutica del estudio.

3.2 Aspectos generales relacionados con Opciones reproductivas

3.2.1 Se deben discutir alternativas terapéuticas como el diagnóstico prenatal, la donación de gametos, la adopción, aceptar el riesgo, o no tener más descendencia. Esto debe ser discutido en el contexto del éxito y las limitaciones del PGS/PGD.

3.2.2 Se debe preguntar a la pareja la razón por la cual deciden realizar PGS/PGD para asegurar que las expectativas sean reales y que coincidan con lo que puede ofrecer el estudio.

3.2.3 Se debe asesorar en relación a la posibilidad de embarazo espontáneo con el consecuente riesgo genético si no se utiliza anticoncepción previa al tratamiento.

4. Asesoramiento de PGD

Un especialista en medicina reproductiva con entrenamiento en PGS/PGD junto a un genetista clínico calificado deben considerar en el asesoramiento los siguientes ítems:

- El número de ovocitos a ser captados con el objetivo de maximizarlo, siempre dentro de un rango de seguridad.
- El número de embriones a ser biopsiados y la tasa de error, el número de células a ser biopsiadas y la tasa de sobrevida embrionaria esperada luego de la biopsia.
- Que existe un número de embriones que pueden no ser aptos para la biopsia y algunos embriones pueden no sobrevivir a la biopsia.

- En algunos embriones el diagnóstico puede no ser posible y que existe la posibilidad de que algunos embriones presenten un subdiagnóstico, o arrojar resultados no claros.
- La posibilidad de transferir embriones no afectados y la posibilidad de que todos los embriones estén afectados.
- La posibilidad de no poder realizar transferencia embrionaria si todos los embriones son genéticamente o embriológicamente no aptos.
- Cuáles son las condiciones que son diagnosticadas y que no pueden ser detectadas por medio del PGD.
- La factibilidad del PGD, su tasa de error diagnóstico y la posibilidad de tener un resultado adverso. Las tasas de error deben ser explicadas como falsos negativos y falsos positivos y deben estar basadas en tasas y seguimientos del centro.
- El método de diagnóstico debe ser explicado claramente.
- Para los rearrreglos cromosómicos, se debe utilizar una combinación de sondas apropiadas y debe ser validadas para poder detectar rearrreglos no balanceados.
- Se debe asesorar acerca de las ventajas y desventajas del sexado para enfermedades ligadas al X (con la consecuente transferencia de embriones de sexo femenino asumidos como no afectados), en contraposición con la detección de la mutación específica que permite transferir embriones masculinos y femeninos no afectados.
- La toma de decisión de cuales embriones son aptos para la transferencia debe ser discutida con los pacientes antes de iniciar el ciclo y puede ser necesario volver a discutirlo durante el ciclo.
- Se debe discutir la cantidad de embriones a transferir.
- Para enfermedades ligadas al X, en los casos en que se realiza PGS para sexado, se debe informar a la pareja que no se transferirán embriones de sexo masculino (sean afectados o no afectados) y que de los embriones femeninos, no se podrá discriminar cuales son portadores

y cuáles no. Se debe discutir acerca de la posibilidad de realizar testeo de la mutación génica mediante PCR o secuenciación antes de iniciar el tratamiento.

- Se deberán discutir los siguientes ítems con los pacientes:
 - La probabilidad de embarazo evolutivo/nacido vivo por ciclo iniciado y por transferencia, en relación a la edad materna, así como el riesgo de aborto.
 - La criopreservación de embriones testeados y la tasa de embarazo de embriones biopsiados y criopreservados.
 - Se debe informar acerca de la posibilidad de realizar diagnóstico prenatal.
 - Se deberá hacer seguimiento de los resultados del embarazo así como de los recién nacidos (malformaciones, error diagnóstico) y llevar un registro de ello.

5. Usos generales del FISH

El FISH puede ser utilizado para sexado embrionario por enfermedades ligadas al cromosoma X o por razones sociales (selección de sexo por balanceo familiar), rearrreglos cromosómicos hereditarios y *screening* de aneuploidías (PGS).

5.1 Sexado embrionario por enfermedades ligadas al cromosoma X o por razones sociales.

5.1.2 Se recomienda utilizar al menos un set de sondas específicas para las regiones centroamericanas de los cromosoma X e Y y de un autosoma (Staessen et al., 1999; Harper y Wilton, 2001).

5.1.2. Es aceptable el diagnóstico sobre una sola célula mononucleada. (Kuo et al., 1998).

5.1.3. Se debe dejar constancia que el sexado mediante FISH para excluir la transmisión de enfermedades ligadas al X es menos ventajosa en comparación con el diagnóstico de la mutación ligada a la enfermedad realizado por PCR. Esta última técnica permite transferir embriones de sexo masculino no afectados, así como permite evitar transferir embriones de sexo femeninos portadores de la mutación. (Renwick et al., 2006; Renwick y Ogilvie, 2007)

5.1.4. Las sondas autosómicas pueden ser utilizadas para chequear aneuploidías, pero, de ser necesarias múltiples rondas de FISH, las sondas del X e Y deben ser incluidas en la primer vuelta. (Wilton et al., 2009).

5.1.5. Se recomienda que el set de sondas a utilizar contenga sondas suficientes para detectar todas las formas no balanceadas posibles del rearrreglo cromosómico.

5.1.6. Si las sondas no están disponibles, es aceptable utilizar una mezcla de sondas que no detecte algunas formas no balanceadas del rearrreglo cromosómico que tengan baja prevalencia o que se las

considere no viables en un embarazo. (Scriven et al., 1998; Delhanty y Conn, 2001; Munné, 2002; Scriven, 2003).

5.1.7. EL diagnóstico sobre una sola célula mononucleada es aceptable para rearreglo cromosómico si hay al menos dos sondas informativas para el desbalanceo cromosómico que son considerados más prevalentes o que pueden dar lugar a un embarazo viable.

5.1.8. Se recomienda el diagnóstico sobre dos células mononucleadas si hay sólo una sonda informativa.

5.1.9. El uso de sondas adicionales para el screening de aneuploidías de cromosomas no involucrados en el rearreglo cromosómico es aceptable.

5.1.10. Para la detección de una translocación, el informe de PGD-FISH debe dejar en claro que el análisis no discrimina entre embriones normales y embriones con la translocación balanceada

5.2 Screening de aneuploidías

5.2.1 Para el screening de aneuploidías, se recomienda utilizar al menos un set para 8 pares de cromosomas, que incluyan los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y. (Munné et al., 1999; Magli et al., 2001; Wilton, 2002). EL uso de otras sondas adicionales es aceptable.

5.2.2 Para el PGS se recomienda el diagnóstico sobre una sola célula mononucleada. (Cohen et al., 2007).

5.2.3. La rehibridización sobre células únicas es aceptable si presentan validación apropiada y se siguen procedimientos documentados por escrito (Munné et al., 1998; Bahçe et al., 2000; Magli et al., 2001; Wilton 2002).

6. Temas de laboratorio relacionados con FISH y aCGH.

6.1 Materiales de laboratorio

6.1.1 Todo el equipamiento clínico debe cumplir con los criterios para los cuales se van a utilizar, tener un mantenimiento apropiado y chequeado, con procedimientos estándar escritos.

6.1.2 Todos los números de serie de los productos, así como las fechas de vencimiento, deben ser registrados para poder ser rastreados para ensayos específicos.

6.1.3 De ser posible, las soluciones y/o reactivos deben ser adquiridas listas para usar y deben presentar un grado de biología molecular equivalente.

6.2 Se realizan las siguientes recomendaciones para el control de la práctica de trabajo

6.2.1 Es esencial un sistema de identificación adecuado para correlacionar el resultado de la célula diagnóstica (blastómera) y/o células del trofoectodermo con el embrión del cual fue biopsiado.

6.2.2 La identificación de la muestra debe ser confirmada en cada paso crítico y de riesgo. Se recomienda que la identificación única del paciente y el número de la célula y del embrión sea atestiguada y confirmada por dos científicos en los siguientes pasos:

(a) inmediatamente luego de la biopsia para confirmar la correlación entre la célula y el embrión.

(b) al momento de la fijación o amplificación para confirmar la identificación de la célula(s) se correlacione con el etiquetado del portaobjetos o microtubo.

(c) Al momento de la documentación de los resultados de FISH o aCGH para asegurar la precisión y correlación de la identificación de la célula(s) con el embrión

6.2.3 Todo el personal involucrado en el diagnóstico por FISH o aCGH debe estar entrenado adecuadamente y debe seguir procedimientos estándar documentados en forma escrita.

6.2.4 El entrenamiento del personal involucrado en FISH o aCGH debe ser documentado. Se recomienda que se fijen al menos 50 blastómeras y se evalúen por FISH antes de trabajar con muestras clínicas. En el caso de aCGH se recomienda haber realizado con éxito el análisis de 100 eventos (biopsias)

que involucra su amplificación, hibridación y lectura antes de trabajar con muestras clínicas.

6.2.5 Las desviaciones de los procedimientos estándar y de los protocolos deben ser documentadas.

6.2.6 El entrenamiento para FISH debe ser al menos equiparable al requerido para testeo de rutina en un laboratorio citogenético.

6.2.7 El entrenamiento para aCGH deber ser equiparable al requerido para el trabajo de rutina en un laboratorio de biología molecular de alta complejidad.

6.3 Protocolos de Fijación para FISH.

- 6.3.1 Se recomienda que las células del cúmulus sean eliminadas antes de la biopsia debido a que ese material puede contaminar el portaobjetos con células maternas y conducir a errores en el diagnóstico.

- 6.3.2 Los siguientes métodos de extendido y fijación de blastómeras individuales han sido descriptos, todos los cuales son aceptables:

- 6.3.2.1 Metanol/ácido acético (Tarkowski, 1966; Griffin et al., 1992).
- 6.3.2.2 Tween/HCl (Coonen et al., 1994; Harper et al., 1994).
- 6.3.2.3 Combinación de Tween/HCl-metanol/ácido acético (Dozortsev y McGinnis, 2001; Baart et al., 2004).
- 6.3.2.4. Cada uno de estos métodos tiene pros y contras y todos funcionan efectivamente cuando son empleados adecuadamente. El método de metanol/ácido acético es rápido pero la naturaleza tóxica de la solución impide su uso en el ámbito del laboratorio de embriología. El método de Tween/HCl usa sustancias no tóxicas y puede ser utilizado dentro del ámbito del laboratorio de embriología. Algunos científicos encuentran que el método de metanol/acético produce núcleos que están tan extendidos que resulta en señales tan estiradas que son difíciles de interpretar. Otros encuentran que el método Tween/HCl resulta en núcleos muy pequeños y condensados, incrementando de este modo el riesgo de superposición de señales. Cada laboratorio

deberá determinar cuál de las técnicas produce el mejor resultado bajo sus condiciones particulares.

- 6.3.3. El uso de tratamiento hipotónico de las células previo al extendido y fijación es aceptable.
- 6.3.4. Se recomienda fijar una blastómera por portaobjetos. Sin embargo, fijar múltiples blastómeras por portaobjetos es aceptable sólo si se toman todas las precauciones que aseguren un correcto rotulado e identificación de cada blastómera.

6.4 Protocolo de trabajo para aCGH (biopsia y colecta de células)

- 6.4.1 Se recomienda de preferencia que la fertilización sea lograda por ICSI en todos los casos, sin tener en cuenta evidencia de factor masculino de infertilidad. Excedentes de espermatozoides pueden permanecer adheridos a la zona pelúcida después de FIV o estar unidos al oolema y el ADN de estos puede ser incluido en la muestra sin darse cuenta en el momento de la biopsia embrionaria, que puede potencialmente conducir a un diagnóstico erróneo. El ICSI evita la presencia de espermatozoides excedentes y reduce el riesgo de contaminación de ADN de este tipo. Las células de cumulus unidas a la zona pelúcida pueden causar problemas similares, y se debe de hacer el mayor esfuerzo por eliminarlas todas antes de la biopsia del embrión. Verificar que en el medio no estén presentes otras células, esto es esencial cuando se pipetea la muestra para la colección.
- 6.4.2 Los embriones deben ser biopsiados uno por vez. Un testigo es requerido para ello.
- 6.4.3 Tener cuidado para minimizar alguna lisis durante la biopsia. Si alguna célula se lisa todos los instrumentos deben ser cambiados antes de proceder con el siguiente embrión.
- 6.4.4 Se debe de emplear guantes libre de talco (preferentemente de nitrilo) durante el proceso de biopsia.
- 6.4.5 Se recomienda la presencia de un testigo para confirmar la identificación de las células y asistir en el procedimiento. Esto es

recomendado para los procedimientos de biopsia, lavados, preparación de la muestra y transferencia.

- 6.4.6 La recolección de la muestra debe ser realizada en una cabina de flujo laminar y usando guantes sin talco para prevenir la contaminación con ADN. Se debe de cambiar los guantes si se tiene contacto con alguna fuente potencial de contaminación (piel, sudor, incubadora, material no estéril, etc).
- 6.4.7 Los tubos de PCR deben de permanecer cerrados tanto como sea posible.
- 6.4.8 Las pipetas deben ser cambiadas en cada uno de los lavados para evitar contaminantes. Muestra biopsiada debe ser manipulada con cuidado para evitar la lisis. Recomendamos que la muestra sea lavada en tres o cinco microgotas (5-10 ul) del buffer NWB.
- 6.4.9 Es imperativo que las células cargadas en el tubo estén intactas. Por favor anotar en la hoja de trabajo si alguna célula es completa o parcialmente lisada al momento de cargarla (blastómeras)
- 6.4.10 Los lavados deben ser suficientes para asegurar la remoción de todos los posibles contaminantes, pero suaves para no lissarlas.
- 6.4.11 Los reactivos usados para la lisis y amplificación DNA serán diluidos a un nivel inaceptable. Los tubos de PCR tienen que ser transparentes y a menudo es posible observar las muestras en el tubo. De tener una microcentrifuga se puede dar un "spin" luego de la recolección y asegurar que la muestra se encuentre en el fondo del tubo. De no contar con microcentrifuga, colocar la muestra directamente en el fondo del tubo. El tubo debe de ser cerrado tan pronto se haga la transferencia. Tener cuidado de que no se produzca ninguna burbuja después de que la muestra sale de la pipeta, ya que podrían causar la lisis.

7. Validación previa al PGD (FISH y aCGH)

7.1 Se recomienda el uso de sondas comerciales debido a que ya tienen control de calidad y validación. El uso de sondas "caseras" es aceptable si presentan un control de calidad y validación apropiados. En el caso de aCGH se recomienda el uso de kits comerciales para dicho propósito, los cuales tienen un control de calidad realizado.

7.2 Se recomienda que todos los viales de sondas sean testeados previo a la aplicación clínica para confirmar que contienen la sonda específica para el cromosoma correcto con el fluorocromo correcto y que son informativas para la pareja en estudio y para evaluar que la especificidad de la señal, la claridad y discreteness sean aceptables según los criterios de cada laboratorio (debe quedar asentado en procedimientos por escrito). De igual manera, en el caso de aCGH se debe realizar pruebas previas de lote del kit solicitado mediante la evaluación de un ADN de referencia del cual ya se conoce la constitución cromosómica.

7.3 Se recomienda que se predetermine un criterio de *scoring* (publicado o consensuado de cada centro) debe ser seguido estrictamente y debe estar documentado por escrito.

7.4 Se recomienda que en cada ronda de FISH cada sonda esté marcado con un fluorocromo distinto o combinación de fluorocromos que permita diferenciar distintos colores para distinguir una señal de otra.

7.5 En el caso de aCGH, se recomienda que los resultados sean validados en forma ciega por un especialista externo.

8. Proceso de evaluación

8.1 Protocolos de FISH

8.1.1 Se han publicados distintos métodos de FISH y todos los métodos validados son aceptables (Delhanty y Conn, 2001; Harper y Wilton, 2001). El método a utilizar debe haber sido implementado previamente, testado y validado en el centro de PGD.

8.1.2 En los pasos previos a la prehibridización (como el uso de pepsina y paraformaldehído, se recomienda asegurarse un control de calidad adecuado para estas soluciones.

8.1.3 Se recomienda utilizar un medio de montaje que contenga antifade para permitir la persistencia de las señales fluorescentes.

8.1.4 Se recomienda que previo a cada paso del procedimiento de FISH, la desnaturalización, la hibridización y las temperaturas de los lavados sean validadas y que la temperatura de la solución sea verificada antes de su uso.

8.1.5 Los rangos de temperatura a utilizar deben ser validados en cada centro y los instrumentos deben pasar por service y calibración en forma regular para asegurar su precisión.

8.1.6 Todos los pasos críticos del laboratorio de FISH deben ser atestiguados por un observador independiente, preferentemente entrenado en FISH. Los pasos críticos incluyen: la confirmación de la identificación de la célula biopsiada y del portaobjetos sobre el cual se fija, y del uso correcto de sondas para cada caso

8.1.7 Las siguientes recomendaciones se refieren al espacio físico del laboratorio para FISH:

- 8.1.7.1 El laboratorio de FISH debe estar bien ventilado para minimizar el efecto de cualquier vapor nocivo. Esto es particularmente importante si las células son fijadas usando metanol / ácido acético.

- 8.1.7.2 Los resultados de FISH son dependientes de la humedad ambiente. La humedad de un laboratorio de FISH debe ser controlada y estable.

- 8.1.7.3 Las señales de FISH pueden descolorarse o debilitarse en presencia de luz brillante. Se recomienda que el Laboratorio de FISH cuente con luz incandescente de intensidad variable. El uso de luz fluorescente es aceptable.

- 8.2 Protocolos de aCGH

- 8.2.1 Se han publicado numerosos trabajos para la validación del aCGH para PGS/PGD (Gutiérrez Mateo et al., 2011; Fragouli et al.,

2010; Capalbo et al., 2013; Ata et al., 2012; Colls et al., 2012). El método a utilizar debe haber sido implementado previamente, testeado y validado en el centro de PGD.

- 8.1.2 En los pasos previos a la amplificación, se recomienda asegurarse un control de calidad adecuado de los reactivos mediante la amplificación de ADN genómico control.

- 8.1.3 Se recomienda que previo a cada paso del procedimiento de aCGH, amplificación e hibridación, las temperaturas de los equipamientos y soluciones de lavados sean verificadas antes de su uso.

- 8.1.4 Los rangos de temperatura a utilizar deben ser validados en cada centro y los instrumentos deben pasar por un servicio de calibración en forma regular para asegurar su precisión.

- 8.1.5 Todos los pasos críticos del laboratorio de aCGH deben ser atestiguados por un observador independiente altamente entrenado en aCGH. Los pasos críticos incluyen: la confirmación de la identificación de las células biopsiadas y tubo en el son colocados, y del uso correcto del los reactivos para el caso.

- 8.1.6 Las siguientes recomendaciones se refieren al espacio físico del laboratorio para aCGH:

- 8.1.6.1 El laboratorio de aCGH debe contar con dos espacios bien delimitados ("PCR room" y "aCGH room"). El "PCR room" en el cual se realiza la amplificación del ADN a evaluar, debe estar debidamente aislado (evitar contaminación) para lo cual debe trabajarse bajo flujo laminar y en condiciones de asepsia, en el mejor de los casos se debe contar con un sistema de presión positiva de aire. En el caso de "aCGH room" debe contar con la posibilidad de trabajar con baja luminosidad. Se recomienda que el Laboratorio cuente con luz incandescente de intensidad variable. En caso de poseer ventanas estas deben de contar con un sistema tipo "black-out". Debe contar con mesadas adecuada para el proceso de etiquetado de los vidrios. Los equipamientos de la rutina (centrifuga, concentrador de ADN, estufas, baños termostáticos,

ciclador, scanner, vortex, etc.) deber estar dispuestos en forma ordenada de acuerdo a su uso prioritario.

- 8.1.6.2 Los vidrios de aCGH que han sido retirados de su empaque de fábrica y que no han sido utilizados durante la rutina, deben ser almacenados en una campana que disminuya los niveles de humedad atmosférica, a fin de mantener estable su composición.

8.1.6.3 Las señales de aCGH pueden debilitarse en presencia de luz brillante. Se recomienda que la lectura de los vidrios se realicen dentro las 2 horas luego de haber sido preparados.

9. Lectura

9.1 FISH

9.1.1 Se debe establecer un criterio de scoring de señales por escrito a seguir para la interpretación de las señales

9.1.2 El microscopio de Fluorescencia debe estar equipado con los filtros adecuados para la lectura de las sondas que se utilizan

9.1.3 La lectura de las señales debe ser interpretada por dos observadores independientes, y en caso de discrepancia, tomar en consideración la opinión de un tercer observador. Si no se logra una conclusión, ese embrión no debe ser elegible para transferir y ser informado como no interpretable o no concluyente.

9.1.4 Es aceptable diagnosticar como señales de sondas con fluorocromos no detectables al ojo humano utilizando un sistema de captura de imágenes

9.1.5 Todas las imágenes de las células individuales deben ser capturadas y grabadas para control de calidad y registro de las mismas.

9.1.6 Si un embrión es transferido o criopreservado, se debe archivar el portaobjetos a 4°C o deshidratado a temperatura ambiente.

9.1.7 Si no hay embriones para transferir o criopreservar, no es necesario archivar el portaobjetos.

9.1.8 Si la paciente no logra embarazo, los portaobjetos pueden ser descartados.

9.1.9 Si se logra un embarazo, los portaobjetos deben quedar archivados hasta conocer el resultado del embarazo, y si es posible, hasta conocer la confirmación del resultado del FISH.

9.1.10 Los resultados deben ser revisados y firmados por una persona calificada.

9.1.11 Se debe entregar un informe escrito o electrónico al centro de FIV para asegurar la transferencia de los embriones correctos. Los resultados no deben ser transmitidos oralmente.

9.2 aCGH

9.2.1 El scanner debe ser testeado (vidrio de prueba) previamente por el operador.

9.2.2 La lectura de las señales y la interpretación de las gráficas debe ser interpretada por dos observadores independientes, y en caso de discrepancia, tomar en consideración la opinión de un tercer observador (externo). Si no se logra una conclusión, ese embrión no debe ser elegible para transferir y ser informado como no interpretable o no concluyente.

9.2.3 Todas las imágenes de la hibridación individuales deben ser capturadas y grabadas para control de calidad y registro de las mismas.

9.2.4 Si un embrión es transferido o criopreservado, el ADN amplificado correspondiente al embrión deben ser almacenados a -70°C .

9.2.5 Si se logra un embarazo, los portaobjetos deben quedar archivados hasta conocer el resultado del embarazo, y si es posible, hasta conocer la confirmación del resultado del aCGH.

9.2.6 Los resultados deben ser revisados y firmados por una persona calificada.

9.2.7 Se debe entregar un informe escrito o electrónico al centro de FIV para asegurar la transferencia de los embriones correctos. Los resultados no deben ser transmitidos oralmente.

9.2.8 Los resultados obtenidos pueden ser:

NORMAL: Un embrión cromosómicamente normal posee 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. Los embriones reportados como normales son considerados de tener un bajo riesgo de anomalías cromosómicas.

TRISOMIA: Ganancia de una copia extra de algún cromosoma. Estos embriones son considerados de tener un alto riesgo de anomalías cromosómicas. Con la excepción de las poliploidías y el mosaicismo, este estudio indica que existen 3 copias del cromosoma(s) analizado

MONOSOMIA: Pérdida de una copia simple de algún cromosoma. Estos embriones son considerados de tener un alto riesgo de anomalías cromosómicas. Con la excepción de las poliploidías y el mosaicismo, este estudio indica que existe 1 copia del cromosoma(s) analizado

COMPLEJO ANORMAL: Es una combinación de tres o más eventos de monosomías o trisomías. Estos embriones son considerados de tener un alto riesgo de anomalías cromosómicas.

DNA DEGRADADO: Esto se indica como un perfil caótico cuando cada cromosoma resulta en múltiples ganancias y pérdidas de las sondas de ADN. Estos perfiles caóticos son comunes en embriones detenidos y morfológicamente anómalos, apoptóticos y necróticos. Sin embargo, pueden ser el resultado del daño celular o del ADN durante el procedimiento de biopsia. EL daño durante la biopsia puede inducir a la liberación de enzimas que degradan el ADN causando así los perfiles caóticos y esto no es representativo del genotipo del resto del embrión.

10. PGD de Transporte

Por PGD de Transporte ([Harton et al., 2010a](#)) se entiende un sistema donde un centro de FIV, luego de realizar la biopsia y fijación de las células, envía el portaobjetos a otro centro donde se realizara la lectura de las señales de FISH, o en el caso de aCGH se envía los tubos de PCR que contienen las biopsias de trofoectodermo

10.1 Se recomienda que ambos centros (FIV y PGD) posean un acuerdo oficial respecto a los asuntos legales, de seguro y responsabilidad.

10.2 Ambos centros deben acordar un conjunto de protocolos previamente al primer envío de material. Es recomendable que se usen los mismos protocolos en ambos centros. Se debe prestar especial atención a quien es responsable en cada uno de los pasos involucrados en este proceso de transporte. Se recomienda también que ambos centros usen un mismo consentimiento informado.

10.3 Se recomienda que ambos centros realicen al menos un envío de prueba antes de enviar cualquier muestra clínica.

10.4 El centro de PGD debe validar, para cada centro que refiera material, los protocolos de tiempo y condiciones de transporte para asegurarse que no se comprometan la morfología celular, la hibridación mediante FISH ni la integridad del ADN, así mismo en el caso de aCGH debe asegurarse que el ADN pueda ser debidamente amplificado y que se obtenga la cantidad suficiente de ADN para realizar la hibridación

10.5 Los centros que envían muestras deben poseer personal entrenado en las técnicas de biopsia y fijación acordes a los estándares del centro de PGD. Si esto no es posible, el centro que refiere el material deberá arreglar contar con personal entrenado para ese momento.

10.6 Los centros que refieran material deben adherirse a las reglas acordadas para el máximo número de muestras transportadas que el centro de PGD es capaz de absorber por día o durante un periodo determinado.

10.7 Se recomienda que los resultados sean enviados en forma escrita (fax o email) y no comunicados telefónicamente. Los reportes deben tener un formato fijo y ser claros y sencillos.

10.8 Se recomienda que ambos centros acuerden acerca de la responsabilidad de quien colecta los datos de PGD y quien hace el seguimiento de los niños nacidos mediante esta técnica.

