

Equipamentos, instrumentos e reagentes necessários (para PGT-A, PGT-SR e PGT-M):

- Cabine de fluxo laminar (de preferência com luz UV).
- Microscópio para manipulação celular.
- Pipeta automática de 1 µL-10 µL. Seu uso exclusivo para PGT é recomendado para evitar contaminação. No caso de uso múltiplo, esterilize bem com o produto de descontaminação.
- Ponteiros estéreis com filtro, se possível livre de DNase /RNase.
- Micropipeta Stripper ou Flexipet, qualquer dispositivo para tubing manual com um medidor volumétrico.
- Capilares de policarbonato com diâmetro entre 100-150 µm [por exemplo: Pipetas de desnudação VITROMED - V-DEN ou RI (Origio) - EZ-Tip®].
- Placas de Petri de 60 mm ou placas para ICSI.
- Tubos de PCR estéreis de 0,2 mL - fornecidos pela IGENOMIX.
- Rack de armazenamento a frio (rack) - fornecido pela IGENOMIX.
- Óleo mineral FRIO
- Descontaminante de superfícies DNAAWAY™ (substituível por: Oosafe, Fermacidal, sabão 7X, ...).
- Solução de lavagem e tubing (Washing/Lyses) - fornecida pela IGENOMIX.

Metodologia:

Notas importantes para evitar contaminação:

- Recomenda-se que o protocolo de tubing seja realizado em um laboratório separado, mas próximo ao laboratório de fertilização in vitro, e com um sistema de ventilação independente. Nesse caso, todos os processos de limpeza devem ser realizados com etanol a 70% como descontaminante.
- Se isso não for possível, descontaminantes não embriotóxicos devem ser usados para a limpeza do material.
- O embriologista deve usar equipamento de proteção individual (máscara, luvas, toca de cabelo / proteção para barba) a fim de evitar a contaminação da pele com a contaminação do DNA.
- Ao manusear materiais e amostras, use sempre luvas desinfetadas ou estéreis.
- Recomenda-se o uso de equipamentos e materiais exclusivamente para PGT.
- Os materiais descartáveis devem ser abertos recentemente ou reservados exclusivamente para a PGT (sempre manuseados com luvas).
- Recomenda-se manipular as amostras em salas limpas, se possível, em salas separadas de outras atividades.
- Evite manusear DNA nesta sala e mantenha o DNA na geladeira e no freezer.
- Limpe completamente todo o material com descontaminante (sempre usando luvas), prestando atenção especial para evitar a contaminação do DNA.

Preparação

Antes de iniciar o protocolo, recomenda-se preparar o material com antecedência, para preparar o tubing imediatamente após a biópsia do embrião.

-Todo o material não descartável que entra na área do fluxo laminar deve ser limpo (sempre com luvas) com o descontaminante selecionado - preferencialmente DNAAWAY™, ou Oosafe / Fermacidal - assim como a superfície da cabine e o microscópio.

-Todos os consumíveis devem ser abertos recentemente ou destinados a o PGT, desde que tenham sido manuseados com luvas.

-Se houver luz UV na cabine de fluxo laminar, todo o material (MENOS OS EMBRIÕES) deve ser exposto à luz UV por 5 minutos antes de iniciar o protocolo.

-Prepare os tubos de PCR de acordo com o número de embriões a serem biopsiados, completando-os com 2,5 µL de solução de loading (recomenda-se a preparação de tubos adicionais).

-Vire os tubos de PCR que já contêm a solução de loading. Verifique se não há bolhas na solução e confirme se o volume da solução permanece na parte inferior do tubo. Se a centrifuga não estiver disponível, agite vigorosamente os tubos manualmente.

-Se o tubing não puder ser realizado imediatamente, coloque os tubos de PCR em uma rack refrigerada e guarde-os no freezer (-20°C) até o procedimento de tubing. Se o tubing for feito imediatamente, coloque os tubos no fluxo à temperatura ambiente.

-NÃO identifique os tubos até que a biópsia esteja concluída e antes de prosseguir com o procedimento do tubo.

-Placa de lavagem: prepare uma placa de Petri de 60 mm (ou uma das ICSI) de acordo com o esquema mostrado abaixo. Você precisa preparar uma fileira de 4 gotas por amostra de biópsia. Cada gota contém 10 µL da solução de lavagem fornecida por Igenomix, e cubra com óleo mineral frio. São feitas no máximo 6 fileiras por placa (correspondendo a 6 amostras).

Obtenção da amostra:

1. O protocolo é realizado à temperatura ambiente, a superfície da cabine deve estar fria.
2. Após a biópsia e imediatamente antes do tubing, a tampa dos tubos de PCR de 0,2 mL deve ser devidamente identificada com as iniciais do paciente e o número do embrião. Não é recomendado escrever no corpo do tubo, pois ao posicionar na rack refrigerada a identificação pode ser apagada.
3. Se os tubos de PCR de 0,2 mL já estiverem preparados e armazenados no congelador, remova-os e coloque-os dentro da cabine para permitir que descongelem imediatamente antes do tubing. Verifique se a solução de loading está líquida e sem bolhas.
4. Além da placa de lavagem, prepare uma placa adicional no momento do tubing, contendo uma grande gota (~100 µL) de meio de lavagem e não imersa com óleo. Essa gota será usada para limpar o capilar toda vez que a amostra for depositada de uma gota de lavagem para a próxima, portanto, 1 para cada 1-2 embriões biopsiados deve ser preparado.
5. Use um novo capilar para cada célula individual (biópsia do dia 3) ou para biópsia de trofotoderma.
6. Cada amostra de blastômero ou trofotoderma deve ser lavada nas 3 primeiras gotas de cada fileira na placa de lavagem. Encha o capilar com solução de lavagem limpa da gota grande cada vez que a amostra for aspirada. Coloque a amostra na gota de 10 µL de lavagem e descarte a solução restante no capilar antes de recarregá-la com solução limpa.
7. Ao chegar na 3ª gota, repita o processo de carregamento da solução limpa no capilar, aspire a amostra e introduza-a no tubo de PCR, carregando-a sob o microscópio nos 2,5 µL depositados no fundo do tubo. O embriologista deve visualizar sob o microscópio como a biópsia sai no tubo. Este passo é um ponto chave do procedimento e a biópsia deve ser liberada no tubo com o volume mínimo de solução de lavagem (máximo de 1,5 µL).
8. A quarta gota em cada fileira é reservada para a verificação do capilar, caso a amostra não tenha sido vista saindo para o tubo de PCR. Caso a biópsia apareça na 4ª gota, descarte o tubo de PCR onde a biópsia deveria ter sido inserida e carregue a amostra em um novo tubo de PCR recém-identificado.
9. À medida que as amostras são coletadas, elas são colocadas na rack fria e a folha de biópsia é preenchida da mesma maneira em que as amostras foram identificadas nos tubos de PCR. Esta folha será enviada com as amostras para a Igenomix.

10. Para casos de PGT-M, é solicitado um espaço em branco por embrião para biópsias de trofotoderma, para realizar um controle branco por embrião. Para PGT-M não deve ser realizado biópsia de blastômero (D3).
11. Para o PGT-A e PGT-SR, é recomendável enviar um branco por caso.
12. Obtenção do espaço em branco: após liberar a biópsia no tubo de PCR e verificar se não foi deixada no capilar, aspire com o mesmo capilar uma pequena quantidade de meio de lavagem da última gota em que a biópsia foi depositada e introduza-a em um novo tubo identificado como branco ou controle.
13. Feche os tubos firmemente e coloque-os dentro da rack.
14. Coloque o rack refrigerado com todas as amostras dentro do freezer (-20°C) por pelo menos uma hora antes do envio. Se as amostras forem enviadas em outro dia que não a biópsia, é recomendável manter a rack com as amostras a -20°C até o embarque.

Nota: Tanto para sobras quanto para soluções inutilizáveis (restos líquidos de solução para lavagem e loading), bem como para recipientes vazios (recipientes para soluções de lavagem e carregamento) Igenomix recomenda entrar em contato com empresas de gestão de resíduos autorizadas para gerenciamento de resíduos serviços médicos e sempre em conformidade com os regulamentos legais em vigor no país/região onde foi realizado.

Para qualquer dúvida, entre em contato com labbrasil@igenomix.com.