

Инструкция по приготовлению наборов для забора и транспортировки материала для инвазивного ПГТ

1. Лаборатория предоставляет клинике ЭКО штатив и пробирки с буфером для отмывки материала биопсии и его хранения:
 - 2 пробирки с 0.2 мл буфера (для **отмывки** образца),
 - Пробирки для ПЦР (объем 0.2 мл), в каждой пробирке находится 2 мкл буфера, готового для использования (для **транспортировки** образца)

ИЛИ

- Пустые стерильные пробирки объемом 0.2 мл и отдельно пробирка(и) с 0.2 мл буфера (для **транспортировки** образца).



Пробирка(и) хранится Заказчиком при температуре не выше -20°C.

2. Клиника ЭКО собирает в предоставленные пробирки материал биопсии, а также контроль к каждому образцу (проба среды из последней отмывочной капли).
3. Клиника тщательно маркирует образцы и заполняет сопроводительную документацию.
4. Транспортировка.
5. Выполнение анализа ПГТ.
6. Интерпретация результатов и предоставление заключения в клинику ЭКО.

Важно помнить, что для биопсии подходят только эмбрионы хорошего качества. Если эмбрион не подходит для переноса и заморозки, он не подходит для биопсии.

Правила маркировки образцов для инвазивного ПГТ

1. На крышке пробирки должен быть указан номер образца. Допустимо перед номером указывать префикс "Т".
2. Сбоку пробирки укажите фамилию и инициалы пациента и номер образца (См. рисунок 1). Если пробирки маркируются с помощью наклейки, расположите ее под крышкой и не используйте слишком широкую.
3. Контроли для каждого образца промаркируйте аналогичным образом, но перед номером укажите "К" (См. рисунок 2).
4. Если одновременно со сбором среды делается биопсия трофэктордермы, нумерация должна совпадать для неинвазивного образца и цельного/биоптируемого эмбриона, от которого был взят неинвазивный образец.
5. Маркировка для каждого образца должна указываться в направлении с описанием образцов, которое передают в лабораторию "Геномед" вместе с каждой партией образцов.

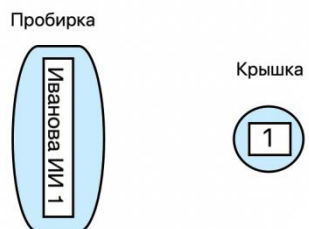


Рисунок 1. Образец подписи пробирки с образцом

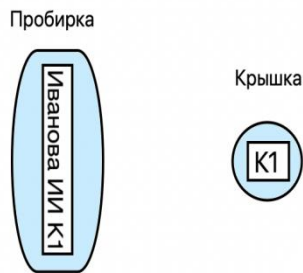


Рисунок 2. Образец подписи пробирки с контролем

Рисунок 3. Образец подписи штатива

Меры для предотвращения контаминации при промывке и переносе клеток в пробирку

- Все этапы выполняются в ламинарном шкафу.
- Оператор должен быть в халате, шапочке, маске и в чистых стерильных перчатках. Важно, чтобы перчатки подходили по размеру, плохо прилегающие перчатки увеличивают риск контаминации.
- При малейшем подозрении на загрязнение, средства защиты необходимо сменить.
- При работе с пробирками соприкоснуться перчатками можно **только** с наружной частью пробирки, исключить соприкосновение с внутренними поверхностями стенок и крышек.
- Пробирки должны находиться открытыми минимальное количество времени, **не допускается** открытие нескольких пробирок одновременно.

Промывка и перенос клеток в пробирку:

Внимание! Обязательно перед работой храните транспортировочный штатив в морозильной камере для поддержания его низкой температуры. Очень важно переносить образцы в пробирки, которые находятся в холодном штативе.

- В ламинарном шкафу достать необходимое количество стерильных чашек Петри (по одной на каждый образец). Подписать чашку и крышку уникальным кодом образца (имя пациента и номер эмбриона).
- Достать необходимое количество предоставленных лабораторией ПЦР пробирок (количество образцов x2, для исследуемого образца и контрольного образца среды).
- Поставить пробирки вертикально в штатив и оставить при комнатной температуре на 5-10 минут (до полного размораживания буфера), либо разморозить пробирку с 0.2 мл буфера и разаликвотить в пробирки 0.2 мл по 2 мкл буфера в каждую пробирку.
- Центрифугировать пробирки 40-60 секунд при максимальных оборотах на центрифуге типа «Мини-спин» для полного осаждения содержимого на дно пробирки.
- Произвести маркировку пробирок идентично маркировке на чашках Петри с дополнительной пробиркой для контрольного образца среды для каждого образца.

Внимание! Во время процедуры пробирки должны находиться в холодном штативе.

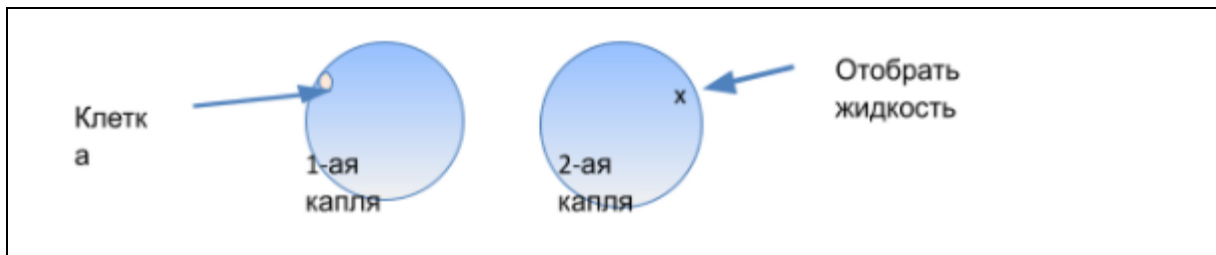
Внимание! При переносе клеток для промывки необходимо убедиться, что код образца на чашке Петри соответствует коду пациента.

- В чашку Петри нанести 3 капли буфера для отмывки (20 мкл)



- Поместить емкость с клетками для исследования под микроскоп.
- Промыть носик капилляра промывочным буфером
- Набрать небольшое количество (до 5 мм длины капилляра) буфера в капилляр
- Под контролем микроскопа обмыть клетку в буфере из капилляра

- Под контролем микроскопа отобрать клетку (в минимальном объеме среды) в капилляр



- Поместить клетку в 1-ую каплю буфера для промывки в чашке Петри (необходимо добиться, чтобы в каплю попало минимально возможное количество среды)
- Промыть капилляр буфером из 2-ой капли.
- Отобрать небольшой объем буфера из 2-ой капли в капилляр
- Отобрать клетку из 1-ой капли и переместить ее во 2-ую.
- Промыть капилляр буфером из 3-ей капли.
- Отобрать небольшой объем буфера из 3-ей капли в капилляр
- Отобрать клетку из 2-ой капли и переместить ее в 3-ю.
- Отобрать каплю в 3-ей капле в минимальном объеме буфера.
- Взять пробирку из транспортировочного набора с 2 мкл буфера, держать ее вертикально.
- Открыть крышку пробирки.
- Поместить капилляр с клеткой в пробирку, не касаясь стенок.
- Выпустить содержимое капилляра с клеткой на дно пробирки в 2 мкл буфера.
- Достать капилляр.
- **Незамедлительно** плотно закрыть крышку пробирки.
- Центрифугировать пробирки 40-60 секунд при максимальных оборотах на центрифуге типа «Мини-спин» для полного осаждения содержимого на дно пробирки.
- Убрать пробирку в холодный штатив.

Внимание! Убедиться, что коды образца совпадают на чашке Петри и пробирке.

Внимание! Количество среды в которой промывались клетки при переносе в пробирку должно быть минимальным.

Для каждого из исследуемых эмбрионов подготовить отрицательный контроль:

- Из каждой капли, где находились blastomeres после биопсии, внести от 1 до 2 мкл (примерно четверть объема иглы «стриппера») среды.

- **Незамедлительно** плотно закрыть крышку пробирки.
- Центрифугировать пробирки 40-60 секунд при максимальных оборотах на центрифуге типа «Мини-спин» для полного осаждения содержимого на дно пробирки.
- Готовые к транспортировке пробирки помещаются в предварительно охлажденный штатив с крышкой в чистом Zip-lock пакете и замораживаются.

Транспортировка

1. Упаковка и подготовка штатива для ПГТ для транспортировки:
2. При транспортировке курьерской службой с поддержанием температурного режима (курьер приезжает с подготовленным термоконтейнером):
 - Поместить штатив в два зип-пакета, для обеспечения их сохранности и исключения контаминации.
 - Поверх зип-пакетов обмотать штатив в два слоя воздушно-пузырчатой пленкой и зафиксировать ее скотчем.

Внимание!К грузу недопустимо прикрепление хладоэлементов или посторонних предметов.

- a. При транспортировке курьерской службой без поддержания температурного режима (курьер приезжает без термоконтейнера):
 - Проморозить красные хладоэлементы МХД-2 до состояния льда в морозильной камере с температурой ниже -24
 - Поместить штатив в два зип-пакета, для обеспечения их сохранности и исключения контаминации.
 - Поверх зип-пакетов обмотать штатив в два слоя воздушно-пузырчатой пленкой и зафиксировать ее скотчем.
 - Поместить штатив в термоконтейнер и обложить со всех сторон красными хладоэлементами МХД-2 в количестве не менее 6 шт.

Внимание!К грузу недопустимо прикрепление хладоэлементов или посторонних предметов.

1. Приложить к пробиркам копию сопроводительного документа с указанием фамилии пациента, возраста, даты пункции, количества оплодотворившихся и биопсированных эмбрионов, оригинал информированного согласия на проведение ПГТ (подписанного пациентами(ом) и лечащим врачом, направление клиники, содержащее ФИО пациентки(ов), дату направления и подписанное лечащим врачом с указанием типа диагностируемой патологии.

2. Доставка наборов для ПГТ Заказчику осуществляется силами и средствами Исполнителя по предварительной (не менее чем за три дня) заявке Заказчика до даты планируемого проведения ПГТ.
3. Необходимо исключить сильную тряску и переворачивание образцов во время транспортировки, о чем следует сообщить курьерской службе.
4. Необходимо иметь возможность связи со службой доставки на всем ее протяжении и предусмотреть ответственность за порчу и повреждение образцов во время доставки.

СРЕДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ ДЛЯ niPGT

Неинвазивное преимплантационное тестирование (niPGT) подразумевает использование неинвазивных образцов – среды культивирования эмбрионов содержащей ДНК клеток, высвобождаемую эмбрионом в среду культивирования.

Для тестирования подходит любая среда для культивирования (производителей Vitrolife, Origio, Sage, Global и др.).

Допускается схема группового культивирования эмбрионов до 3/4 дня культивирования, после чего каждый эмбрион должен культивироваться отдельно вплоть до сбора образцов для исследования.

Допускается схема с заменой среды для культивирования эмбрионов (на 3/4 день культивирования или ранее).

Использование ИКСИ для оплодотворения является рекомендованным методом (необязательным), так как уменьшает риски контаминации материала.

Внимание! Эмбрион должен культивироваться в среде не менее 24 часов перед ее забором для исследования.

Внимание! Необходимо максимальное очищение эмбриона от клеток кумулюса.

Внимание! Образцы среды для культивирования эмбрионов должны быть собраны незамедлительно после переноса эмбриона из среды культивирования и заморожены при -20°C.

Подготовка к забору биоматериала. Процедура взятия биологического материала:

Очистка кумулюса, культивирование эмбрионов, смена среды

1. Перед процедурой ИКСИ очистите ооциты от кумулюсных клеток как можно лучше (рис 1). Допускаются физические (с использованием стрипперов), химические (растворы с гиалуронидазой) или комбинированные методы.
2. Замените среду в день, когда это предусмотрено используемым протоколом. При замене среды оцените наличие клеток кумулюса во внеклеточном гликокаликсе окружающем эмбрион (zona pellucida). Если остаются клетки кумулюса их необходимо удалить (рис. 2). Если протокол предполагает две замены среды, то проделайте процедуру оценки наличия клеток кумулюса и их удаление при каждой смене среды.

3. При однократной смене среды рекомендуется заменять среду для культивирования эмбриона именно на 4 день культивирования. Это способствует лучшему очищению от оставшихся клеток кумулюса. Заморозка и разморозка (криопрезервация) эмбрионов до сбора неинвазивных образцов способствует лучшему очищению от клеток кумулюса.

4. Когда бластоциста разовьется до стадии 4 (обычно D5 / D6, 4BC), соберите культуральную жидкость.

Внимание! Свяжитесь с нами для адаптации используемого в вашей клинике протокола культивирования для сбора культуральной среды

Рисунок 1: Ооцит с остаточными кумулюсными клетками (слева), правильно очищенный ооцит без кумулюса (справа)

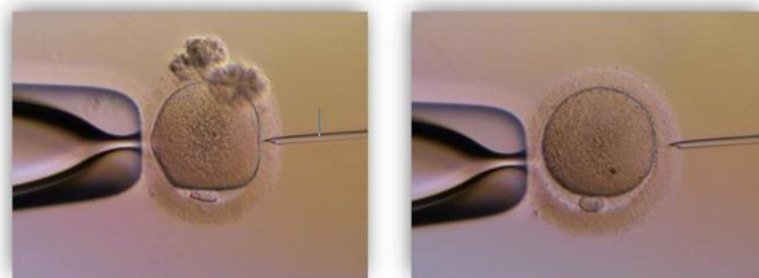
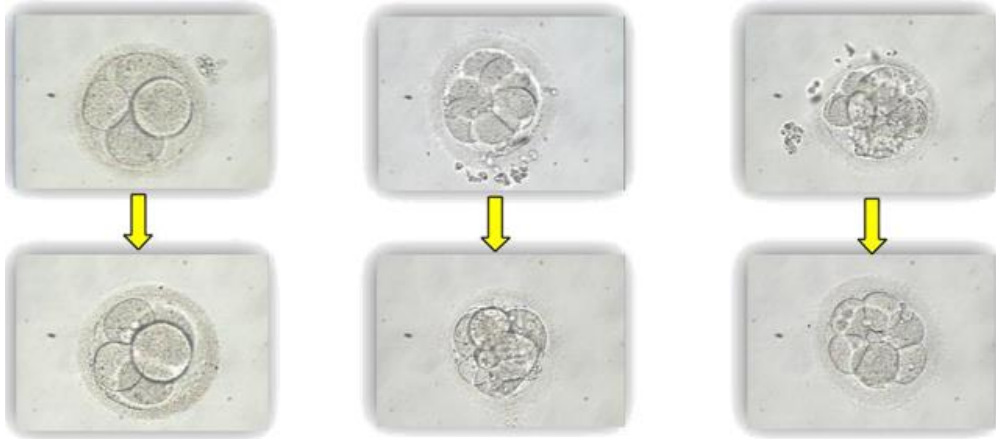


Рисунок 3. Эмбрионы с остаточными клетками кумулюса на 3 день культивирования



Рисунок 4. Эмбрионы, очищенные от клеток кумулюса



Рекомендовано собрать весь объем среды (объем культивирования ≤ 30 мкл; минимальный и рекомендуемый объем 20 мкл, для замороженных эмбрионов 10-15 мкл среды) в стерильные 0,2 мл пробирки для ПЦР. Сбор образцов допустимо проводить при комнатной температуре или на холодном штативе/льду.

Внимание! После сбора образцы должны быть незамедлительно заморожены при -20°C .

Внимание! Необходимо использовать новый чистый наконечник для сбора каждой аликвоты каждого образца.

Внимание! Перед началом сбора образцов держать пробирки закрытыми. Не открывать несколько пробирок одновременно при сборе образцов.

5. Подготовьте пробирки объемом 0,2 мл для сбора образцов, полученные от лаборатории «Геномед».

6. Промаркируйте пробирку/пробирки в соответствии с требованиями маркировки ниже.

По возможности поместите пробирки на $+4^{\circ}\text{C}$ или сразу на -20°C .

7. Новым чистым наконечником перенесите 20 мкл образца на дно 0,2 мл пробирки.

Осадить содержимое на дно пробирки быстрым центрифугированием (не вортексировать).

Поместить пробирку на -20°C .

Повторите для сбора всех образцов.

После сбора все пробирки с образцами должны быть замороженными до ожидания курьера лаборатории.

Правила маркировки образцов для неинвазивного ПГТ

1. На крышке пробирки должен быть указан номер образца префикс "NI".
2. Сбоку пробирки укажите фамилию и инициалы пациента и номер образца. Если пробирки маркируются с помощью наклейки, расположите ее под крышкой и не используйте слишком широкую.
3. Нумерация эмбрионов (независимо, цельных или биоптируемых) должна быть сквозной внутри каждой партии.
4. Если одновременно со сбором среды делается биопсия трофэктордермы, нумерация должна совпадать для неинвазивного образца и цельного/биоптируемого эмбриона, от которого был взят неинвазивный образец.
5. Маркировка для каждого образца должна указываться в направлении с описанием образцов, которое передают в лабораторию "Геномед" вместе с каждой партией образцов.