Polar body and Embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening

M. Ghaffari Novin
MD,PhD
Professor of shahid Beheshti University of Medical Sciences

The Road to Clinically Effective Preimplantation Genetics

1937

John Rock, MD
"According to Specifications"

1967

Robert Edwards, PhD
"Sexing Rabbit Blastocysts"

1986

Leeanda Wilton, PhD
"Cleavage Bx"

1987

Marilyn Monk
Murine Model
PGD Lesch-Nyhan

1988

Yury Verlinsky, PhD
"PB Biopsy"

1988

Audrey Muggleton-Harris, PhD
"Blastocyst Bx"

1989

Elena Kontogianni, PhD
"PCR of Y in single blastomeres"

1990

Alan Handyside, PhD
Successful Clinical PGD for X Linked Disorders

1993

Santiago Munne, PhD
First FISH PGD

2008

Nathan Treff, PhD
Validated 24 Chr .Platform

2013

Eric Forman, MD
Enhanced Safety, Reduced Cost

PGD

- For patients at high risk of transmitting a genetic abnormality to their children, which includes all monogenic defects
  - autosomal recessive,
  - autosomal dominant
  - and X-linked disorders
- Carriers of balanced translocations, which are at high risk of implantation failure and recurrent abortions.

Preimplantation genetic screening (PGS)

- For infertile patients undergoing IVF with the aim of increasing the IVF pregnancy and delivery rates.
  - Advanced maternal age,
  - Repeated implantation failure,
  - Severe male factor
  - Couples with normal karyotypes who have experienced repeated miscarriages.

Examination Report

Patient 101

Last Name: 5444
First Name:
Date of Birth: 1/1/1970
Code: 3594

Avesina Infertility Clinic
Embryology Lab
No.110, Bahonar(Niavaran) St. Tehran, Iran.
Tel. +98 (21) 22835020-(10 Line)
Fax +98 (21) 22835021

Examination-ID 779

Examiner Dr.ghaffari

Lab embryology Lab

Date 11/24/2007

Image #1

Timestamp

11/24/2007 9:48:44 AM

Comment

تاریخ: ۱۳۹۴/۱۰/۱۱
شماره پرونده: ۸۵۲۲۲۰۷

همکار ارجمند جناب آقای دکتر غفاری
با سلام

احتراماً به استحضار می رساند که بررسی مولکولی صورت گرفته بر روی بلاستومرهای تحویلی از رویان های خانم ل ی در تاریخ ۹۴/۱۰/۱۰ با روش تعیین توالی (Sequencing) و STR وابسته به ژن های بتا گلوبین برای بررسی وضعیت بیماری (بتا تالاسمی) و کروموزوم های ۱۳-۱۸-۲۱- X برای بررسی آنیوپلوئیدی نشان دهنده نتایج زیر می باشد:

۱- **بلاستومر یک:** پسر و از نظر اختلالات کروموزومی شایع (تریزومی ها) سالم و از نظر بیماری تالاسمی نیز سالم
۲- **بلاستومر دو:** دختر و احتمالا مبتلا به سندروم ترنر می باشد (فقط کروموزوم ایکس پدر را دریافت کرده است) و از نظر تالاسمی مبتلا
۳- **بلاستومر سه:** پسر و از نظر اختلالات کروموزومی شایع (تریزومی ها) سالم و از نظر بیماری تالاسمی مبتلا
۴- **بلاستومر چهار:** پسر و از نظر اختلالات کروموزومی شایع (تریزومی ها) سالم و از نظر تالاسمی مبتلا یا ناقل (از نظر تعیین توالی ناقل ولی از نظر STR ها دارای کراس اور بوده لذا نمی توان با قطعیت وضعیت بیماری را مشخص کرد)
۵- **بلاستومر پنج:** پسر و از نظر اختلالات کروموزومی شایع (تریزومی ها) سالم و از نظر تالاسمی مبتلا یا ناقل (از نظر تعیین توالی ناقل ولی از نظر STRها دارای کراس اور بوده لذا نمی توان با قطعیت وضعیت بیماری را مشخص کرد)
۶- **بلاستومر شش:** جنسیت نا مشخص و از نظر کروموزومی دارای سه کروموزوم از هر یک (تریپلوئیدی) و از نظر تالاسمی مبتلا
۷- **بلاستومر هفت:** پسر و از نظر اختلالات کروموزومی شایع (تریزومی ها) سالم غیر از کروموزوم ۱۳ که وضعیت نامشخص است و از نظر تالاسمی مبتلا
۸- **بلاستومر هشت:** دختر و احتمالا مبتلا به سندرم ترنر می باشد (و مونوزومی کروموزم ۱۱) و از نظر تالاسمی سالم

از نظر این مرکز فقط رویان شماره یک قابل انتقال می باشد. در ضمن در صورت انتقال رویان های شماره ۴ و ۵ حتما می بایست تشخیص قبل از تولد صورت گیرد.

لذا با توجه به درخواست خانواده (خانم و آقای عبد انی) در خصوص انتقال زیگوت ها و یا نگهداری آنها تصمیم گیری مناسب صورت گیرد. لازم به ذکر است در پی موافقت کتبی خانواده هنگام مشاوره PGD، در صورت بارداری زوج می بایست بین هفته ۱۲-۱۰ جهت تایید نتایج این تشخیص اقدام به نمونه گیری از جنین و انجام تشخیص قبل از تولد (PND) نمایند؛ در غیر این صورت هیچ گونه مسئولیتی به عهده این آزمایشگاه نمی باشد.

Test performed by
Sh.Younesi Khah
Lab Technician

Confirmed by S. Zeinali (PhD)
Medical Geneticist
Laboratory Director
دکتر سیروس زینلی
متخصص ژنتیک پزشکی

It is of outmost importance for all clinicians involved in the care of families requesting PGD (preimplantation genetic diagnosis), and the families themselves to be aware of the risk of errors in DNA analysis. Incorrect diagnosis may result from (1) Incorrect laboratory data and clinical diagnosis for the disease tested (2) Incomplete family studies and history (3) Mix-up of DNA or blood samples from the parents or the cells provided to us by the IVF center, both in transportation or in the lab (4) Cell mix-up in the IVF center (5) Cell/s transfer to the mother in the IVF center (6) Wrong cells being removed and thawed after freezing after PGD molecular report (7) New or spontaneous mutations (8) Rare molecular events (9) Unprotected intercourse after cell transfer particularly when normal pregnancy is not a problem (10) Technical errors.
The risk of error from DNA recombination in diagnosis by polymorphism is approximately 0.3%. The risk of error from the various reasons mentioned above and several other factors is approximately 0.5% whereas the chances of technical error of all types of DNA analysis are estimated to be 0.5%. Since verification of some of the above errors or problems cannot be easily verified the family accepts the PGD outcome and does not make the lab responsible.

Sh.۲

عضو شبکه مراکز تشخیص پیش از تولد کشور
ناقلین و قبل از تولد طیف وسیعی از بیماریهای ژنتیکی، سرطان سینه، کاریوتایپ و کاریوتایپ جنین، تشخیص سریع اختلالات کروموزومی دوره بارداری، تعیین هویت و (D
لاعات بیشتر به سایت آزمایشگاه مراجعه نمایید: www.medicalgeneticslab.ir تماس الکترونیکی: info@medicalgeneticslab.ir & @kawsar.ir
: خیابان ولیعصر، بین خیابان فاطمی و مطهری، خیابان مجلسی، پلاک ۴۱ کدپستی: ۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳ تلفن: ۸۸۹۳۹۱۴۰ (۶ خط)

آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی

Medical Genetics Laboratory of Dr. Zeinali

عضو شبکه آزمایشگاههای ژنتیک کشور

تاریخ: ۹۴/۰۹/۲۵

شماره پرونده: ۳۹۳۲۱۲۲۱

همکار ارجمند جناب آقای دکتر غفاری

با سلام

احتراماً به استحضار می رساند که بررسی مولکولی صورت گرفته بر روی بلاستومرهای تحویلی از زیگوت های خانم [redacted] **واه** در تاریخ ۹۴/۰۹/۲۴ با روش STR وابسته به کروموزوم X برای تعیین وضعیت بیماری (هموفیلی A) و تعیین جنسیت نشان دهنده نتایج زیر می باشد:

۱- **بلاستومر یک: پسر و مبتلا**

۲- **بلاستومر دو: پسر و مبتلا**

۳- **بلاستومر سه: پسر و مبتلا**

۴- **بلاستومر چهار:پسر و مبتلا**

۵- **بلاستومر پنج: دختر و غیر ناقل**

۶- **بلاستومر شش: پسر و مبتلا**

۷- **بلاستومر هفت: دختر و ناقل**

۸- **بلاستومر هشت:پسر و مبتلا**

از نظر این مرکز رویان های شماره پنج و هفت قابل انتقال می باشند زیرا مبتلا نیستند.

لذا با توجه به درخواست خانواده (خانم **زهر**[redacted] و آقای **محمد** [redacted]) در خصوص انتقال زیگوت ها و یا نگهداری آنها تصمیم گیری مناسب صورت گیرد. لازم به ذکر است در پی موافقت کتبی خانواده هنگام مشاوره PGD در صورت بارداری زوج می بایست بین هفته ۱۲-۱۰ جهت تایید نتایج این تشخیص اقدام به نمونه گیری از جنین و انجام تشخیص قبل از تولد (PND) نمایند؛ در غیر این صورت هیچ گونه مسئولیتی به عهده این آزمایشگاه نمی باشد.

Test performed by
Sh. Younesi Khah
Lab Technician

Confirmed by: S. Zeinali (PhD)
Medical Geneticist
Laboratory Director

It is of outmost importance for all clinicians involved in the care of families requesting PGD (preimplantation genetic diagnosis), and the families themselves to be aware of the risk of errors in DNA analysis. Incorrect diagnosis may result from (1) Incorrect laboratory data and clinical diagnosis for the disease tested (2) Incomplete family studies and history (3) Mix-up of DNA or blood samples from the parents or the cells provided to us by the IVF center, both in transportation or in the lab (4) Cell mix-up in the IVF center (5) Cell/s transfer to the mother in the IVF center (6) Wrong cells being removed and thawed after freezing after PGD molecular report (7) New or spontaneous mutations (8) Rare molecular events (9) Unprotected intercourse after cell transfer particularly when normal pregnancy is not a problem (10) Technical errors.
The risk of error from DNA recombination in diagnosis by polymorphism is approximately 0.3%. The risk of error from the various reasons mentioned above and several other factors is approximately 0.5% whereas the chances of technical error of all types of DNA analysis are estimated to be 0.5%. Since verification of some of the above errors or problems cannot be easily verified the family accepts the PGD outcome and does not make the lab responsible.

Sh.Y

عضو شبکه مراکز تشخیص پیش از تولد کشور

س ناقلین و قبل از تولد طیف وسیعی از بیماریهای ژنتیکی، سرطان سینه، کاریوتایپ و کاریوتایپ جنین، تشخیص سریع اختلالات کروموزومی دوره بارداری، تعیین هویت و (PGD)

اطلاعات بیشتر به سایت آزمایشگاه مراجعه نمایید: www.medicalgeneticslab.ir تماس الکترونیکی: info@kawsar.ir & info@medicalgeneticslab.ir

: خیابان ولیعصر، بین خیابان فاطمی و مطهری، خیابان مجلسی، پلاک ۴۱ کدپستی: ۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳ تلفن: ۸۸۹۳۹۱۴۰ (۶ خط)

بسمه تعالی

آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی

Medical Genetics Laboratory of Dr. Zeinali

عضو شبکه آزمایشگاههای ژنتیک کشور

اصلاحیه

تاریخ: ۹۴/۰۹/۲۲

شماره پرونده: ۳۹۳۲۰۵۵۵

همکار ارجمند جناب آقای دکتر غفاری

با سلام

احتراماً به استحضار می رساند که بررسی مولکولی بر روی بلاستومرهای تحویلی از زیگوت های خانم [redacted] مورخ ۹۴/۰۹/۲۱ با روش تعیین توالی (Sequencing) و STR وابسته به ژن FANCG برای بررسی وضعیت بیماری و کروموزوم ۶ برای تعیین وضعیت HLA typing بلاستومرها صورت گرفت که نتایج به قرار زیر می باشد:

۱- **بلاستومر یک:** از نظر بیماری سالم و از نظر HLA نیمه سازگار با مادر

۲- **بلاستومر دو:** از نظر بیماری مبتلا و از نظر HLA نیمه سازگار با مادر

۳- **بلاستومر سه:** از نظر بیماری ناقل و از نظر HLA نیمه سازگار با مادر

۴- **بلاستومر چهار:** فاقد هسته کامل و از نظر HLA احتمالا سازگار

۵- **بلاستومر پنج:** فاقد هسته

۶- **بلاستومر شش:** از نظر بیماری مبتلا و از نظر HLA نیمه سازگار با پدر

۷- **بلاستومر هفت:** فاقد هسته

۸- **بلاستومر هشت:** فاقد هسته کامل و از نظر HLA احتمالا سازگار

۹- **بلاستومر نه:** از نظر بیماری ناقل و از نظر HLA ناسازگار

۱۰- **بلاستومر ده:** وضعیت نامشخص بوده و واجد هسته ناقص می باشد (احتمالا از نظر بیماری ناقل و احتمالا از نظر HLA سازگار)

۱۱- **بلاستومر یازده:** از نظر بیماری سالم و از نظر HLA نیمه سازگار با پدر

۱۲- **بلاستومر دوازده:** فاقد هسته

۱۳- **بلاستومر سیزده:** فاقد هسته

از نظر این مرکز رویان شماره ۱۰ قابل انتقال می باشد؛ در غیر این صورت هیچ سلول سالم دیگری از نظر HLA سازگار کامل نیست.

لذا با توجه به درخواست خانواده (خانم [redacted] و آقای [redacted]) در خصوص انتقال زیگوت ها و یا نگهداری آنها تصمیم گیری مناسب صورت گیرد.

لازم به ذکر است در پی موافقت کتبی خانواده هنگام مشاوره PGD، در صورت بارداری زوج می بایست بین هفته ۱۲-۱۰ بارداری جهت تایید نتایج این تشخیص اقدام به نمونه گیری از جنین و انجام تشخیص قبل از تولد (PND) نمایند؛ در غیر این صورت هیچ گونه مسئولیتی به عهده این آزمایشگاه نمی باشد.

* سلول شماره ۱۰ نتایج خیلی خوبی را نشان نمی دهد ولی احتمالا می توان اعلام کرده که سلول ناقل و از نظر HLA سازگار می باشد ولی در صورت انتقال قطعا لازم است در دوره بارداری جنین مورد آزمایش قرار گیرد. همچنین با مشورت متخصص پیوند مغز استخوان شاید سلول های ۱ و ۳ نیز قابل انتقال باشند.

Test performed by
S. Sabeghi
Lab Technician

Confirmed by: S. Zeinali (PhD)
Medical Geneticist
Laboratory Director

دکتر سیروس زینلی
متخصص ژنتیک پزشکی
۱۴۶۲ - ۲

It is of outmost importance for all clinicians involved in the care of families requesting PGD (preimplantation genetic diagnosis), and the families themselves to be aware of the risk of errors in DNA analysis. Incorrect diagnosis may result from (1) Incorrect laboratory data and clinical diagnosis for the disease tested (2) Incomplete family studies and history (3) Mix-up of DNA or blood samples from the parents or the cells provided to us by the IVF center, both in transportation or in the lab (4) Cell mix-up in the IVF center (5) Cell/s transfer to the mother in the IVF center (6) Wrong cells being removed and thawed after freezing after PGD molecular report (7) New or spontaneous mutations (8) Rare molecular events (9) Unprotected intercourse after cell transfer particularly when normal pregnancy is not a problem (10) Technical errors.
The risk of error from DNA recombination in diagnosis by polymorphism is approximately 0.3%. The risk of error from the various reasons mentioned above and several other factors is approximately 0.5% whereas the chances of technical error of all types of DNA analysis are estimated to be 0.5%. Since verification of some of the above errors or problems cannot be easily verified the family accepts the PGD outcome and does not make the lab responsible.

S.S

عضو شبکه مراکز تشخیص پیش از تولد کشور

بسمه تعالی

آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی

Medical Genetics Laboratory of Dr. Zeinali

عضو شبکه آزمایشگاههای ژنتیک کشور

شماره پرونده: ۳۹۳۲۱۷۸۴
تاریخ: ۹۴/۰۹/۱۵

همکار ارجمند جناب آقای دکتر غفاری
با سلام

احتراماً به استحضار می رساند که بررسی مولکولی صورت گرفته بر روی بلاستومرهای تحویلی از زیگوت های خانم اف[redacted]ر در تاریخ ۹۴/۰۹/۱۴ با روش STR وابسته به کروموزوم X برای تعیین وضعیت بیماری و تعیین جنسیت نشان دهنده نتایج زیر می باشد:

۱- **بلاستومر یک: فاقد هسته می باشد.**
۲- **بلاستومر دو: پسر و مبتلا می باشد.**
۳- **بلاستومر سه: پسر و مبتلا می باشد.**
۴- **بلاستومر چهار: دختر و سالم (غیر ناقل) می باشد.**
۵- **بلاستومر پنج: پسر و سالم می باشد.**
۶- **بلاستومر شش: دختر و سالم (غیر ناقل) می باشد.**
۷- **بلاستومر هفت: پسر و مبتلا می باشد.**
۸- **بلاستومر هشت: پسر و مبتلا می باشد.**

از نظر این مرکز رویان های شماره چهار، پنج و شش قابل انتقال می باشند.

لذا با توجه به درخواست خانواده (خانم اف[redacted]ر و آقای احم[redacted]) در خصوص انتقال زیگوت ها و یا نگهداری آنها تصمیم گیری مناسب صورت گیرد. لازم به ذکر است در پی موافقت کتبی خانواده هنگام مشاوره PGD در صورت بارداری زوج می بایست بین هفته ۱۲-۱۰ جهت تایید نتایج این تشخیص اقدام به نمونه گیری از جنین و انجام تشخیص قبل از تولد (PND) نمایند؛ در غیر این صورت هیچ گونه مسئولیتی به عهده این آزمایشگاه نمی باشد.

Test performed by
Sh. Younesi Khah
Lab Technician

Confirmed by: S. Zeinali (PhD)
Medical Geneticist
Laboratory Director

It is of outmost importance for all clinicians involved in the care of families requesting PGD (preimplantation genetic diagnosis), and the families themselves to be aware of the risk of errors in DNA analysis. Incorrect diagnosis may result from (1) Incorrect laboratory data and clinical diagnosis for the disease tested (2) Incomplete family studies and history (3) Mix-up of DNA or blood samples from the parents or the cells provided to us by the IVF center, both in transportation or in the lab (4) Cell mix-up in the IVF center (5) Cell/s transfer to the mother in the IVF center (6) Wrong cells being removed and thawed after freezing after PGD molecular report (7) New or spontaneous mutations (8) Rare molecular events (9) Unprotected intercourse after cell transfer particularly when normal pregnancy is not a problem (10) Technical errors.
The risk of error from DNA recombination in diagnosis by polymorphism is approximately 0.3%. The risk of error from the various reasons mentioned above and several other factors is approximately 0.5% whereas the chances of technical error of all types of DNA analysis are estimated to be 0.5%. Since verification of some of the above errors or problems cannot be easily verified the family accepts the PGD outcome and does not make the lab responsible.

Sh.Y

الف) عنوان دقیق خدمت مورد بررسی (فارسی و لاتین):

عنوان فارسی خدمت:

بیوپسی میکروسکوپی گویچهٔ قطبی تخمک یا بلاستومر جنین، به منظور تشخیص ژنتیکی قبل از لانه‌گزینی، کمتر یا مساوی پنج تخمک/ جنین

عنوان لاتین:

Biopsy; oocyte polar body or embryo blastomere, Microtechnique (for pre-implantation genetic diagnosis) less than or equal to ۵ embryos/oocytes

کدینگ بین المللی: ۸۹۲۹۰

دیگر عناوین: در صورت وجود

کدملی	ویژگی کد	شرح کد	حرفه‌ای	فنی	ارزش پایه بیهوشی
810370	#*	PGDتعیین جنسیت تا سقف 4 جنین	40	110	0
810372	#*+	PGD تعیین جنسیت هر جنین اضافه	8	17	0
810374	#*	PGD برای بررسی ترانسلوکاسیون هر جنین حداکثر تا 8 جنین	20	55	0

Recommendations

- Genetic counselling must be provided by a certified genetic counsellor to ensure that patients fully understand the risk of having an affected child, the impact of the disease on an affected child, and the benefits and limitations of all available options for preimplantation and prenatal diagnosis.
- Invasive prenatal or postnatal testing to confirm the results of preimplantation genetic diagnosis is encouraged because the methods used for preimplantation genetic diagnosis have technical limitations that include the possibility of a false result.

- Aggressive stimulation
- Protected intercourse in order to avoid the risk of spontaneous
- Sign of informed consent

Laboratory issues relating to biopsy

- Until the time of biopsy, routine IVF culture conditions apply. It is usual to transfer embryos at the morula/ blastocyst stage following biopsy so the most adequate culture conditions in each embryology laboratory should be used.
- It is ‘recommended’ that an experienced embryologist (i.e. general embryology and micromanipulation of embryos) performs the biopsy procedure after appropriate training.

- The embryologist may also be trained in spreading cells for FISH and/or tubing cells for amplification-based PGD.
- Training for biopsy personnel should be documented. It is ‘recommended’ that at least 100 oocytes/embryos are successfully biopsied prior to clinical work resulting in the removal of 90% intact cells. Training for biopsy should be at least to the standard required for certification in routine embryology.

- It is ‘essential’ to ensure that an adequate labelling system is used to identify the cell number and the embryo from which it was biopsied and it is critical that all stages have appropriate and recorded witnessing.
- This must include documented matching of the cell and embryo after biopsy, of the cell and slide/tube during preparation and finally of the embryos recommended for transfer on the PGD report prior to embryo transfer.

- It is strongly ‘recommended’ that all cumulus cells are removed before biopsy as these cells can contaminate FISH and PCR diagnoses and lead to misdiagnosis.

Insemination

- ICSI is ‘recommended’ for all PCR cases to reduce the chance of paternal contamination from extraneous sperm attached to the zona pellucida or non-decondensed sperm within blastomeres.
- ICSI and conventional insemination are both ‘acceptable’ for FISH cases.

Embryo culture

1.9. Standard IVF culture conditions are 'acceptable' until the day of biopsy but following biopsy, the following 'recommendations' are made:

1.9.1. Appropriate culture medium and biopsy medium for oocytes/embryos should be used.

1.9.2. Biopsied oocytes and embryos must be cultured singly in individual drops or dishes with a clear identification system to ensure tracking of polar bodies or blastomeres removed and easy identification of oocytes and embryos post-diagnosis.

1.9.3. The use of culture wells instead of droplets would decrease the possible mixing of embryo in culture dishes due to possible movement of droplets during handling.

1.9.4. Oocytes and embryos are rinsed post-biopsy to remove traces of acid or biopsy medium as applicable.

The biopsy procedure

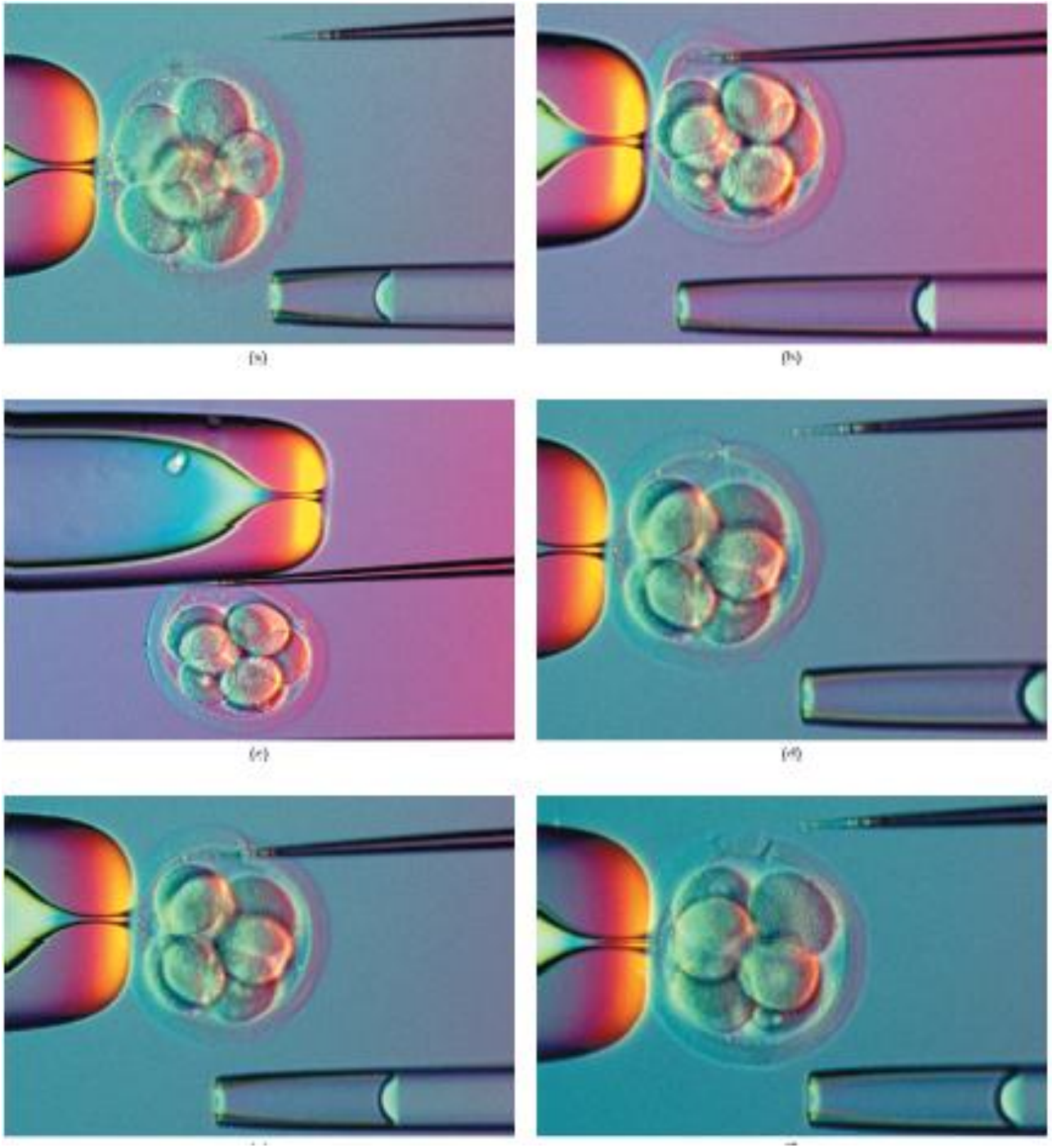
- Removal of one or two blastomeres at the cleavage stage
- Removal of several cells at the blastocyst stage.

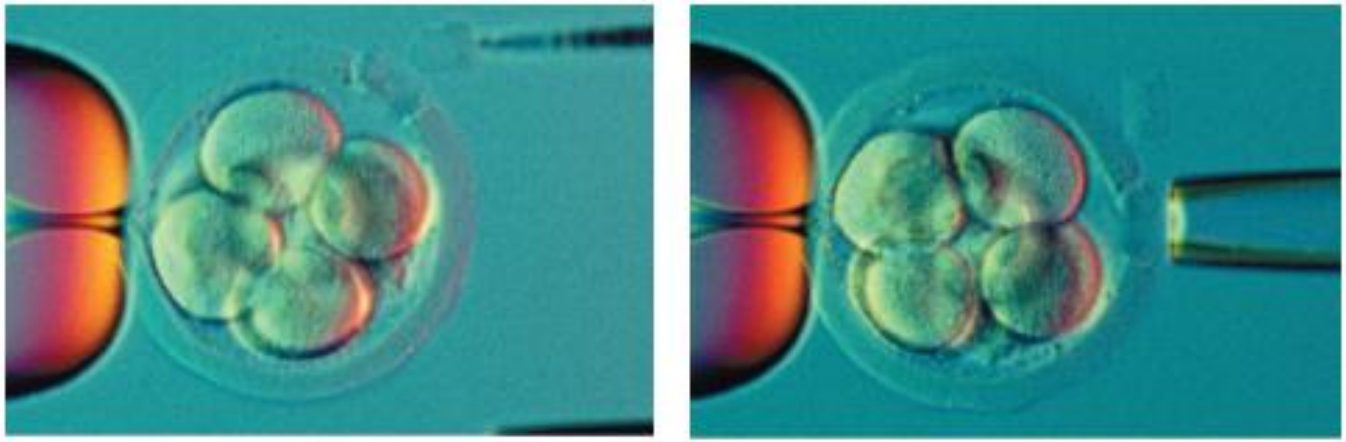
Zona breaching

Zona penetration method	Benefits	Limitations	Factors critical to success
Mechanical	Least invasive to embryo (safer) Inexpensive, portable technique Improved survival after freeze-thaw?	Steep learning curve Operator dependent Time consuming	Operator skill and speed Appropriate microtools needed Double tool holder optimal
Chemical (acidified tyrodes)	Relatively inexpensive Widespread clinical use Portable technique	Operator dependent Effect on cryopreservation Difficult to limit aperture size	Acidified tyrodes pH 2.2–2.4 Sensitive control of acid flow Rinsing acid from embryos Double tool holder optimal
Laser (1.48 μm non-contact)	Rapid and reproducible	Cost (30–60,000 US dollars)	Laser alignment and calibration
	Simple to use	Not all systems portable	Pulse number, location & duration
	Integrated archiving/analysis software	Invisible thermal damage/stress	Distance between laser and zona
			Appropriate training and validation

Cleavage stage biopsy

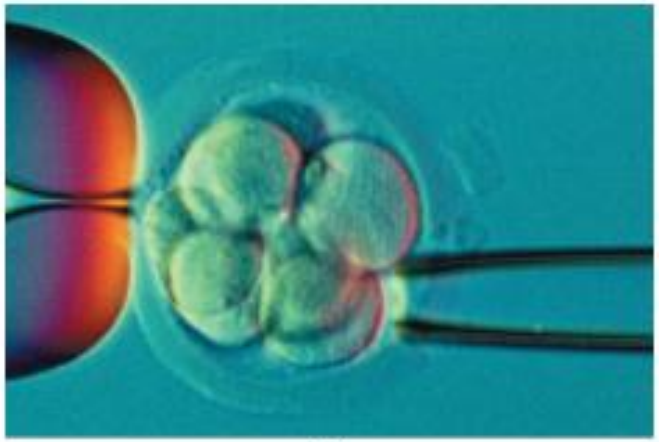
- Biopsy on the morning of Day 3 post-insemination is recommended' but the exact timing varies according to timings of procedures in different laboratories.
- It is 'acceptable' to exclude very poor quality embryos from the embryo biopsy procedure.
- It is 'recommended' to set biopsy criteria prior to performing clinical cases and to adhere to them for all clinical cases. Routine updating of criteria should be done as necessary.



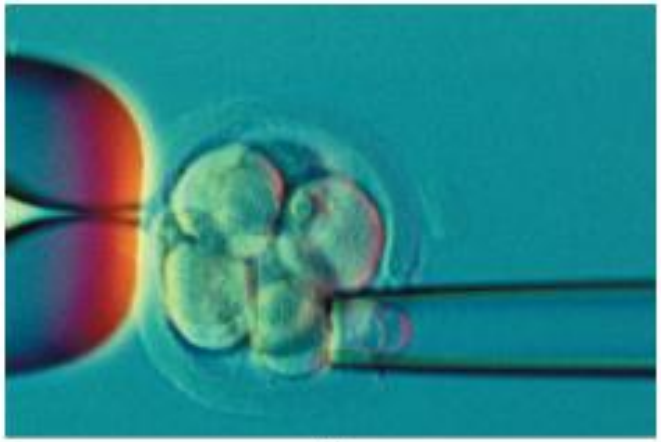


(a)

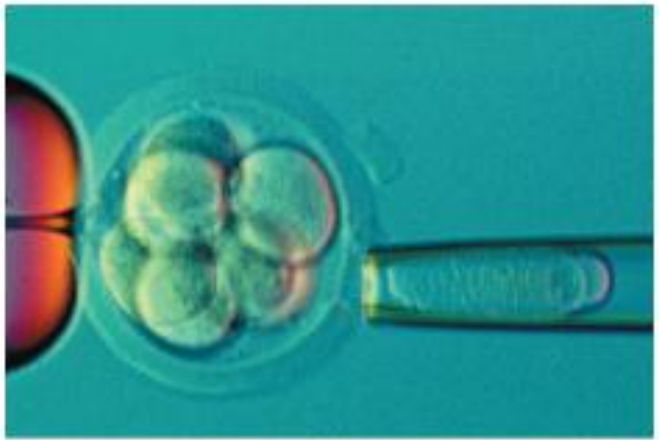
(b)



(c)

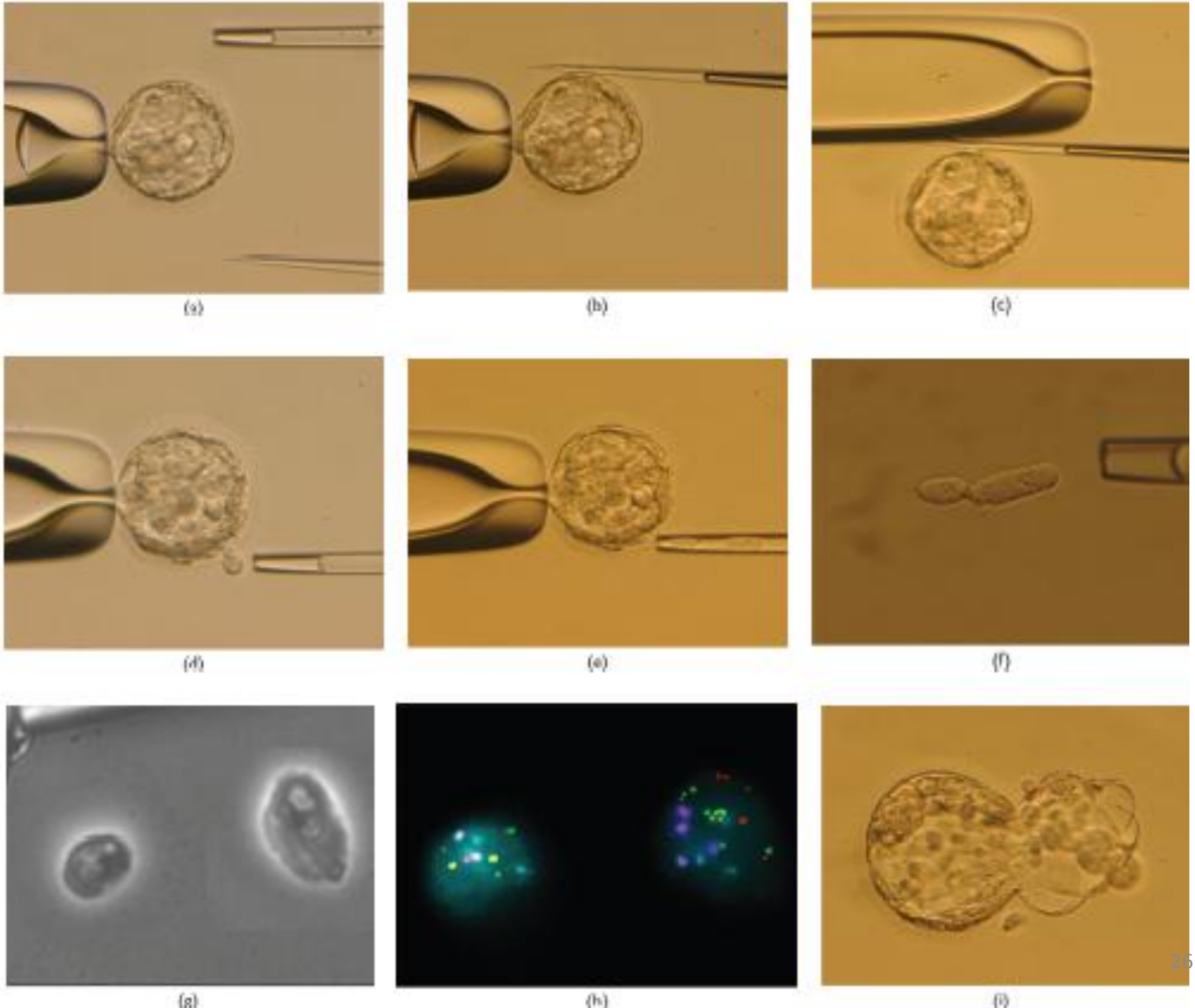


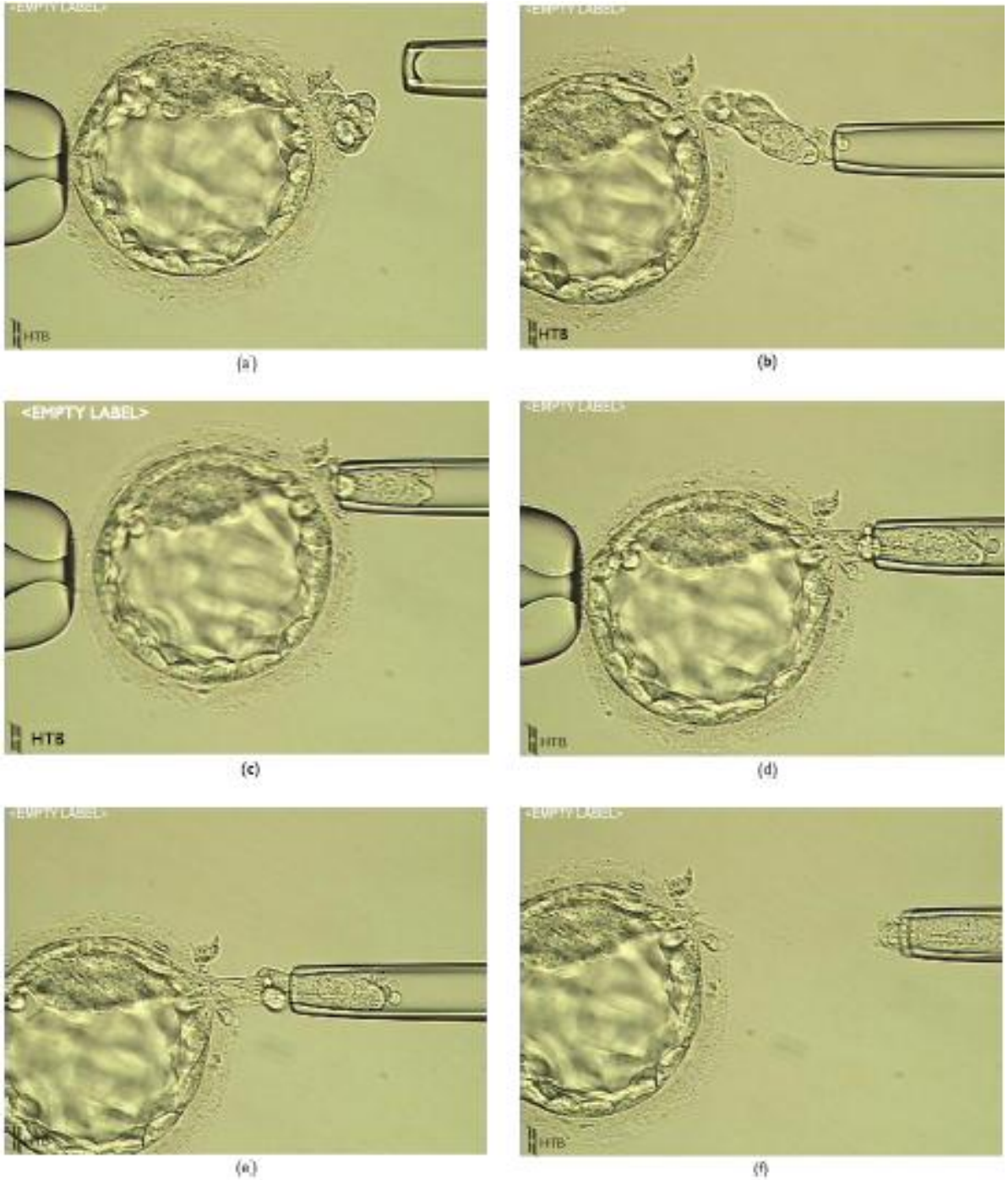
(d)



Blastocyst biopsy

- Several methods of blastocyst biopsy have been reported.
- This may include:
  - breaching of the zona on Day 3 and removal of the trophectoderm on Day 5
  - or zona breaching and trophectoderm removal on Day 5.


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)



re 2.15 Laser-assisted blastocyst biopsy on day 5. (a) Image of a blastocyst prior to beginning the biopsy procedure. The er

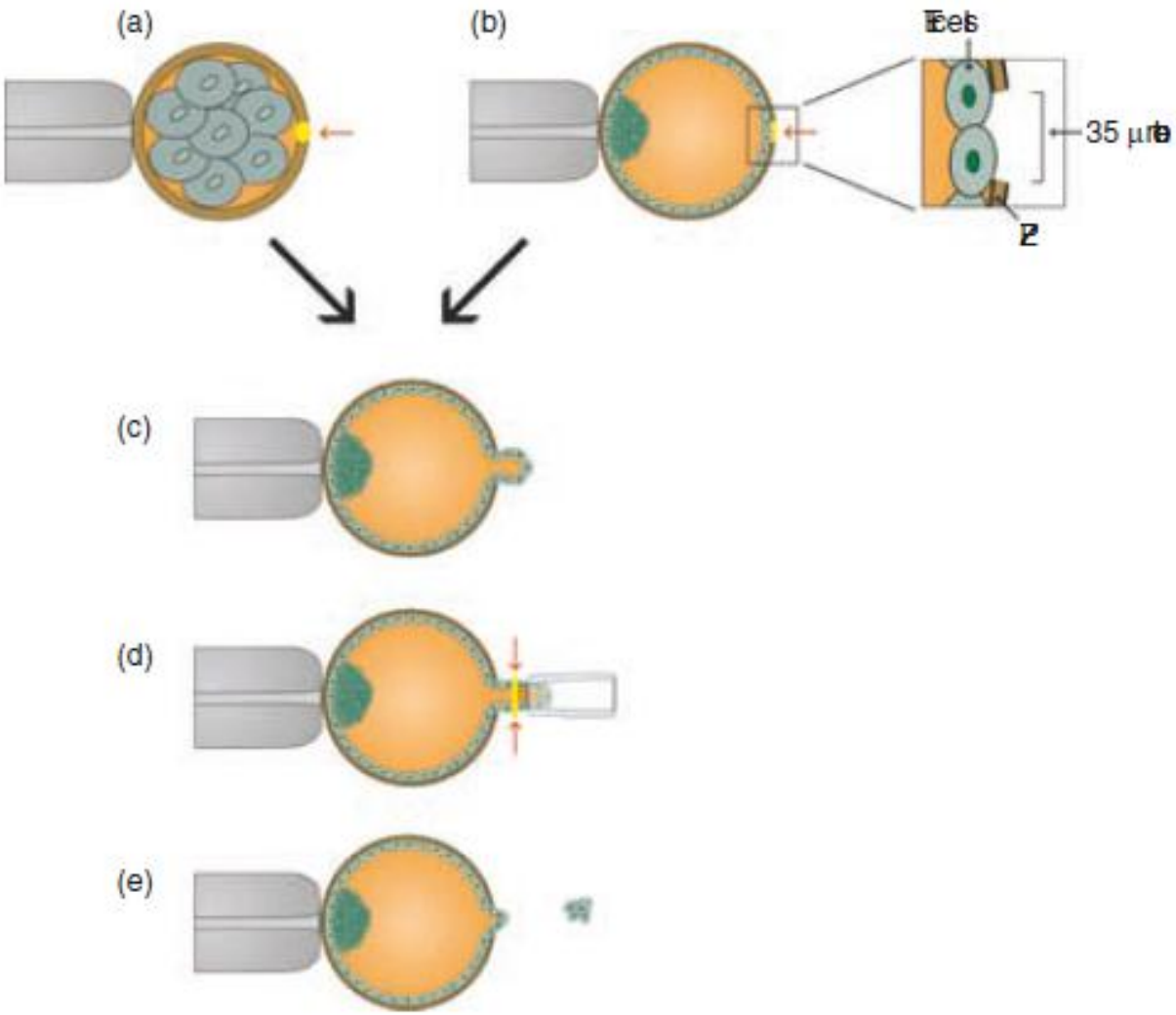


Figure 11.1 Diagram showing the two approaches for blastocyst biopsy: (a) zona pellucida (ZP) opening on a day 3 embryo; (b) ZP opening on a blastocyst; (c) herniation of trophectoderm (TE) cells; (d) biopsy of the herniated cells; (e) biopsied cells. Red arrows indicate the laser shots.

Table 3. Advantages and drawbacks of different embryo-stage biopsies

Biopsy stage	Polar body (oocyte)	Day 3 blastomere	Day 5–6 trophectoderm
Advantages	• no effect on development • ample time for genetic testing • excellent for maternal origin • avoids legal and ethical concerns	• low number of cells required • all indications • time for genetic test	• low number to test • more cells available • all indications • less mosaicism
Drawbacks	• high number tested • sequential biopsy • no information on mutations of paternal origin	• mosaicism • ADO • possible lower implantation rates	• blastocyst culture • needs vitrification • expertise required

- Recently, many groups have been moving away from cleavage stage biopsy for some types of preimplantation testing, specifically aneuploidy screening, due to the issue of mosaicism.
- It is well known that 40–60% of embryos are mosaic (i.e. contain more than one cell line), which can lead to an increase in false-positive/false-negative results in PGS.

Cell removal

- Incubation and biopsy in Ca2+/Mg2+ free medium and aspiration of the chosen blastomeres remain the most common practices for cleavage-stage embryo biopsy.
- Removal of cleavage stage blastomeres by aspiration.
- Removal of trophectoderm cells during blastocyst biopsy by herniation following drilling with laser or mechanical excision.
- Removal of cleavage stage blastomeres by extrusion

or displacement techniques.

Biopsy medium

- The use of standard IVF culture medium during biopsy is ‘acceptable’ but its effectiveness may be highly dependent upon the developmental stage of the embryo biopsied.
- The use of commercial Ca2+/Mg2+ free biopsy medium is common practice for biopsy at the cleavage stage, but some reports discourage its use.

Number of cells to remove safely

- The removal of more than one cell from Day 3 embryos has a negative impact on the clinical outcome. Nevertheless, some tests may require the use of two cells from each embryo to bring the diagnostic accuracy to an acceptable level.
- If removal of two cells is considered, it is recommended to be undertaken only on embryos with six or more cells

Rebiopsy of embryos

- This practice is ‘acceptable’ in the case of lost or anucleate blastomeres and failed diagnosis, but the embryo cell number and timing of rebiopsy should be considered.
- Use of the original zona breach site is ‘recommended’

Selection of cell for removal

- When possible, the removal of mononucleate cells is recommended.

Cryopreservation of biopsied embryos

- There are several situations when embryos may be frozen in cases of PGD:
  - prior to the biopsy (for example in cases of ovarian hyperstimulation syndrome),
  - after the biopsy to give more time to perform the diagnosis,
  - or after the biopsy and diagnosis where fresh embryos have been transferred but 'unaffected' surplus embryos remain.
- In any of these cases, cryopreservation is 'recommended'.
- The same cryopreservation protocols are used for biopsied and intact embryos at present.

Cleavage stage embryos

- Cryopreserved biopsied cleavage stage embryos show a lower survival rate than cryopreserved intact embryos (Magli et al., 1999; Stachecki et al., 2005).
- Vitrification of biopsied cleavage stage embryos has been shown to result in higher survival rates than slow freezing methods (Zheng et al., 2005).
- Embryos biopsied at Day 3 and cryopreserved at blastocyst stage showed a higher survival rate than if cryopreserved on Day 3 (Zhang et al., 2009).
- In two other studies, where slow-freezing was performed on blastocysts having been biopsied on Day 3, similar survival and implantation rates were found compared with intact blastocyst

Blastocysts

- In a recent study a lower survival rate was found for cryopreserved biopsied blastocysts compared with intact blastocysts, while vitrification showed a higher survival rate than slow freezing (Keskintepe et al., 2009).
- If cryopreservation is performed because the transfer procedure is cancelled/delayed (due to OHSS for example), since several studies show a lower survival rate for biopsied embryos/blastocysts, it may be of advantage to perform the biopsy after thawing.
- On the other hand, doing the biopsy before cryopreservation ensures that only embryos with a positive diagnosis are cryopreserved, and will speed up the process of the thawing cycle.
- For the time being, it is recommended that each centre decide its own policy regarding the cryopreservation of PGD embryos based on its experience and performance on embryo cryopreservation.

Quality control

- The proportion of cells damaged during embryo biopsy
- The proportion of cells for which a diagnosis was not obtained
- Misdiagnosis rate calculated *in vitro*
- Misdiagnosis rate calculated *in vivo*
- Implantation rate
- Pregnancy rate (clinical)
- Birth rate

3. Biopsy procedure

3.1. The following 'recommendations' are made for preparations prior to any biopsy procedure on human oocytes or embryos

3.1.1. Ensure all micromanipulation equipment is installed correctly, calibrated and maintained per written procedures. Biopsies must be performed on a warmed stage.

3.1.2. Ensure the appropriate reagents and micromanipulation tools are available, sterile and within their expiration date

3.1.3. Ensure that biopsy is performed by a suitably qualified person who is trained to a written procedure and adheres to that procedure

3.1.4. Biopsy dishes should be made up before the procedure, and clearly labelled with the patient name and oocyte or embryo numbers.

3.1.5. Biopsy dishes should contain a drop of biopsy medium of sufficient size to maintain pH, osmolarity and temperature during the procedure

3.1.6. Sufficient rinse drops comprising culture medium should be available to rinse oocytes and embryos after the biopsy procedure.

3.1.7. Acidified Tyrodes solution (if applicable) should also be readily available to allow pipette priming between biopsies.