

1. ALCANCE Y OBJETIVOS

El objetivo de este manual es dar a conocer como se debe realizar la toma de los medios de cultivo embrionario y el envío de los mismos a Genetix para la realización de NICS (PGT-A NO INVASIVO). Este debe ser socializado con los embriólogos, médicos y biólogos que participan en los diferentes centros de fertilidad y en Genetix en este proceso.

2. REQUISITOS

- Fertilización usando mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides ó ICSI

PROCEDIMIENTO:

3. EMBRIONES FRESCOS

3.1 Preparación de Medios

Se puede usar cualquier medio, pero no se deben suplementar con albumina adicional.

Es posible usar medios de cultivo de 1 paso o secuencial.

La manipulación de los kits de recolección, medios de cultivo y material del laboratorio debe hacerse con guantes, gorro, tapabocas y bata para evitar la contaminación con ADN del operador. Antes de usar cabina de bioseguridad y los utensilios a usar, se debe hacer eliminación de agentes con luz UV o alcohol.

La contaminación con ADN del operador es uno de los principales factores a considerar.

3.2 Cultivo Embrionario

Los embriones pueden ser co-cultivados hasta el día 3, a partir de ese momento cada embrión debe ser ubicado en una gota de cultivo aparte, **de 20 – 25 microlitros máximo**.

Después de realizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) transfiera los ovocitos a las microgotas de GM (un ovocito coincide con una microgotas) y se incuban en 37°C, 5% de CO₂ 5% de O₂. El día de ICSI se registra como el Día 0. Observe y califique los embriones en el día 1 para la fertilización, día 2 y día 3 para la división del embrión.

3.3 Retiro de Células de la Granulosa Completamente

Las células de la granulosa deben removerse por completo ya que esta es una fuente de contaminación con ADN de origen materno y por tanto de resultados falsos negativos o errores en el sexo embrionario reportado.

Evaluación del ovocito: Evalúe la eliminación completa de las células de la granulosa con un microscopio 20X10 (Nota: las células de la granulosa deben retirarse por completo para evitar la

contaminación materna de los resultados de NICS).

3.3.1 Digestión con hialuronidasa: Solo en caso de necesidad

- Retire con cuidado la mayor cantidad posible de células de los cúmulos sin dañar el ovocito utilizando una aguja de inyección de 1 ml. Enjuague suavemente los OCC en IM aspirando y liberando 2-3 veces con la pipeta Pasteur el OCC.
- Transfiera rápidamente el OCC al pozo central que contiene 1 ml de IM (BD Bioscience) e incube los ovocitos a 37°C, 5% de CO₂ y 5% de O₂ en la incubadora.
- Digestión de OCC con hialuronidasa:
 - Agregue 1 ml de hialuronidasa precalentada a 37 °C (80 UI / ml) al pozo central del plato que contiene el OCC. Mantener la concentración final de Hialuronidasa a 40 UI / mL y mezcle bien.
 - Incubar los OCC a 37°C aproximadamente 3-5 minutos hasta que solo 1-2 capas de células de la granulosa estén alrededor.
- Denudación de células de la granulosa:
 - Transfiera rápidamente los OCC digeridos con una punta de extracción de 135 µm al pozo No. 1 de 4 de la placa de cultivo-con 0.5 mL GM cubierta con aceite mineral en cada pozo.
 - aspire suavemente y libere los ovocitos para eliminar las células de la granulosa alrededor de los ovocitos. Repita en el resto de 3 pocillos para eliminar completamente las células de la granulosa.

3.4 Lavado de embriones en día 3

- Prepare las microgotas de 30 uL de medio de cultivo que emplea HABITUALMENTE para cada embrión cubierto con aceite mineral en platos (BD Bioscience) el D3.
- Prepare otras tres microgotas de 50 ul BM etiquetando No. 1-3 en un plato para lavado. Coloque todas las micro-gotas en la incubadora a 37°C antes de usar.
- **Transfiera los embriones del Día 3 a las micro-gotas de lavado. Aspirar suavemente y soltar los embriones 3 veces en cada gota usando pipetas Pasteur (150 µm de diámetro interior). Este procedimiento también puede ayudar a eliminar las células granulares residuales unidas al embrión.**

3.5 Cultivo hasta día 5

- Transfiera cada embrión a una **sola microgota de 20 – 25 uL de medio de cultivo** y realice el cultivo de blastocisto hasta el Día 5 / Día 6 en 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂.
- Seleccionar blastocistos en el día 5 o 6 para vitrificación según los criterios del laboratorio (Expansión grado 4 o superior y la clasificación de la masa celular interna o trofoblasto nivel B o superior).
 - Para los embriones frescos D3 a D5, el volumen de la gota de cultivo máximo después del cambio de medio debe ser máximo de 25 uL.

La idea clave es eliminar las células del cúmulo e incubar embriones el mayor tiempo posible antes de la eclosión completa para aumentar el ADN en el medio de cultivo

3.6 Incrementar el ADN libre en el Medio de Cultivo

Para aumentar la cantidad de ADN embrionario libre en el medio de cultivo se pueden realizar dos procedimientos:

- **Hatching D3 antes de cambio de medio de cultivo y**
- **Hatching D5 y dejar en cultivo por 12 a 16 horas más.**

3.7 Recolección de muestras

La recolección del medio de cultivo embrionario en etapa de blastocistos debe seguir el procedimiento estándar del Laboratorio de Fertilización In Vitro (FIV). Lo debe realizar el embriólogo.

Para la recolección del medio, los embriones deben colocarse en una placa separada para la vitrificación y luego el medio de cultivo restante se recolecta.

- Vitrifique los embriones y conserve el medio de cultivo donde fueron cultivados.
- **Transfiera 20- 25 uL (la totalidad) del medio de cultivo usado de cada embrión cultivado** en el día 5 al tubo de recolección que provee Genetix, este contiene 5 uL de tampón de lisis celular.
- Configurar los controles:
 - **Control negativo: Medio de cultivo preparado no usado**
 - **Control en blanco: Medio de cultivo fresco.**
 - Deposite 20 uL de cada control en un tubo de recolección que provee Genetix.Lleve los tubos que contiene el medio de cultivo a congelación hasta ser enviados a Genetix.

Los tubos de recolección que envía Genetix deben ser manipulados con guantes, tapabocas, gorro y bata y en cabina de bioseguridad para evitar contaminación con ADN del operador.

4. EMBRIONES CRIOPRESERVADOS D3

Seguir protocolo de EMBRIONES FRESCOS EN D3 (NUMERAL 3) después de descongelar los embriones.

5. EMBRIONES CRIOPRESERVADOS D5

- **Recultivar los embriones durante 12- 16 horas o más si es necesario hasta que estén en un estadio 4B, en 10-15uL de medio de cultivo (máx. 15 uL)**
- Es posible hacer hatching para aumentar la concentración de ADN embrionario.

5.1 Recolección del medio de cultivo

- La recolección del medio de cultivo embrionario en etapa de blastocistos debe seguir el procedimiento estándar del Laboratorio de Fertilización In Vitro (FIV). Lo debe realizar el embriólogo.
- Para la recolección del medio, los embriones deben colocarse en una placa separada para la vitrificación y luego el medio de cultivo restante se recolecta.
- Vitrifique los embriones y conserve el medio de cultivo donde fueron cultivados.
- **Transfiera 10-15 uL (la totalidad) del medio de cultivo usado de cada embrión cultivado** al tubo de recolección que provee Genetix, este contiene 5 uL de tampón de lisis celular.
- Configurar los controles:
 - **Control negativo: Medio de cultivo preparado no usado**
 - **Control en blanco: Medio de cultivo fresco.**
 - Deposite 20 uL de cada control en un tubo de recolección que provee Genetix.
- Lleve los tubos que contiene el medio de cultivo a congelación hasta ser enviados a Genetix.

Los tubos de recolección que envía Genetix deben ser manipulados con guantes, tapabocas, gorro y bata y en cabina de bioseguridad para evitar contaminación con ADN del operador.

6. EMBRIONES SIN RESULTADOS

En los casos de embriones sin amplificación del medio de cultivo, es posible descongelar y recultivar por 12- 16 horas más y aplicar protocolo en el numeral 5.

7. NOTAS IMPORTANTES

- La eliminación completa de las células granulares es necesaria para evitar la contaminación materna.
- NICS (PGS No invasivo) es solo para el embrión que proviene de ICSI.
- Realice un cultivo de gotas individuales para cada embrión para evitar la contaminación cruzada.
- Configure el control en blanco con un medio de cultivo nuevo libre de embriones para examinar posible contaminación durante el cultivo.
- Configure el control negativo con medio de cultivo fresco para examinar la posible contaminación del medio.
- La cabina y el área de trabajo debe estar limpia y lo más importante es evitar la contaminación con ADN del operador.
- Los embriones en D3 deben ser cultivados en gotas de 20-25 uL, máximo 30 uL de medio de cultivo. Para embriones recultivados en el D5, se deben recultivar en 10 – 15 uL de medio de cultivo.

El procedimiento de recolección de medio se debe realizar con pipetas con punta estéril y filtro, bajo un estereomicroscopio en un ambiente limpio con placa de calentamiento apagada. Siempre use gorro quirúrgico, máscara y guantes estériles cuando maneje tubos de PCR.

Los tubos de recolección se abren en campana de flujo laminar para evitar contaminación y previo al uso verifique que el contenido está en la parte cónica del tubo (fondo), si es necesario realiza un spin en microcentrifuga.

8. CONTENIDO DEL KIT DE RECOLECCIÓN

En el kit, hay 12 tubos de PCR individuales de 0,2 ml con 5 uL de tampón de lisis pre-agregado sentado en un bastidor dentro de una caja rectangular.

El kit de recolección se encuentra dentro de una caja de envío de espuma de poliestireno y se envía con geles congelados con la documentación requerida por Genetix.

La caja con los tubos se almacena en la nevera y debe manipularse con guantes y con las medidas preventivas para evitar la contaminación con ADN del operador.

9. ENVÍO DE MUESTRAS

- Coloque todos los tubos de PCR individuales de 0.2 ml con el medio de cultivo en la caja y congelea -20 ° C. Las muestras son estables durante una semana a esta temperatura.
- Coloque la caja de espuma de poliestireno dentro de una nevera de icopor con hielo seco o pilas congeladas en el momento de ser transportadas a Genetix.

Coloque una copia de toda la documentación requerida en una bolsa plástica.

Para muestras en Bogotá: Genetix envía mensajero para la recolección de muestras.

Para muestras fuera de Bogotá: los envíos los debe realizar para entrega en menos de 24 horas.

10. PROCESAMIENTO

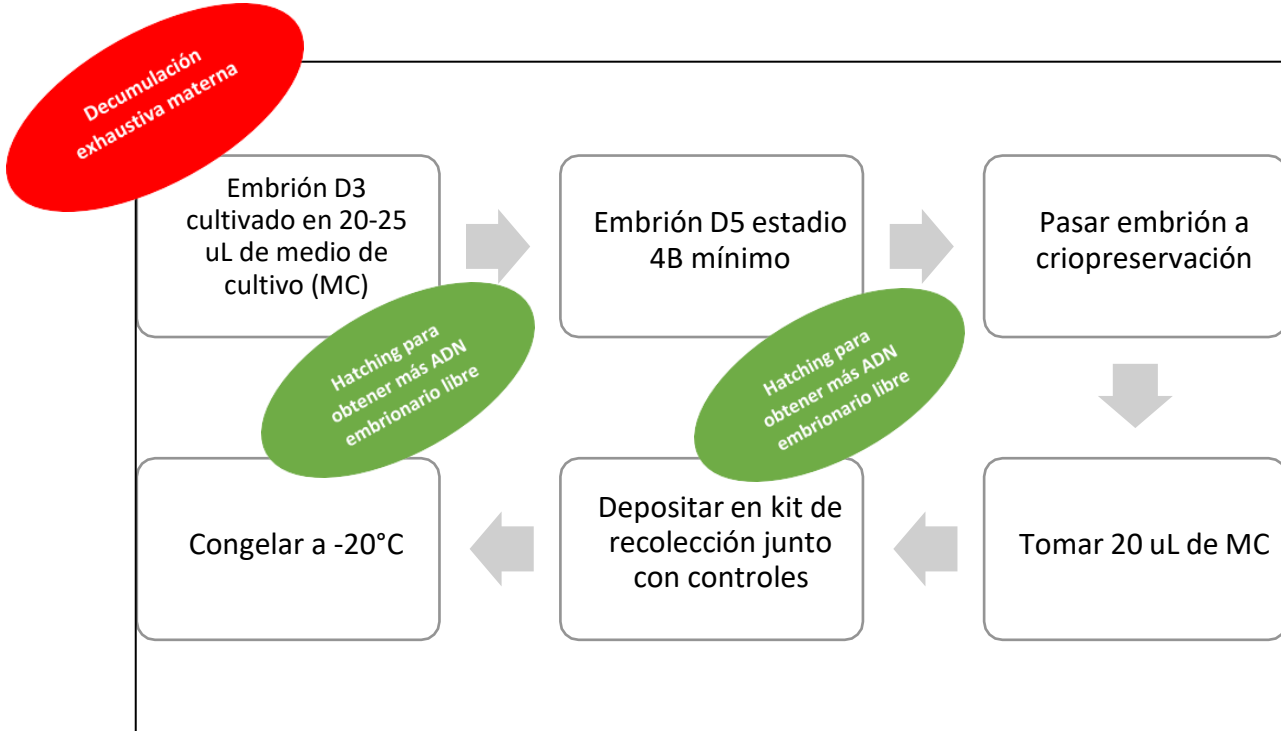
Lunes de cada semana.

11. RESULTADOS

Viernes de cada semana.

En semanas con lunes festivo el procesamiento se realiza los martes con resultados los sábados.

Embriones Frescos:



Embriones Criopreservados:

