



DETERMINAZIONE N.

2100

del

14 OTT. 2014

Atti n. 1483/2014 all 2

DETERMINAZIONI IN ORDINE ALLE PROCEDURE PER L'ATTIVITA' DI DIAGNOSI PRE-IMPIANTO PER COPPIE INFERTILI A RISCHIO DI TRASMISSIONE DI MALATTIE GENETICHE

IL DIRETTORE GENERALE

VISTE

- la Legge 19 febbraio 2004, n. 40 - Norme in materia di procreazione medicalmente assistita;
- la sentenza della Corte Costituzionale 151/2009, che ha dichiarato l'illegittimità costituzionale dell'art. 14, comma 2, della legge 19 febbraio 2004, n. 40, limitatamente alle parole «ad un unico e contemporaneo impianto, comunque non superiore a tre» e dell'art. 14, comma 3, della legge n. 40 del 2004 nella parte in cui non prevede che il trasferimento degli embrioni, da realizzare non appena possibile, come stabilisce tale norma, debba essere effettuato senza pregiudizio della salute della donna;
- la nota della Direzione Generale Salute del 26 settembre 2014, ove si evidenzia *"l'orientamento regionale non vincolante favorevole alla liceità della PGD a favore di coppie sterili o infertili. Sia la normativa (art. 13 e 14 della legge 40) sia la giurisprudenza, costituzionale e amministrativa e comunitaria, non legittimano conclusioni diverse"*;

CONSIDERATO che :

- gli effetti della sentenza del 2009, consentendo la preparazione di più di tre embrioni nell'ambito delle procedure di procreazione assistita, rendono indirettamente possibile l'effettuazione di procedure diagnostiche nei confronti degli embrioni prima del loro impianto e quindi l'ottemperanza all'articolo 14 comma 5 della legge 40/2009 (*" I soggetti di cui all'articolo 5 sono informati sul numero e, su loro richiesta, sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire nell'utero."*) ;
- alle procedure di procreazione medicalmente assistita, e quindi di diagnosi pre impianto, possono avere accesso, ai sensi della Legge 40, *"coppie di maggiorenni di sesso diverso, coniugate o conviventi, in età potenzialmente fertile, entrambi viventi, quando sia accertata l'impossibilità di rimuovere altrimenti le cause impeditive della procreazione ed è comunque circoscritto ai casi di sterilità o di infertilità inspiegate documentate da atto medico nonché ai casi di sterilità o di infertilità da causa accertata e certificata da atto medico"*;
- nell'esperienza clinica è stato rilevato che coppie portatrici di malattie genetiche, che riportano in alcuni casi nella propria anamnesi interruzioni volontarie di gravidanza di tipo terapeutico, sviluppano forme di infertilità di carattere psicologico;

RITENUTO che l'effettuazione di procedure diagnostiche su embrioni destinati all'impianto:

IRCCS di natura pubblica



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Pag. 2

DETERMINAZIONE N. **2100** del **14 OTT. 2014**

Atti n. 1483/2014 all 2

- non possa configurarsi come mera esecuzione di tecniche di laboratorio ma debba essere inquadrata in un percorso assistenziale più complessivo, comprensivo degli evidenti aspetti psicologici e ricadute sul benessere della coppia e del nascituro;

- debba essere posta in atto a fronte di un definito rischio di trasmissione di malattie genetiche di rilevante impatto sulla qualità della vita e non genericamente volta a rilevare anomalie cromosomiche o genetiche, e ciò nel rispetto del divieto di cui all'art. 13 della legge 40/2004 (*"...ogni forma di selezione a scopo eugenetico degli embrioni e dei gameti, ovvero interventi che, attraverso tecniche di selezione, di manipolazione o comunque tramite procedimenti artificiali, siano diretti ad alterare il patrimonio genetico dell'embrione o del gamete ovvero a predeterminarne caratteristiche genetiche, ad eccezione degli interventi aventi finalità diagnostiche e terapeutiche, di cui al comma 2 del presente articolo"*);

- richieda, da parte della struttura sanitaria che la effettui, competenze di carattere:

- clinico relativo alle malattie genetiche per le quali viene condotta la diagnosi pre-impianto,
- laboratoristico inerente la sensibilità e specificità dei test da effettuare,
- psicologico relativo alle problematiche connesse al desiderio di genitorialità, alla consapevolezza circa la metodica di procreazione medicalmente assistita, gli esiti della diagnosi pre-impianto o della diagnosi prenatale;

VERIFICATO che le situazioni occorrenti presso la Fondazione, come segnalate dai professionisti nella nota del 24 aprile 2014, sono costituite da:

- coppie con infertilità determinata da patologie organiche, che accedono alle procedure di procreazione medicalmente assistita e che fanno richiesta di conoscere lo stato di salute degli embrioni prima dell'impianto;

- coppie con infertilità di carattere psicologico, perlopiù conseguente al fatto di essere portatrici di malattie genetiche trasmissibili, che richiedono di accedere alla procreazione medicalmente assistita per poter effettuare la diagnosi pre-impianto;

VERIFICATO altresì che i costi per l'effettuazione della diagnosi pre-impianto sono compatibili e coperti con la tariffa drg riconosciuta da Regione Lombardia;

RITENUTO, nel rispetto dell'articolo 13 della legge 40/2004, di non dover effettuare diagnosi pre-impianto per qualsivoglia anomalia genetica o cromosomica, ma esclusivamente per malattie per le quali siano presenti in Fondazione competenze per la relativa diagnosi e cura e, quindi, in prima ipotesi, per emofilia, fibrosi cistica, talassemia, riservandosi, con successivi provvedimenti, l'eventuale ampliamento ad altre patologie;

RITENUTO altresì che l'accesso alla procreazione medicalmente assistita per le coppie con infertilità di carattere psicologico e portatrici delle succitate malattie genetiche, debba essere preceduto da

IRCCS di natura pubblica



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Pag. 3

DETERMINAZIONE N.

2100

del

14 OTT. 2014

Atti n. 1483/2014 all 2

un percorso assistenziale adeguato, volto anche ad una valutazione circa la consapevolezza delle procedure a cui viene chiesto di sottoporsi e relativi esiti;

VISTO il documento predisposto a tale scopo dagli operatori della Fondazione e relativi allegati, che costituiscono parte integrante della presente determinazione;

RITENUTO CHE:

- le procedure proposte, relative alla diagnosi pre-impianto per emofilia, talassemia e fibrosi cistica, possano essere poste in atto per le coppie con infertilità determinata da patologie di carattere organico, certificate da specialista della Fondazione;
- per le coppie con infertilità di carattere psicologico che siano portatrici di emofilia, talassemia e fibrosi cistica debba essere messo a punto un protocollo per definire i criteri, gli accertamenti e le valutazioni necessarie a certificare detta infertilità e che tale protocollo sia predisposto da una commissione coordinata dal Direttore della UOC Coordinamento Dipartimenti Clinici - DSP e costituita dal Direttore dell'Area Ostetrico-ginecologica e dal Direttore Dipartimento di neuroscienze o loro delegati;

VALUTATA l'opportunità di sottoporre la presente determinazione al Comitato Etico di Milano - Area B, cui sarà sottoposto, preventivamente alla sua adozione, anche il protocollo di cui al precedente punto;

ACQUISITO il parere favorevole del Direttore della Area Ostetrico-ginecologica, Prof. Luigi Fedele, del Direttore della UOSD PMA, Dr. Edgardo Somigliana, del Direttore della UOC Coordinamento Dipartimenti Clinici - DSP, Dr. Basilio Tiso, nella riunione del 7 ottobre 2014,

Con il parere favorevole del Direttore Scientifico, del Direttore Sanitario e del Direttore Amministrativo

DETERMINA

1. di prendere atto che alla luce della sentenza della corte costituzionale n. 151/2009 è possibile effettuare la diagnosi pre-impianto, così come confermato anche nella nota della Direzione Generale Salute del 26 settembre 2014 su richiamata;
2. di attivare le procedure di diagnosi pre-impianto per le sole malattie genetiche di rilevante impatto clinico, per le quali sono presenti in Fondazione competenze di carattere diagnostico, laboratoristico e assistenziale e cioè in prima ipotesi, emofilia, talassemia e fibrosi cistica;

IRCCS di natura pubblica



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Pag. 4

DETERMINAZIONE N.

2100

del 14 OTT. 2014

Atti n. 1483/2014 all 2

3. di riservarsi, con successivo provvedimento di ampliare ad altre patologie la possibilità di diagnosi pre-impianto, verificati i criteri succitati;
4. di consentire l'accesso alle predette procedure per le coppie con infertilità che siano portatrici delle medesime malattie, secondo le modalità di cui al documento allegato che forma parte integrante della presente determinazione;
5. di dare mandato al Direttore della UOC Coordinamento Dipartimenti Clinici - DSP, con il supporto del Direttore dell'Area Ostetrico-ginecologica e del Direttore Dipartimento di neuroscienze o loro delegati, di mettere a punto un protocollo per definire i criteri, gli accertamenti e le valutazioni necessarie a certificare infertilità di carattere psicologico e conseguente accesso alla Procreazione Medicalmente Assistita, da sottoporre preventivamente all'adozione al Comitato Etico Milano Area B;
6. di inviare la presente determinazione al Comitato Etico di Milano Area B per opportuna valutazione;
7. di dare atto che i costi aggiuntivi per l'effettuazione delle procedure per la diagnosi pre-impianto sono compatibili e coperte dalla tariffa riconosciuta per il drg e che quindi la presente determinazione non comporta costi aggiuntivi per la Fondazione;
8. di dare mandato al Direttore della UOSD Procreazione Medicalmente assistita di segnalare alla Direzione Strategica, con periodicità trimestrale, il numero di procedure di diagnosi pre impianto e relativi esiti, fermi restando gli obblighi di registrazione e rendicontazione dei flussi sanitari e della rete sperimentale di PMA regionale.

IL DIRETTORE GENERALE

Dr. Luigi Macchi

IL DIRETTORE SCIENTIFICO

Prof. Pier Mannuccio Mannucci

IL DIRETTORE SANITARIO

Dr.ssa Anna Pavan

IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO

Dott. Osvaldo Basilico

All.: Procedura - Diagnosi genetica pre-impianto di patologie monogeniche su embrioni (PGD)

Procedimento presso: Direzione Sanitaria Aziendale
Responsabile del procedimento : Dr.ssa Anna Pavan

REGISTRATA NEL VELINCO DELLE DETERMINAZIONI
IN DATA 14 OTT. 2014 N. 2100

IRCCS di natura pubblica

Sistema Sanitario



Regione
Lombardia



PERCORSO DIAGNOSTICO- TERAPEUTICO DI DIAGNOSI GENETICA PRE- IMPIANTO DI PATOLOGIE MONOGENICHE SU EMBRIONI (PGD)

Versione 1.1 del 10.10.2014

In ottemperanza alla legge 40/2004 e relative linee guida ed alla Sentenza Corte Costituzionale 151/2009 è istituito un percorso diagnostico di diagnosi genetica pre-impianto per patologia monogenica a cui partecipano le UUOO Procreazione Medicalmente Assistita, Genetica Medica, Laboratorio di Genetica Medica e U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie

Si tratta di una tecnica utile alla diagnosi precoce (pre-impianto) di patologie monogeniche da applicare a coppie ad aumentato rischio genetico.

La metodica indaga solamente le mutazioni presenti nei membri della coppia e non può assicurare che l'embrione non sia portatore di altre malattie genetiche, anomalie cromosomiche o di predisposizioni alle malformazioni: lo scopo della procedura è quello di individuare gli embrioni non affetti dalla patologia in esame.

La diagnosi pre-impianto di malattie a trasmissione genetica viene effettuata durante cicli fecondazione in vitro attraverso la biopsia di alcune cellule della blastocisti e la successiva analisi molecolare del DNA.

Si specifica che per effettuare la metodica è necessario che, dopo la fecondazione, gli embrioni della coppia si sviluppino fino allo stadio di blastocisti (5/6 giornata di coltura in vitro) e che tali blastocisti vengano crioconservate fino al risultato dell'analisi genetica.

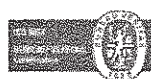
Come riportato in letteratura, il prelievo del trofocodermia e il congelamento della blastocisti non incidono sul potenziale sviluppo dell'embrione. Le cellule analizzate sono provenienti dal trofocodermia, e non dal polo germinativo da cui originerà il feto (per questo motivo ci si riferisce talvolta ad una "villocentesi precoce").

Possono accedere alla diagnosi genetica pre-impianto (PGD) i soggetti che presentano le seguenti indicazioni:

1. Coppie con rischio genetico accertato di fibrosi cistica, talassemia ed emofilia, previa verifica dell'informatività dei marcatori del DNA associati alla patologia genetica di cui i membri della coppia sono portatori
2. Idoneità alla Fecondazione Assistita in base alle condizioni di salute ed ai requisiti della Legge 40/2004
3. Consulenza psicologica
4. Coppie in cui siano presenti blastocisti al 5/6 giorno dopo la fecondazione

Iter diagnostico

I membri della coppia che accede alla PGD sono portatori di una o più mutazioni geniche che aumentano il rischio, rispetto alla popolazione generale, di avere dei figli affetti da una malattia monogenica. La coppia può accedere al percorso di Procreazione Medicalmente





Assistita (PMA) conoscendo già il proprio rischio genetico oppure i pazienti possono scoprire di essere portatori di un gene che causa la patologia attraverso gli esami richiesti durante il percorso di PMA. L'iter diagnostico terapeutico prevede in ogni caso i seguenti momenti di consulenza-indagine specialistica:

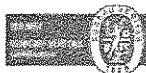
- Le caratteristiche della patologia ed i rischi di trasmissione alla prole sono affrontati nel corso di una o più consulenze effettuate dal medico genetista (UOSD Genetica Medica).
- Il Ginecologo verifica la possibilità delle coppie di sottoporsi alla Fecondazione Assistita secondo la normale procedura di PMA (UOSD Procreazione Medicalmente Assistita).
- Consulenze da parte di uno psicologo con adeguata formazione nel settore per assicurare adeguato sostegno psicologico alla coppia e per completare la diagnosi.
- La fattibilità dell'analisi genetica sull'embrione è effettuata tramite uno studio genetico, su sangue periferico, per individuare le mutazioni presenti nei membri della coppia ed i markers ad esse correlati (effettuato dalla UOS Laboratorio di Genetica Medica per la fibrosi cistica e la talassemia, dalla U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie per l'emofilia).

La possibilità di accesso alla procedura di diagnosi pre-impianto è subordinata ad una decisione collegiale che prevede il parere di almeno 2 ginecologi, uno psicologo/psichiatra e un medico genetista.

Iter terapeutico

Verificata la fattibilità del percorso, gli step successivi sono:

- la coppia segue il normale iter della fecondazione in vitro. Per poter effettuare la PGD è necessario che dopo la fecondazione si formino degli embrioni e che questi giungano allo stadio di blastocisti (al 5/6 giorno di coltura in vitro), stadio a cui si effettua la biopsia di 5-15 cellule del trofotoderma. Ogni biopsia viene indirizzata all'analisi genetica (UO Laboratorio di Genetica Medica o UO Medicina Interna 2) ed ogni blastocisti viene congelata singolarmente. La biopsia e la relativa blastocisti sono identificate da un codice univoco.
- Ottenuto il referto genetico la coppia viene informata dei risultati durante un colloquio in cui sono esposte le differenti possibilità per il trasferimento embrionale. Ogni embrione può risultare affetto o non affetto dalla patologia presa in esame. Non si può garantire che l'embrione non sia affetto da altre malattie genetiche, anomalie cromosomiche o predisposizioni alle malformazioni.
- Il trasferimento degli embrioni non affetti viene effettuato secondo la normale procedura per i cicli di scongelamento di blastocisti. Gli embrioni non trasferiti, come





avviene per le procedure di fecondazione in vitro "standard", vengono crioconservati senza oneri per il paziente in ottemperanza alla legge 40/2004.

CONSENSO INFORMATO

- I soggetti sono informati sia verbalmente che attraverso opuscolo informativo e sessione audio visiva (offerta ai soggetti e fruita in modo gratuito e facoltativo), relativamente ai metodi, agli effetti collaterali, ai rischi, alle percentuali di successo e insuccesso, ai problemi bioetici, alle conseguenze giuridiche per la donna, per l'uomo e per il nascituro derivati dall'applicazione di tecniche di procreazione assistita di secondo livello che dall'analisi genetica pre-impianto
- La volontà di entrambi i soggetti di accedere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita ed all'analisi genetica pre-impianto è espressa per iscritto mediante consenso informato per ognuna delle procedure.

www.Albopretorionline.it





DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO DI PATOLOGIE MONOGENICHE SU EMBRIONI (PGD)

1	SCOPO.....	2
2	CAMPO DI APPLICAZIONE	2
3	RIFERIMENTI.....	2
4	DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.....	3
5	RESPONSABILITA'	3
6	DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ.....	4
6.1	DIAGRAMMA DI FLUSSO	5
6.2	VISITE AMBULATORIALI	5
6.3	FECONDAZIONE IN VITRO (ICSI)	6
6.4	ESECUZIONE DELLA PGD	7
6.4.1	IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI.....	7
6.4.2	BIOPSIA EMBRIONALE PER PGD	7
6.4.3	CRIOCONSERVAZIONE MATERIALE BIOLOGICO	9
6.4.4	ANALISI GENETICA.....	10
6.5	CONSEGNA DEL REFERTO ALLA COPPIA.....	10
6.6	EMBRYO TRANSFER	10
7	ALLEGATI	11

Redazione	Verifica	Approvazione (firma)	Data	Rev	Descrizione modifica
A. Paffoni	L. Restelli F. Lalatta M. Seia F. Peyvandi	E. Somigliana F. Lalatta M. Seia F. Peyvandi	05/03/14	0	





1 SCOPO

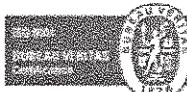
Lo scopo della seguente procedura è quello di definire le modalità operative adottate nella UOSD Procreazione Medicalmente Assistita della Fondazione IRCCS in condivisione con la U.O. Genetica medica, U.O. Laboratorio di Genetica Medica e U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie per la procedura di **DIAGNOSI PRE-IMPIANTO DI PATOLOGIE MONOGENICHE (PGD) SU EMBRIONI** ottenuti da tecniche di fecondazione in vitro.

2 CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura si applica nella Sezione Clinica (SC) e Sezione Biologia (SB) della UOSD Procreazione Medicalmente Assistita in collaborazione con le UUOO Genetica medica, Laboratorio di Genetica medica e Ematologia non tumorale e coagulopatie. La procedura viene applicata alle coppie ad elevato rischio riproduttivo, per la presenza di mutazioni parentali associabili a patologie genetiche del nascituro, che ne facciano esplicita richiesta. Si tratta di una procedura complementare alle tecniche di PMA.

3 RIFERIMENTI

- Percorso Diagnostico- Terapeutico Di Diagnosi Genetica Pre-Implanto Di Patologie Monogeniche Su Embrioni (PGD)
- P.01.732 "Prenotazione ed accettazione dell'utente"
- P.04.732 "Identificazione e rintracciabilità del prodotto"
- P.06.732 "Crioconservazione dei gameti/embrioni"
- P.11.732 "Monitoraggio Ecografico FIVET/ICSI"
- P.10.732 "FIVET/ICSI"
- P.14.732 "FIVET/ICSI Biologia"
- P.701.500.G GESTIONE DEL PROCESSO SETTORE GENETICA MOLECOLARE
- IO Istruzioni operative per Diagnosi preimpianto di patologia monogenica autosomica recessiva su EMBRIONE (PGD)
- Legge n.40/2004 "Norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita"
- Decreto Legislativo 6 novembre 2007, n. 191 "Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
- Decreto Legislativo del 25 gennaio 2010 n. 16 "Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo dei tessuti e cellule umani"
- Accordo Stato - Regioni del 15 Marzo 2012 del Dlgs 191/2007 concernente: "Requisiti minimi organizzativi, strutturali e tecnologici delle strutture sanitarie autorizzate di cui alla Legge 40/2004"
- Dlgs n°85/2012 Modifiche ed integrazioni al Dlgs 16/2010
- Revisione 2008 delle "Linee guida contenenti le indicazioni delle procedure e delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita" art. 7 L.n° 40/2004 e sentenza n°151 del 2009 della Corte Costituzionale.





4 DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

PGD: Diagnosi Genetica Pre-Implanto
DH: Day Hospital
PMA: Procreazione Medicalmente Assistita
SB: Sezione Biologia
SC: Sterilità di Coppia
UO: Unità Operativa
RUO: Responsabile di Unità Operativa

5 RESPONSABILITA'

Il personale della UOSD Genetica Medica ha la responsabilità di:

- individuare le coppie a rischio riproduttivo candidate alla procedura
- effettuare la consulenza genetica pre-test alla coppia interessata
- consegnare alla coppia il consenso informato "Diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica x-linked recessiva" o "Diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica autosomica recessiva"
- Consegnare e valutare con la coppia i referti delle analisi PGD

Il personale medico della UOSD Procreazione Medicalmente Assistita ha la responsabilità di:

- individuare le coppie infertili a rischio riproduttivo candidate alla procedura
- indirizzare le coppie interessate alla UO Genetica Medica per la consulenza specialistica
- indirizzare la coppia alla consulenza da parte di uno psicologo con adeguata formazione nel settore, per assicurare adeguato sostegno psicologico
- consegnare alla coppia il "Consenso alla procedura FIVET/ICSI"
- effettuare la procedura FIVET/ICSI

Il personale della Sezione Biologia della UOSD Procreazione Medicalmente Assistita ha la responsabilità di:

- effettuare la procedura "FIVET/ICSI biologia"
- prelevare le cellule embrionali, identificarle e stoccarle nell'apposito frigorifero dedicato alla PGD
- consegnare alla coppia il "Consenso informato alla crioconservazione degli embrioni"
- crioconservare gli embrioni sottoposti a PGD garantendone la tracciabilità.
- correlare l'esito della PGD ai singoli embrioni crioconservati
- effettuare la procedura di scongelamento degli embrioni risultati idonei
- identificare correttamente gli embrioni risultati idonei per la procedura di embryo transfer.

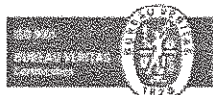




Il personale della U.O.S. Laboratorio di Genetica Medica e U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie ha la responsabilità di :

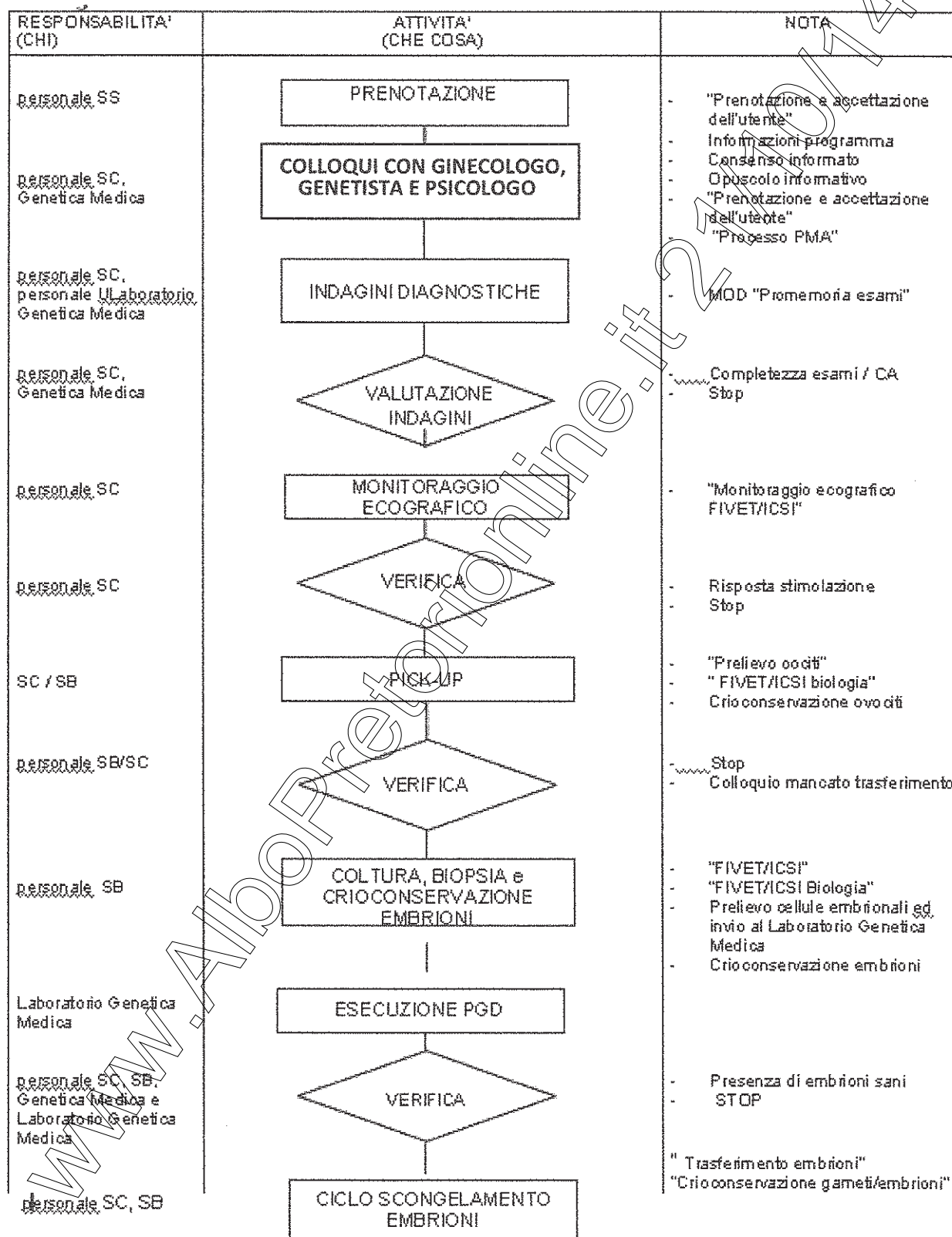
- effettuare le indagini genetiche preliminari alla fattibilità della procedura su sangue periferico di entrambi i componenti delle coppie candidate per l'identificazione di markers informativi
- condurre l'analisi genetica sulle cellule embrionali provenienti dal Procreazione Medicalmente Assistita ed ivi prese in carico
- preparare il referto relativo alla PGD e consegnarlo alla UO Genetica Medica.

6. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ





6.1 DIAGRAMMA DI FLUSSO





6.2 VISITE AMBULATORIALI

Le coppie candidate alla procedura di PMA con PGD sono reclutate attraverso l'ambulatorio della UO Procreazione Medicalmente Assistita o della UO Genetica Medica e vengono indirizzate ad una **prima consulenza** prenotata ed effettuata presso la UO Procreazione Medicalmente Assistita in cui sono presenti sia il medico genetista che il medico ginecologo. In questa sede gli specialisti illustrano alla coppia il percorso diagnostico terapeutico relativo alla fecondazione in vitro con diagnosi preimpianto e prescrivono gli esami preliminari ritenuti necessari, invitando la coppia a presentarsi ad una **visita di controllo** per la rivalutazione clinica, con le stesse modalità. Nel frattempo la coppia effettua uno o più visite con uno psicologo con adeguata formazione presso la UO Procreazione Medicalmente Assistita.

Durante la visita di controllo, il medico genetista ed il medico ginecologo valutano gli esami preliminari effettuati ed indirizzano la coppia verso le prossime fasi del percorso o, se la coppia non è ritenuta idonea, interrompono la procedura, motivando la scelta clinica; la possibilità di effettuare la procedura di PGD è vincolata al parere positivo del ginecologo, del medico genetista e dello psicologo. Nel caso in cui la coppia possa procedere, viene illustrato e consegnato il "Consenso informato alla Diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica x-linked recessiva" o il "Consenso informato alla diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica autosomica recessiva". La coppia viene inserita nella **lista di attesa per il DH** ed informata del fatto che il personale dell'Accettazione Sanitaria della UO Procreazione Medicalmente Assistita provvederà a contattarla per fissare l'appuntamento, nei tempi previsti dalla lista di attesa. Nel contempo la coppia viene indirizzata a un percorso ambulatoriale di assistenza psicologica e a un corso informativo sulla procreazione medicalmente assistita, entrambi prenotabili ed eseguiti presso la UO Procreazione Medicalmente Assistita.

Il giorno del DH, la coppia si presenta presso la UO Procreazione Medicalmente Assistita per l'esecuzione degli esami preoperatori (esami ematochimici di routine, ECG, ev. esami del caso e visita anestesilogica), per la compilazione della cartella clinica e per la consegna dei moduli previsti, in accordo alla procedura "Monitoraggio Ecografico FIVET / ICSI". Nella stessa occasione viene ritirato il consenso informato alla diagnosi genetica preimpianto ed archiviato nella cartella clinica.

6.3 FECONDAZIONE IN VITRO (ICSI)

Le coppie idonee al programma di PMA con PGD, eseguono un percorso ordinario di fecondazione in vitro con tecnica di inseminazione ICSI, in accordo alle procedure "Percorso PMA", "Monitoraggio Ecografico Fivet / Icsi", "FIVET/ICSI", "FIVET/ICSI Biologia".

La procedura di PGD si inserisce nel percorso al termine della coltura embrionaria, prima dell'embryo transfer, cioè al 5° o 6° giorno a partire dal pick up ovocitario (giorno 0). In questa fase vengono selezionati gli embrioni vitali che abbiano raggiunto lo stadio di blastocisti. Dal momento della PGD, la coltura degli embrioni viene effettuata singolarmente. Gli embrioni sottoposti a biopsia delle cellule per PGD vengono crioconservati in attesa del risultato dell'analisi genetica; ne consegue che le coppie debbono sottoscrivere anche il "Consenso informato alla crioconservazione degli embrioni" (cfr. Procedura "Crioconservazione di gameti ed embrioni")





I dati embriologici relativi alla procedura sono registrati sul modulo "Dati biologici FIVET/ICSI"

6.4 ESECUZIONE DELLA PGD

La PGD viene eseguita su embrioni vitali ottenuti in 5°-6° giornata di sviluppo (stadio di blastocisti) in seguito all'applicazione della tecnica ICSI. Tutti gli embrioni vitali ottenuti ed appartenenti alle coppie candidate a PGD sono, di norma, sottoposti ad analisi genetica per la patologia di cui la coppia è nota essere portatrice.

6.4.1 IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

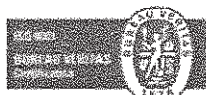
Fino al momento della biopsia per PGD, gli embrioni vengono coltivati in accordo alle procedure standard FIVET/ICSI. La coppia da cui provengono gli embrioni è identificata con nome, cognome, data di nascita di entrambi i partner e numero progressivo ordinario. Al momento della PGD ogni embrione sottoposto a biopsia viene identificato, coltivato, sottoposto a biopsia e crioconservato individualmente per garantire la rintracciabilità nel tempo. L'identificazione dell'embrione crioconservato e del relativo materiale biotico seguono la stringa: **numero coppia.anno esecuzione. E. numero embrione** (esempio 999.13.E.2 per l'embrione n°2 della coppia n° 999 del 2013).

Per ogni campione è allestito un controllo negativo che contiene solo medium di coltura, identificato come "numero coppia.anno esecuzione.C numero embrione" (esempio 999.13.C.2 per il controllo negativo dell'embrione n°2 della coppia n° 999 del 2013). Ogni provetta in cui viene trasferito il campione per PGD (o il controllo negativo) è identificata sul tappo con codice scritto a pennarello e sul fianco attraverso una etichetta stampata.

6.4.2 BIOPSIA EMBRIONALE PER PGD

La biopsia può essere effettuata, in base alle specifiche caratteristiche dei singoli embrioni, tra il 5° ed il 6° giorno di sviluppo in vitro successivo alla inseminazione. Essa consiste nel prelievo di 5-15 cellule del trofoectoderma dell'embrione senza compromettere il suo normale sviluppo.

Viene allestita una piastra da micromanipolazione con terreno tamponato e albuminato, composta da: 3 gocce da 10 microlitri di terreno per pulire i microaghi; 2 gocce da 10 microlitri numerate in cui posizionare singolarmente fino a 2 embrioni; due gocce ad esse adiacenti, da 5 microlitri, in cui trasferire le cellule biopsizzate. Ogni piastra può contenere fino a due embrioni e deve essere identificata con il codice della paziente, oltre al codice del singolo embrione che conterranno. Es. paziente 999.13. 4 (corrisponde all'embrione n°4 della coppia n° 999 del 2013).



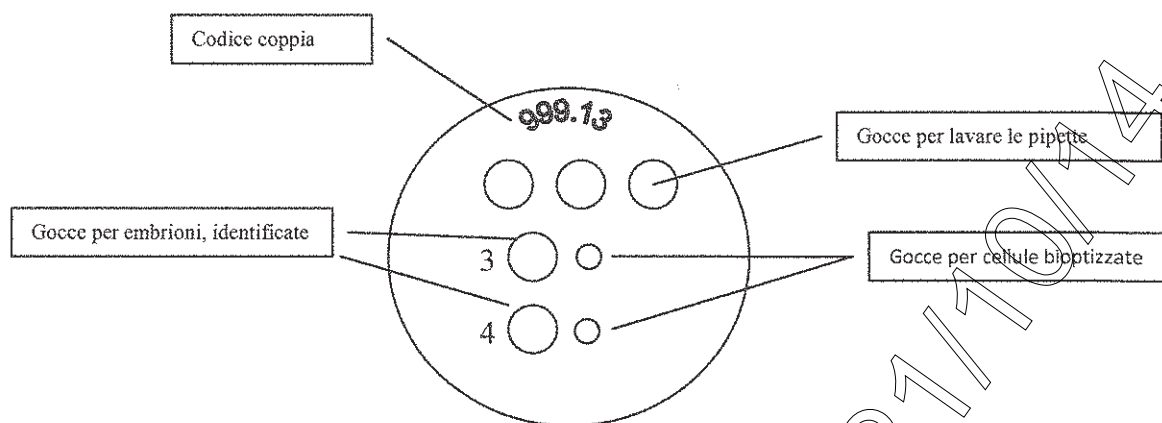


Figura 1: esempio di piastra per biopsia PGD

Il micromanipolatore viene allestito con una pipetta holding ed una pipetta da biopsia (diametro ~ 30 micrometri). Per la biopsia è necessario inoltre l'utilizzo di un laser montato sul microscopio.

Prelievo in 5°-6° giornata (fase di blastulazione)

Uno stadio evolutivo avanzato durante il quale è possibile applicare la PGD è quello in cui l'embrione raggiunge lo stadio di blastocisti (quinta/sesta giornata di sviluppo embrionale). In questa fase, le cellule hanno avuto un primo differenziamento: quelle più periferiche compongono il trofoectoderma. Alcune di queste cellule, da cui origineranno esclusivamente gli annessi placentari, possono essere prelevate ed analizzate senza influenzare le possibilità di impianto dell'embrione. Le cellule della massa cellulare interna, da cui originerà il feto, non vengono invece interessate dalla biopsia. La tecnica di prelievo consiste nel praticare un foro nella zona pellucida, e nell'aspirazione di 5 – 15 cellule da utilizzare per la diagnosi.

La biopsia delle cellule del trofoectoderma avviene preferenzialmente su blastocisti in parziale estrusione dalla zona pellucida. A questo scopo, la zona pellucida deve essere preparata in anticipo, applicando un foro con il laser nella mattina del giorno 5. In quinta giornata ci si attende che la blastocisti estruda parte del trofoectoderma dopo circa due ore dalla perforazione della zona pellucida. In mancanza di cellule estruse è possibile effettuare il prelievo biotico entrando nello spazio perivitellino.

Il momento maggiormente indicato per la biopsia del trofoectoderma è il pomeriggio del giorno 5.

Qualora il trofoectoderma non avesse raggiunto uno stadio di maturazione sufficientemente avanzato (poche cellule di grandi dimensioni), è bene rinviare la procedura di almeno 4 ore, fino ad arrivare eventualmente alla mattina del giorno sei.





Il prelievo delle cellule avviene aspirando con la pipetta da biopsia alcune cellule lontane dalla massa cellulare interna e, mantenendo in tensione la blastocisti con la pipetta holding, applicando alcuni impulsi laser (~ 0.300 msec) nel punto individuato di rottura per staccarle dal resto del trofoectoderma.

Le cellule prelevate vengono trasferite al micromanipolatore in una goccia di terreno pulita, adiacente a quella contenente l'embrione.

Queste cellule vengono quindi poste all'interno di una provetta analitica (1 ml) contenente buffer di

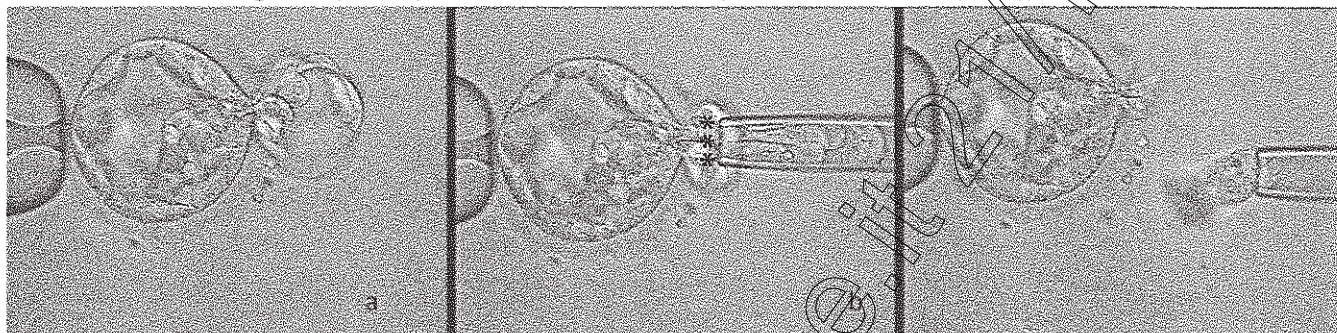


Figura 2: biopsia al giorno 5; a) alcune cellule sono estruse attraverso il foro precedentemente applicato nella zona pellucida; b) circa 5 cellule vengono aspirate nella pipetta da biopsia mentre con il laser si applicano degli impulsi per staccare le cellule***

lisi per eseguire l'analisi genetica. L'operazione avviene allo stereo-microscopio utilizzando una pipetta del diametro di 140 micron. Ogni provetta è identificata con il codice della coppia ed il numero dell'embrione. Per ogni provetta è allestita anche una provetta di controllo negativo, contenente un'aliquota di terreno da cui sono state trasferite le cellule da analizzare. Le provette vengono centrifugate a grande velocità (12.000 rpm) e trasferite in congelatore -20 °C (stanza 16) dove saranno prelevate dal personale della UO Laboratorio Genetica Medica e U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie.

Ogni embrione sottoposto a biopsia viene immediatamente crioconservato.

6.4.3 CRIOCONSERVAZIONE MATERIALE BIOLOGICO

Il personale della SB della UO Procreazione Medicalmente Assistita si fa carico del congelamento degli embrioni sottoposti a biopsia per analisi genetica. Per quanto riguarda l'attività di congelamento e conservazione, si rimanda alle procedure specifiche (Crioconservazione dei gameti/embrioni)

Gli embrioni da cui sono state prelevate le cellule per l'analisi, vengono crioconservati singolarmente tramite vitrificazione, secondo procedura specifica, utilizzando il codice di rintracciabilità descritto sopra. A tale proposito viene allestita la scheda di Congelamento/scongelo embrioni.

Sul modulo Dati FIVET/ICSI vengono identificati gli embrioni sottoposti a biopsia e congelamento, indicando l'orario della procedura, l'operatore ed il testimone.





6.4.4 ANALISI GENETICA

L'analisi genetica viene eseguita dal personale della UO Laboratorio di Genetica Medica o U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie. I campioni vengono consegnati congelati con identificazione univoca composta dal codice della coppia e del singolo embrione da cui provengono, accompagnati dal modulo predisposto dal Laboratorio di Genetica Medica (M.723.500.G).

I blastomeri si trovano in provette analitiche in una soluzione che induce la lisi delle cellule e quindi la liberazione del DNA dal nucleo cellulare.

Successivamente, attraverso una reazione di amplificazione enzimatica *in vitro*, conosciuta come Polymerase Chain reaction (PCR), si amplifica milioni di volte il tratto di DNA di interesse in cui sono localizzati i marcatori polimorfici e le mutazioni che causano la patologia in esame (P.701.500.G GESTIONE DEL PROCESSO SETTORE GENETICA MOLECOLARE; P.701.500.G GESTIONE DEL PROCESSO SETTORE GENETICA MOLECOLARE).

Si esegue quindi la ricerca delle eventuali mutazioni e dei marcatori polimorfici individuati precedentemente nei genitori (IO istruzioni operative per Diagnosi preimpianto di patologia monogenica autosomica recessiva su EMBRIONE (PGD)).

Al termine dell'analisi genetica, la UO Laboratorio di Genetica medica o U.O.C. di Ematologia non tumorale e coagulopatie prepara un referto che indica il risultato ottenuto per ogni embrione testato e che viene consegnato alla UO Genetica Medica.

6.5 CONSEGNA DEL REFERTO ALLA COPPIA

La UO Genetica medica si fa carico di consegnare il referto alla coppia e di presentare l'esito dell'analisi PGD, discutendo il risultato e prospettando le successive fasi. Nel caso di presenza di embrioni sani, la coppia viene inviata alla UO Centro Sterilità dove viene inserita nella procedura per Embryo Transfer da embrioni scongelati (cfr. procedura specifica "Crioconservazione Dei Gameti Embrioni"). Una copia del referto viene trasmesso dalla UO Genetica Medica alla UO Procreazione Medicalmente Assistita ed archiviato nella cartella clinica relativa al ricovero per Pick up ovocitario (UO Procreazione Medicalmente Assistita).

6.6 EMBRYO TRANSFER

Qualora l'analisi genetica abbia rivelato la presenza di embrioni sani, la coppia prende accordi con l'accettazione sanitaria della UO Procreazione Medicalmente Assistita per programmare la procedura di Embryo transfer su ciclo di scongelamento, come da procedure "Trasferimento degli embrioni".

Il transfer riguarda i soli embrioni risultati sani all'analisi genetica. Lo scongelamento degli embrioni viene eseguita in accordo alla procedura "Crioconservazione dei gameti embrioni".





7 ALLEGATI

Modulo "Consenso informato per la procedura di Diagnosi Genetica Pre-Implanto Di Patologia Monogenica Autosomica Recessiva"

Modulo "Consenso informato per la procedura di Diagnosi Genetica Pre-Implanto Di Patologia Monogenica X-Linked Recessiva"

Istruzioni operative per Diagnosi preimpianto di patologia monogenica autosomica recessiva su EMBRIONE (PGD)

Modulo M.723.500.G Richiesta Analisi Genetica Preimpianto su embrione

www.AlboPretorionline.it 217017





FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

CODICE M..CONS
DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO
DI PATOLOGIA
MONOGENICA AUTOSOMICA RECESSIVA

REV. 0 DEL 28.03.2014
PAGINA 1 DI 4

VERIFICA:
APPROVAZIONE:

U.O.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita
Dott. E. Somigliana
Tel: 02 55034311

CONSENSO INFORMATO per la procedura:
DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO DI PATOLOGIA MONOGENICA AUTOSOMICA RECESSIVA

Responsabili U.O.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita Dott. E. Somigliana Tel: 02 55034311 U.O.S.D. Genetica Medica Dott.ssa F. Lalatta Tel: 02 55032321 U.O.S. Laboratorio di Genetica Medica Dott.ssa M. Seia Tel: 02 55032433	<p><i>Gentili Signori</i></p> <p><i>in vista della scelta riguardo alla diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica autosomica recessiva è importante che vi siano dei momenti in cui confrontarsi e ricevere tutte le informazioni necessarie al fine di decidere in modo consapevole. Questa informazione al consenso per la procedura di diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica autosomica recessiva viene presentata a:</i></p> <p>Signora COGNOME: _____ NOME: _____ DATA DI NASCITA: _____ LUOGO DI NASCITA: _____</p> <p>Signore COGNOME: _____ NOME: _____ DATA DI NASCITA: _____ LUOGO DI NASCITA: _____</p> <p>dal dott./dott.ssa: COGNOME _____ NOME _____ ENTE DI APPARTENENZA: _____</p>
--	--

1. Condizioni/motivazioni cliniche per cui si propone la procedura:

La Vostra coppia è affetta da infertilità a componente
e siete portatori di una o più mutazioni geniche che aumentano il Vostro rischio, rispetto alla popolazione generale, di avere dei figli affetti dalla seguente malattia
Le caratteristiche di questa patologia ed i rischi di trasmissione alla prole sono stati affrontati e compresi nel corso di una o più consulenze effettuate dal medico genetista.
Il programma di fecondazione a cui avete chiesto di sottoporvi comporta la produzione in vitro di



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano - Telefono 02 5503.1 - Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968

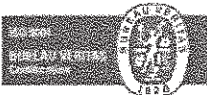
embrioni, le cui proprietà genetiche non sono diagnosticabili con le procedure standard. Avete richiesto pertanto, ai sensi della legge 40/2004, art.14 comma 5, di procedere con il programma di diagnosi genetica pre-impianto per conoscere lo stato di salute degli embrioni vitali che saranno eventualmente disponibili. In particolare, il programma prevede di indagare, mediante biopsia di alcune cellule dell'embrione, la presenza o l'assenza delle mutazioni che, nella vostra coppia, possono causare la patologia sopra indicata.

2. Aspetti biologici e finalità della diagnosi genetica pre-impianto

La biopsia di alcune cellule dell'embrione viene eseguita tra la 5° e la 6° giornata di sviluppo degli ovociti fecondati e non è ritenuta dannosa per il successivo sviluppo dell'embrione stesso.

Nella quinta/sesta giornata di sviluppo, gli embrioni vitali raggiungono lo stadio di blastocisti (embrione al 5°- 6° giorno di sviluppo dopo la fecondazione) e sono formati da centinaia di cellule: in questa fase di sviluppo è possibile ottenere 5-20 cellule che saranno prelevate dallo strato più esterno della blastocisti, il trofoectoderma, e verranno utilizzate per l'analisi genetica. Questo approccio è caratterizzato da un basso rischio di compromettere lo sviluppo embrionario in quanto dal trofoectoderma origineranno gli annessi embrionali (placenta, sacco vitellino) e non il feto: per questo motivo ci si riferisce talvolta ad una "villocentesi precoce". Tuttavia, solo una parte degli embrioni ottenuti può raggiungere lo stadio di blastocisti, utile per effettuare la diagnosi pre-impianto.

Nelle patologie a trasmissione autosomica recessiva, per quanto riguarda il gene di interesse, cioè il gene che causa la patologia in esame di cui siete portatori, ogni ovocita prelevato dalla partner femminile può contenere la versione ("allele") mutata oppure quella sana; con la fecondazione si aggiunge una seconda copia del gene, portata dallo spermatozoo, che può essere parimenti mutata o sana. L'embrione così formato contiene una versione del gene di origine materna ed una di origine paterna, per cui possono verificarsi diverse combinazioni, tra le quali quella associata allo sviluppo della patologia nel nascituro formata da entrambe le copie in forma mutata (eredità del gene mutato sia della madre che del padre). Nel caso di genitori "portatori sani", la probabilità che si formi un embrione affetto dalla patologia è del 25% ad ogni concepimento indipendentemente dal sesso del nascituro. Nel caso di patologie genetiche a differente modalità di trasmissione (e.s. legate al cromosoma sessuale X) lo specifico rischio per la vostra coppia vi è stato fornito in sede di consulenza genetica. Dal momento in cui l'embrione è formato da un numero sufficiente di cellule, è possibile prelevare ed analizzare alcune di queste cellule per capire quale combinazione di geni abbia ereditato l'embrione da cui provengono.



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968



Lo scopo della procedura è quello di individuare embrioni non affetti dalla sola patologia in esame. Il principio della diagnosi pre-impianto è pertanto quello di definire se nell'embrione è presente una combinazione genetica associata – o meno- alla patologia di cui siete portatori.

3. Informazioni riguardo il percorso diagnostico e le condizioni di fattibilità:

La diagnosi pre-impianto sugli embrioni è possibile solo se avete iniziato un percorso multidisciplinare che prevede che si realizzino per voi alcune condizioni:

1. Richiesta di accertamento per la patologia di cui siete portatori, ai sensi dell'art. 14 comma 5, Legge 40/2004.
2. Rischio genetico accertato
3. Consulenza genetica
4. Consulenza psicologica
5. Consulenza ginecologica
6. Informazione completa sulla procedura diagnostica
7. Idoneità alla Fecondazione Assistita dichiarata dal medico del Centro Referente
8. Presenza di embrioni vitali nel giorno previsto per la biopsia delle cellule (blastocisti).

4. Metodologia

A seguito della richiesta della coppia, gli embrioni vitali ottenuti in un programma di fecondazione in vitro ed idonei alla diagnosi pre-impianto saranno sottoposti a biopsia di alcune cellule tra la quinta e la sesta giornata di sviluppo post-inseminazione. Per l'accesso alla procedura di fecondazione in vitro è prevista la sottoscrizione di apposito consenso informato ("consenso informato ICSI P.11.732.M.04) di cui il presente consenso informato rappresenta una integrazione. *Il numero di embrioni disponibile per l'analisi genetica pre-impianto non è prevedibile a priori: è possibile che al termine della procedura di fecondazione in vitro non ci siano embrioni disponibili per la diagnosi. Ciò può essere dovuto a molteplici situazioni elencate, solo in parte, qui di seguito: non si sia prelevato alcun ovocita idoneo all'inseminazione; l'inseminazione in vitro non abbia prodotto alcun embrione; non ci sia stato lo sviluppo di embrioni idonei al trasferimento in utero.*

Tutti gli embrioni vitali ottenuti nella giornata individuata per la biopsia saranno sottoposti a biopsia di una o più cellule e congelati in azoto liquido, in attesa del risultato del test genetico. È necessario che la coppia sottoscriva a tale proposito il consenso informato specifico (Consenso



informato alla Crioconservazione degli embrioni P.10.732.M.01). In particolare si richiama l'attenzione sulla possibilità (<10%) che gli embrioni non sopravvivano alla procedura di congelamento; in questo caso è possibile che embrioni diagnosticati "sani" non siano comunque idonei al trasferimento in utero.

In base alla legge 40/2004, lo scongelamento ed il trasferimento in utero degli embrioni dovrà essere effettuato nel più breve tempo possibile e riguarderà gli embrioni ritenuti non affetti dalla patologia; gli altri embrioni resteranno crioconservati senza oneri per i pazienti.

5. Possibili risultati del test:

L'analisi delle cellule dell'embrione, relativamente alla sola patologia in esame e laddove la modalità di trasmissione sia autosomica recessiva, potrà evidenziare le seguenti configurazioni dell'embrione corrispondente:

- 1) Nessuna mutazione → embrione sano, può essere trasferito in utero;
- 2) Portatore di una sola mutazione (materna o paterna) → embrione sano (portatore sano della patologia), può essere trasferito in utero;
- 3) Portatore di due mutazioni (materna e paterna) → embrione affetto dalla patologia, non può essere trasferito in utero e deve rimanere congelato.

Si sottolinea la possibilità che la procedura si concluda senza possibilità di effettuare un trasferimento in utero di embrioni quando si verifichi una delle seguenti situazioni:

1. non vi sia nessun embrione vitale da sottoporre all'analisi
2. dall'analisi effettuata nessun embrione vitale risulti sano

6. Limiti del test:

Anche quando siano disponibili embrioni vitali da sottoporre al test genetico, si possono verificare delle condizioni sfavorevoli, che rappresentano dei limiti della procedura di analisi:

- 1- esiste il rischio, pari a circa il 5% per ogni embrione analizzato, di non ottenere un risultato informativo dall'analisi genetica (**assenza di diagnosi conclusiva per i singoli embrioni**).
- 2- esiste il rischio di **errore diagnostico** insito nella procedura (dovuto a contaminazioni, mosaicismi,...): in tale evenienza, l'analisi genetica potrebbe diagnosticare come "sano" un embrione che è in realtà affetto dalla patologia. Questo rischio di errore è stimabile intorno all'1% (Eshre PGD consortium data collection VII, 2008). **Per questo motivo, si consiglia di eseguire comunque procedure di diagnosi prenatale (ad esempio villocentesi o amniocentesi) per l'accertamento della situazione genetica dell'embrione qualora la procedura andasse a buon fine e si sviluppasse la gravidanza.**



È importante ricordare che l'assenza della patologia per cui viene richiesta l'analisi non può assicurare che l'embrione non sia portatore di altre malattie genetiche, anomalie cromosomiche o di predisposizioni alle malformazioni: **lo scopo della procedura è quello di individuare embrioni non affetti dalla sola patologia in esame.**

7. Costi

Alcuni farmaci necessari per eseguire la stimolazione della superovulazione non sono a carico del Sistema Sanitario Nazionale e sono quindi a carico della coppia (tale somma è in genere di circa 200-300 euro a ciclo). I costi di fatto sono assimilabili a quelli di una normale procedura di fecondazione in vitro.

Qualora gli ovociti a disposizione fossero in numero superiore a quello ritenuto idoneo all'inseminazione, è possibile congelare gli ovociti soprannumerari per un successivo utilizzo. In questo caso è previsto un costo per la coppia pari a 300 euro, che comprende la conservazione triennale degli ovociti.

8. Ulteriori informazioni riguardo la procedura:

Vi ricordiamo che la diagnosi pre-impianto non sostituisce la diagnosi prenatale. In particolare non evidenzia malformazioni o difetti non specificatamente ricercati.

Per avere l'esito dell'analisi molecolare pre-impianto, per discutere la diagnosi prenatale e per la possibilità di effettuare il cariotipo del feto, potete prendere contatto con il servizio di Genetica Medica.

9. Consenso informato ulteriore

Per quanto attinente alle implicazioni legali, ai rischi ed alle possibilità di successo della procedura, si rimanda al consenso informato standard della Fecondazione in vitro che dovrà essere anch'esso completato e firmato da entrambi i partner prima di iniziare i trattamenti.

Ho compreso le informazioni ricevute relative al test?

☐ SÌ

☐ Ho chiesto ulteriori chiarimenti

A chi chiedere ulteriori informazioni: Dott.

Tel:



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968



DICHIARAZIONE DI CHI HA ILLUSTRATO L'INFORMATIVA

Io sottoscritto/a dichiaro di aver informato i componenti della coppia sul test, assicurandomi della loro comprensione, di aver risposto ad ogni domanda e di prendere atto della loro libera decisione di seguito espressa.

Data/...../.....

Firma

FIRMA DI CHI HA RICEVUTO L'INFORMATIVA

I sottoscritti e
dichiarano di aver ricevuto informazioni che ci hanno permesso di comprendere il test, anche alla luce degli ulteriori chiarimenti da noi richiesti.

Data/...../.....

Firma Firma

Firma dell'eventuale mediatore culturale

ESPRESSIONE DEL CONSENSO

Vi viene qui richiesto di dichiarare o di rifiutare il Vostro consenso alla procedura di diagnosi genetica pre impianto sugli embrioni.

Il mancato consenso impedirà l'esecuzione dell'analisi.

In ogni caso Voi potrete comunque, in qualsiasi momento successivo, ritirare il consenso precedentemente espresso.

I sottoscritti e
valutate le informazioni ricevute,

☐ ACCONSENTONO

☐ NON ACCONSENTONO

all'esecuzione del test.

Data/...../.....

Firma Firma

Firma dell'eventuale mediatore culturale

REVOCA DEL CONSENSO ALLA PROCEDURA

Data/...../.....

Firma Firma

Firma dell'operatore sanitario che ha raccolto la revoca del consenso.....

Firma dell'eventuale mediatore culturale



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968

Sistema Sanitario



Regione
Lombardia



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

CODICE M..CONS
DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO
DI PATOLOGIA
MONOGENICA X-LINKED RECESSIVA

REV. 0 DEL 28.03.2014
PAGINA 1 DI 4

VERIFICA:
APPROVAZIONE:

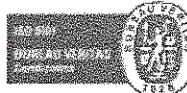
U.O.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita
Dott. E. Somigliana
Tel: 02 55034311

CONSENSO INFORMATO per la procedura:
DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO DI PATOLOGIA MONOGENICA X-LINKED
RECESSIVA

Responsabili U.O.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita Dott. E. Somigliana Tel: 02 55034311 U.O.S.D. Genetica Medica Dott.ssa F. Lalatta Tel: 02 55032321 U.O.S. Laboratorio di Genetica Medica Dott.ssa M. Seia Tel: 02 55032433	<p><i>Gentili Signori</i></p> <p><i>in vista della scelta riguardo alla diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica X-LINKED recessiva è importante che vi siano dei momenti in cui confrontarsi e ricevere tutte le informazioni necessarie al fine di decidere in modo consapevole. Questa informazione al consenso per la procedura di diagnosi genetica pre-impianto di patologia monogenica X-LINKED recessiva viene presentata a:</i></p> <p>Signora COGNOME: _____ NOME: _____ DATA DI NASCITA: _____ LUOGO DI NASCITA: _____</p> <p>Signore COGNOME: _____ NOME: _____ DATA DI NASCITA: _____ LUOGO DI NASCITA: _____</p> <p>dal dott./dott.ssa: COGNOME _____ NOME _____ ENTE DI APPARTENENZA: _____</p>
--	--

1. Condizioni/motivazioni cliniche per cui si propone la procedura:

La Vostra coppia è affetta da infertilità a componente
e siete portatori di una o più mutazioni geniche che aumentano il Vostro rischio, rispetto alla popolazione generale, di avere dei figli affetti dalla seguente malattia
Le caratteristiche di questa patologia ed i rischi di trasmissione alla prole sono stati affrontati e compresi nel corso di una o più consulenze effettuate dal medico genetista.
Il programma di fecondazione a cui avete chiesto di sottoporvi comporta la produzione in vitro di



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano - Telefono 02 5503.1 - Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968

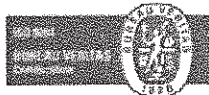
embrioni, le cui proprietà genetiche non sono diagnosticabili con le procedure standard. Avete richiesto pertanto, ai sensi della legge 40/2004, art.14 comma 5, di procedere con il programma di diagnosi genetica pre-impianto per conoscere lo stato di salute degli embrioni vitali che saranno eventualmente disponibili. In particolare, il programma prevede di indagare, mediante biopsia di alcune cellule dell'embrione, la presenza o l'assenza delle mutazioni che, nella vostra coppia, possono causare la patologia sopra indicata.

2. Aspetti biologici e finalità della diagnosi genetica pre-impianto

La biopsia di alcune cellule dell'embrione viene eseguita tra la 5° e la 6° giornata di sviluppo degli ovociti fecondati e non è ritenuta dannosa per il successivo sviluppo dell'embrione stesso.

Nella quinta/sesta giornata di sviluppo, gli embrioni vitali raggiungono lo stadio di blastocisti (embrione al 5°- 6° giorno di sviluppo dopo la fecondazione) e sono formati da centinaia di cellule: in questa fase di sviluppo è possibile ottenere 5-20 cellule che saranno prelevate dallo strato più esterno della blastocisti, il trofoectoderma, e verranno utilizzate per l'analisi genetica. Questo approccio è caratterizzato da un basso rischio di compromettere lo sviluppo embrionario in quanto dal trofoectoderma origineranno gli annessi embrionali (placenta, sacco vitellino) e non il feto: per questo motivo ci si riferisce talvolta ad una "villocentesi precoce". Tuttavia, solo una parte degli embrioni ottenuti può raggiungere lo stadio di blastocisti, utile per effettuare la diagnosi pre-impianto.

Nelle patologie a trasmissione X-linked recessiva, il gene di interesse è localizzato sul cromosoma X e viene trasmesso come carattere recessivo, manifestandosi generalmente nei maschi, mentre le femmine, che possiedono due cromosomi X, non manifestano la malattia ma possono esserne portatrici e trasmetterla ai figli. Ogni ovocita prelevato dalla partner femminile può contenere la versione ("allele") mutata oppure quella sana. Con la fecondazione si aggiunge una seconda copia del gene, portata dallo spermatozoo; in caso di feto maschio, l'ovocita conterrà una sola copia del gene di interesse. L'embrione maschio così formato potrà quindi aver ereditato dalla madre l'allele mutato ed essere affetto dalla patologia in esame o, viceversa, potrà avere ereditato l'allele sano e quindi non essere affetto dalla patologia in esame. In caso di feto femmina si avrà generalmente una condizione genetica di assenza di allele mutato o di presenza di un allele mutato di origine materna; in entrambi i casi il feto risulta non affetto. Lo specifico rischio per la vostra coppia vi è stato fornito in sede di consulenza genetica. Dal momento in cui l'embrione è formato da un numero sufficiente di cellule, è possibile prelevare ed analizzare alcune di queste cellule per capire quale combinazione di geni abbia ereditato l'embrione da cui provengono.



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968



Lo scopo della procedura è quello di individuare embrioni non affetti dalla sola patologia in esame. Il principio della diagnosi pre-impianto è pertanto quello di definire se nell'embrione è presente una combinazione genetica associata – o meno- alla patologia di cui siete affetti/portatori.

3. Informazioni riguardo il percorso diagnostico e le condizioni di fattibilità:

La diagnosi pre-impianto sugli embrioni è possibile solo se avete iniziato un percorso multidisciplinare che prevede che si realizzino per voi alcune condizioni:

1. Richiesta di accertamento per la patologia di cui siete portatori, ai sensi dell'art. 14 comma 5, Legge 40/2004.
2. Rischio genetico accertato
3. Consulenza genetica
4. Consulenza psicologica
5. Consulenza ginecologica
6. Informazione completa sulla procedura diagnostica
7. Idoneità alla Fecondazione Assistita dichiarata dal medico del Centro Referente
8. Presenza di embrioni vitali nel giorno previsto per la biopsia delle cellule (blastocisti).

4. Metodologia

A seguito della richiesta della coppia, gli embrioni vitali ottenuti in un programma di fecondazione in vitro ed idonei alla diagnosi pre-impianto saranno sottoposti a biopsia di alcune cellule tra la quinta e la sesta giornata di sviluppo post-inseminazione. Per l'accesso alla procedura di fecondazione in vitro è prevista la sottoscrizione di apposito consenso informato ("consenso informato ICSI P.11.732.M.04) di cui il presente consenso informato rappresenta una integrazione. *Il numero di embrioni disponibile per l'analisi genetica pre-impianto non è prevedibile a priori: è possibile che al termine della procedura di fecondazione in vitro non ci siano embrioni disponibili per la diagnosi. Ciò può essere dovuto a molteplici situazioni elencate, solo in parte, qui di seguito: non si sia prelevato alcun ovocita idoneo all'inseminazione; l'inseminazione in vitro non abbia prodotto alcun embrione; non ci sia stato lo sviluppo di embrioni idonei al trasferimento in utero.*

Tutti gli embrioni vitali ottenuti nella giornata individuata per la biopsia saranno sottoposti a biopsia di una o più cellule e congelati in azoto liquido, in attesa del risultato del test genetico. È necessario che la coppia sottoscriva a tale proposito il consenso informato specifico (Consenso



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968



informato alla Crioconservazione degli embrioni P.10.732.M.01). In particolare si richiama l'attenzione sulla possibilità (<10%) che gli embrioni non sopravvivano alla procedura di congelamento; in questo caso è possibile che embrioni diagnosticati "sani" non siano comunque idonei al trasferimento in utero.

In base alla legge 40/2004, lo scongelamento ed il trasferimento in utero degli embrioni dovrà essere effettuato nel più breve tempo possibile e riguarderà gli embrioni ritenuti non affetti dalla patologia; gli altri embrioni resteranno crioconservati senza oneri per i pazienti.

5. Possibili risultati del test:

L'analisi delle cellule dell'embrione, relativamente alla sola patologia in esame e laddove la modalità di trasmissione sia X-linked recessiva, potrà evidenziare le seguenti configurazioni dell'embrione corrispondente:

- 1) Nessuna mutazione → embrione sano, può essere trasferito in utero;
- 2) Portatore di una sola mutazione in cariotipo femminile → embrione sano (portatore sano della patologia), può essere trasferito in utero;
- 3) Portatore di una sola mutazione in cariotipo maschile → embrione affetto dalla patologia, non può essere trasferito in utero e deve rimanere congelato.
- 4) Portatore di due mutazioni (materna e paterna) in cariotipo femminile → embrione affetto dalla patologia, non può essere trasferito in utero e deve rimanere congelato.

Si sottolinea la possibilità che la procedura si concluda senza possibilità di effettuare un trasferimento in utero di embrioni quando si verifichi una delle seguenti situazioni:

1. non vi sia nessun embrione vitale da sottoporre all'analisi
2. dall'analisi effettuata nessun embrione vitale risulti sano

6. Limiti del test:

Anche quando siano disponibili embrioni vitali da sottoporre al test genetico, si possono verificare delle condizioni sfavorevoli, che rappresentano dei limiti della procedura di analisi:

- 1- esiste il rischio, pari a circa il 5% per ogni embrione analizzato, di non ottenere un risultato informativo dall'analisi genetica (**assenza di diagnosi** conclusiva per i singoli embrioni).
- 2- esiste il rischio di **errore diagnostico** insito nella procedura (dovuto a contaminazioni, mosaicismi,...): in tale evenienza, l'analisi genetica potrebbe diagnosticare come "sano" un embrione che è in realtà affetto dalla patologia. Questo rischio di errore è stimabile intorno all'1% (Eshre PGD consortium data collection VII, 2008). **Per questo motivo, si consiglia di eseguire comunque procedure di diagnosi prenatale (ad esempio villocentesi o amniocentesi) per**



l'accertamento della situazione genetica dell'embrione qualora la procedura andasse a buon fine e si sviluppasse la gravidanza.

È importante ricordare che l'assenza della patologia per cui viene richiesta l'analisi non può assicurare che l'embrione non sia portatore di altre malattie genetiche, anomalie cromosomiche o di predisposizioni alle malformazioni: **lo scopo della procedura è quello di individuare embrioni non affetti dalla sola patologia in esame.**

7. Costi

Alcuni farmaci necessari per eseguire la stimolazione della superovulazione non sono a carico del Sistema Sanitario Nazionale e sono quindi a carico della coppia (tale somma è in genere di circa 200-300 euro a ciclo). I costi di fatto sono assimilabili a quelli di una normale procedura di fecondazione in vitro.

Qualora gli ovociti a disposizione fossero in numero superiore a quello ritenuto idoneo all'inseminazione, è possibile congelare gli ovociti soprannumerari per un successivo utilizzo. In questo caso è previsto un costo per la coppia pari a 300 euro, che comprende la conservazione triennale degli ovociti.

8. Ulteriori informazioni riguardo la procedura:

Vi ricordiamo che la diagnosi pre-impianto non sostituisce la diagnosi prenatale. In particolare non evidenzia malformazioni o difetti non specificatamente ricercati.

Per avere l'esito dell'analisi molecolare pre-impianto, per discutere la diagnosi prenatale e per la possibilità di effettuare il cariotipo del feto, potete prendere contatto con il servizio di Genetica Medica.

9. Consenso informato ulteriore

Per quanto attinente alle implicazioni legali, ai rischi ed alle possibilità di successo della procedura, si rimanda al consenso informato standard della Fecondazione in vitro che dovrà essere anch'esso completato e firmato da entrambi i partner prima di iniziare i trattamenti.

Ho compreso le informazioni ricevute relative al test?

☐ SI

☐ Ho chiesto ulteriori chiarimenti

A chi chiedere ulteriori informazioni: Dott.
Tel:



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968



DICHIARAZIONE DI CHI HA ILLUSTRATO L'INFORMATIVA

Io sottoscritto/a dichiaro di aver informato i componenti della coppia sul test, assicurandomi della loro comprensione, di aver risposto ad ogni domanda e di prendere atto della loro libera decisione di seguito espressa.

Data/...../.....

Firma

FIRMA DI CHI HA RICEVUTO L'INFORMATIVA

I sottoscritti e
dichiarano di aver ricevuto informazioni che ci hanno permesso di comprendere il test, anche alla luce degli ulteriori chiarimenti da noi richiesti.

Data/...../.....

Firma Firma

Firma dell'eventuale mediatore culturale

ESPRESSIONE DEL CONSENSO

Vi viene qui richiesto di dichiarare o di rifiutare il Vostro consenso alla procedura di diagnosi genetica pre impianto sugli embrioni.

Il mancato consenso impedirà l'esecuzione dell'analisi.

In ogni caso Voi potrete comunque, in qualsiasi momento successivo, ritirare il consenso precedentemente espresso.

I sottoscritti e
valutate le informazioni ricevute,

☐ ACCONSENTONO

☐ NON ACCONSENTONO

all'esecuzione del test.

Data/...../.....

Firma Firma

Firma dell'eventuale mediatore culturale

REVOCA DEL CONSENSO ALLA PROCEDURA

Data/...../.....

Firma Firma

Firma dell'operatore sanitario che ha raccolto la revoca del consenso.....

Firma dell'eventuale mediatore culturale



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968





ISTRUZIONI OPERATIVE PER DIAGNOSI PREIMPIANTO DI PATOLOGIA MONOGENICA AUTOSOMICA RECESSIVA SU EMBRIONE (PGD)

1. SCOPO	1
2. CAMPO DI APPLICAZIONE	2
3. RIFERIMENTI	2
4. RESPONSABILITA'	2
5. MODALITA' DI GESTIONE	2
5.1 PREMESSA: LA DIAGNOSI GENETICA PRE-FECONDAZIONE	2
5.2 BACINO D'UTENZA	3
5.3 PROTOCOLLO OPERATIVO	3
5.3.1 Indicazioni all'analisi.	3
5.3.2 Modalità di accesso al test genetico.	3
5.3.3 MATERIALE.....	3
5.3.4 ACCETTAZIONE.....	3
5.3.5 ESTRAZIONE.....	4
5.3.6 STOCCAGGIO DEL DNA	4
5.4 ITER DIAGNOSTICO	4
5.4.1 PERCORSO FATTIBILITA'.....	6
5.4.2 DIAGNOSI PRE-FECONDAZIONE SU PRIMO GLOBULO POLARE.....	7
5.5 METODICHE DI LABORATORIO ASSOCIATE ALLO STUDIO DEI CASI SPECIFICI	8
5.6 INTERPRETAZIONE RISULTATI OTTENUTI E REFERTAZIONE.	8
5.7 CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE.....	8

redazione	verifica	Approvazione (firma e data)	Rev.	Descrizione modifica
Manuela Seia		10.10.2014	0	/





1. SCOPO

Scopo di questa procedura è la messa in atto delle varie operazioni da svolgere quotidianamente e relative alla gestione delle analisi molecolari per Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD) su embrione, al fine di fornire un servizio adeguato alle necessità diagnostiche e terapeutiche, in linea con il miglioramento continuo della qualità.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura si applica nel Laboratorio di Embriologia - Centro Sterilità di Coppia e nel Laboratorio di Genetica Medica – Settore di Genetica Molecolare.

3. RIFERIMENTI

P.701.500.G Gestione del Processo

P.701.500.G All.1 Manuale Metodiche

P.001.500 Gestione Strumenti e Apparecchiature di Laboratorio

P.008.500 Gestione delle Non Conformità di Laboratorio

IO.701.500.G Sequenziatore ABI PRISM 3130 XL

P. Diagnosi Genetica Preimpianto

Procedura Generale del Sistema Qualità – “Raccomandazioni per l'elaborazione e l'adozione di linee guida, percorsi diagnostici terapeutici e protocolli operativi in ambito clinico”

Autorizzazione del Garante del 22 Febbraio 2007, relativa al trattamento dei dati genetici

Legge 196/2003 relativa al trattamento dei dati sensibili.

4. RESPONSABILITA'

La responsabilità diagnostica associata all'analisi genetica dell'embrione è di competenza del personale candidato alla Diagnosi Genetica Preimpianto ed, in particolare, al referente della conduzione degli iter diagnostici. I referti delle indagini molecolari per la Diagnosi Genetica Preimpianto riportano quindi la firma del referente per le analisi della PGD e la firma del responsabile del laboratorio di Genetica Medica.

5. MODALITA' DI GESTIONE

5.1 PREMESSA: LA DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO (PGD)

Il principio della PGD è quello di diagnosticare la presenza del gene-malattia nelle cellule del trofoectoderma dell'embrione senza compromettere il suo normale sviluppo.

Tale procedura si inserisce nel percorso al termine della coltura embrionaria, prima dell'embryo transfer, cioè al 5° o 6° giorno a partire dal pick up ovocitario (giorno 0). In questa fase vengono selezionati gli embrioni vitali che abbiano raggiunto lo stadio di blastocisti. Dal momento della PGD, la coltura degli embrioni viene effettuata singolarmente. Gli embrioni, sottoposti a biopsia delle cellule per PGD, vengono crioconservati in attesa del risultato dell'analisi genetica; ne





LABORATORIO CENTRALE ANALISI
CHIMICO CLINICHE E MICROBIOLOGIA
U.O.S. LABORATORIO GENETICA MEDICA
SETTORE: GENETICA MOLECOLARE

consegue che le coppie debbano sottoscrivere anche il "Consenso informato alla crioconservazione degli embrioni" (cfr. Procedura "Crioconservazione di gameti ed embrioni").

5.2 BACINO D'UTENZA

La diagnosi preimpianto può essere applicata a coppie portatrici di malattie monogeniche a trasmissione autosomica recessiva (beta-talassemia, fibrosi cistica).

Criteri di accesso: la diagnosi preimpianto su embrione è possibile solo se la coppia ha eseguito un percorso informativo definito in tre colloqui (consulenza genetica, consulenza ginecologica, consulenza psicologica) e se ha autorizzato tale percorso, ponendo la firma ai consensi informati.

5.3 PROTOCOLLO OPERATIVO

5.3.1 Indicazioni all'analisi.

Le indicazioni di accesso al test sono:

- Coppie portatrici di malattie monogeniche a trasmissione autosomica recessiva

5.3.2 Modalità di accesso al test genetico.

Alle coppie richiedenti interne ed esterne vengono forniti:

- modulo di accettazione specifico di patologia da compilarsi a cura dello specialista che tiene il colloquio (M.709.500.G Scheda accettazione campioni FC; M.724.500.G Richiesta analisi Talassemia)
- consenso informato per il paziente

5.3.3 MATERIALE

Si possono ricevere:

- provette da circa 3-4 ml di sangue intero prelevato in EDTA.
- cellule del trofoectoderma dell'embrione in provetta da 0.5ml contenente buffer di lisi specifico.

5.3.4 ACCETTAZIONE

I campioni devono pervenire direttamente al Laboratorio di Genetica Molecolare accompagnati dalla modulistica compilata (M.723.500.G **RICHIEDITA ANALISI GENETICA PREIMPIANTO SU EMBRIONE**) e corredati da consenso informato firmato (M.cons). I dati contenuti nella scheda di accompagnamento sono registrati sul apposito Registro Accettazione Embrione.

Per ogni campione di sangue viene estratto il DNA e la provetta originale viene congelata a -20°C in freezer dedicato. Le provette di DNA estratto, riportanti l'anagrafica e il codice identificativo del Laboratorio di Genetica Molecolare sono conservate a 4°C in frigo dedicato.

Le cellule del trofoectoderma dell'embrione e i relativi controlli vengono risposti in una apposita scatola in un freezer -20° dedicato.

Tutte le informazioni dei pazienti sono registrate su database (percorso da Documentale →Archivio Molecolare →Database Archivio Diagnosi Preimpianto).





LABORATORIO CENTRALE ANALISI
CHIMICO CLINICHE E MICROBIOLOGIA
U.O.S. LABORATORIO GENETICA MEDICA
SETTORE: GENETICA MOLECOLARE

5.3.5 ESTRAZIONE

L'estrazione del DNA da sangue periferico viene eseguita mediante estrattore automatico o kit commerciale.

La lisi che permette l'estrazione di DNA dalle cellule del trofoectoderma dell'embrione viene eseguita contemporaneamente all'amplificazione.

Tutte le metodiche sono descritte nel Manuale Metodiche P.701.500.G.All.1

5.3.6 STOCCAGGIO DEL DNA

Una volta estratti e registrati, i DNA vengono ordinati e riposti in scatole tipo NALGENE numerate in modo progressivo. La scatola viene tenuta in frigorifero a 4°C sino a fine scatola o comunque sino a fine analisi. Le scatole completate vengono numerate in ordine progressivo e recano l'intervallo di campioni in esse contenuti e conservate nel freezer -20°C dedicato.

Esempio: scatola 1 1/11 → 63/11

5.4 ITER DIAGNOSTICO

La diagnosi genetica reimpianto su embrione è possibile solo se la coppia ha eseguito un percorso informativo definito in tre colloqui: consulenza genetica, consulenza ginecologica, consulenza psicologica.

Consulenza genetica

Attraverso questo primo colloquio ci si propone di:

- illustrare le caratteristiche della malattia ed i rischi di trasmissione alla prole
- verificare il rischio genetico e la fattibilità della diagnosi per la patologia genetica
- informare sulla procedura diagnostica (metodica e limiti connessi)
- raccogliere il consenso informato

Una volta ottenuta l'adesione alla metodica da parte della coppia si procede ad una verifica della fattibilità alla diagnosi molecolare, valutata in base all'informatività di marcatori polimorfici e identificazione o conferma delle mutazioni responsabili della malattia nella famiglia in esame.

Consulenza ginecologica

Attraverso questo secondo colloquio ci si propone di:

- verificare l'idoneità alla Fecondazione Assistita
- informare sul processo di fecondazione in vitro

Consulenza psicologica

Attraverso questo terzo colloquio ci si propone di:

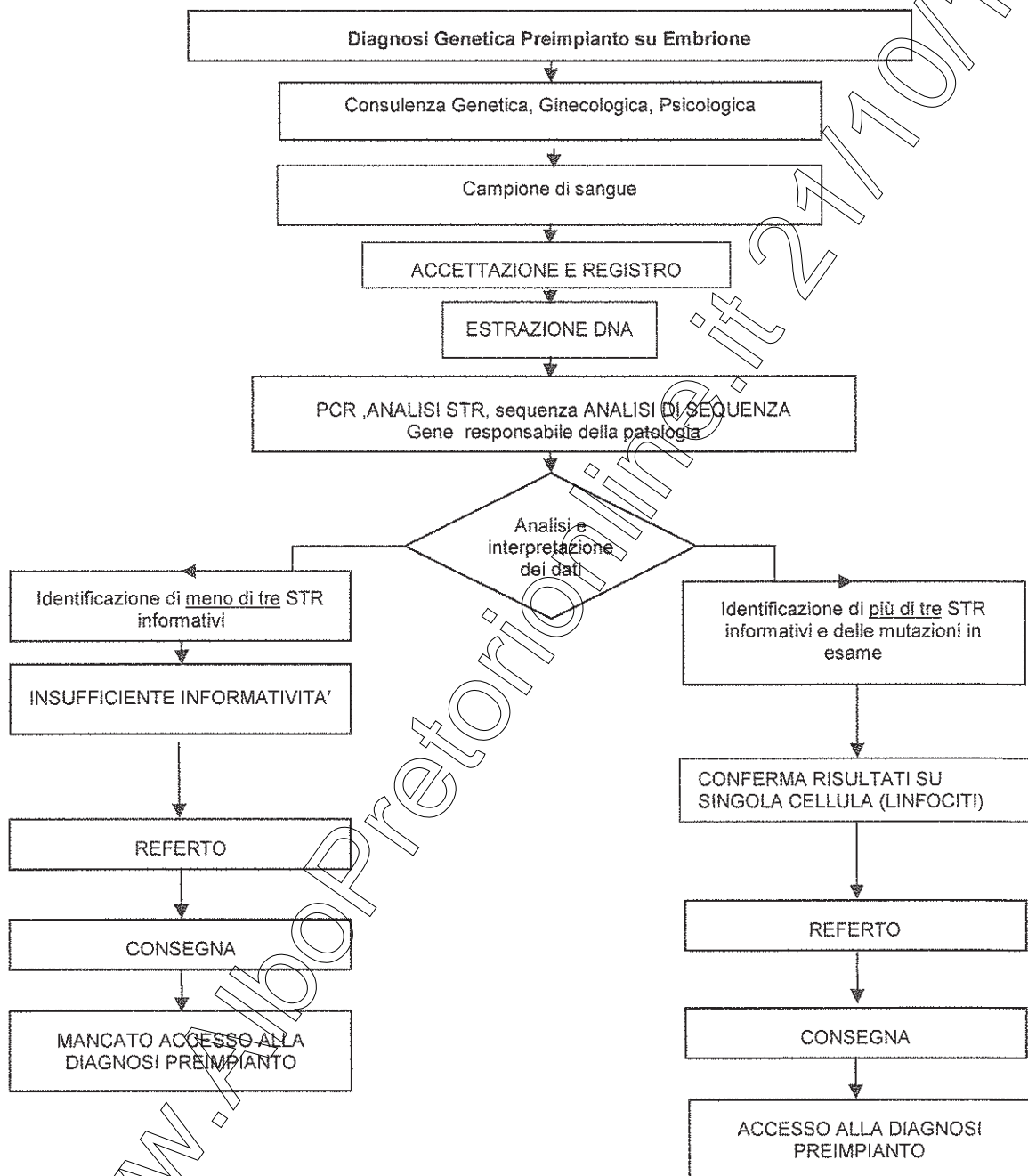
- verifica della sterilità su base psicologica

In base alla richiesta del medico richiedente e al caso specifico vengono seguiti i seguenti ITER DIAGNOSTICI.



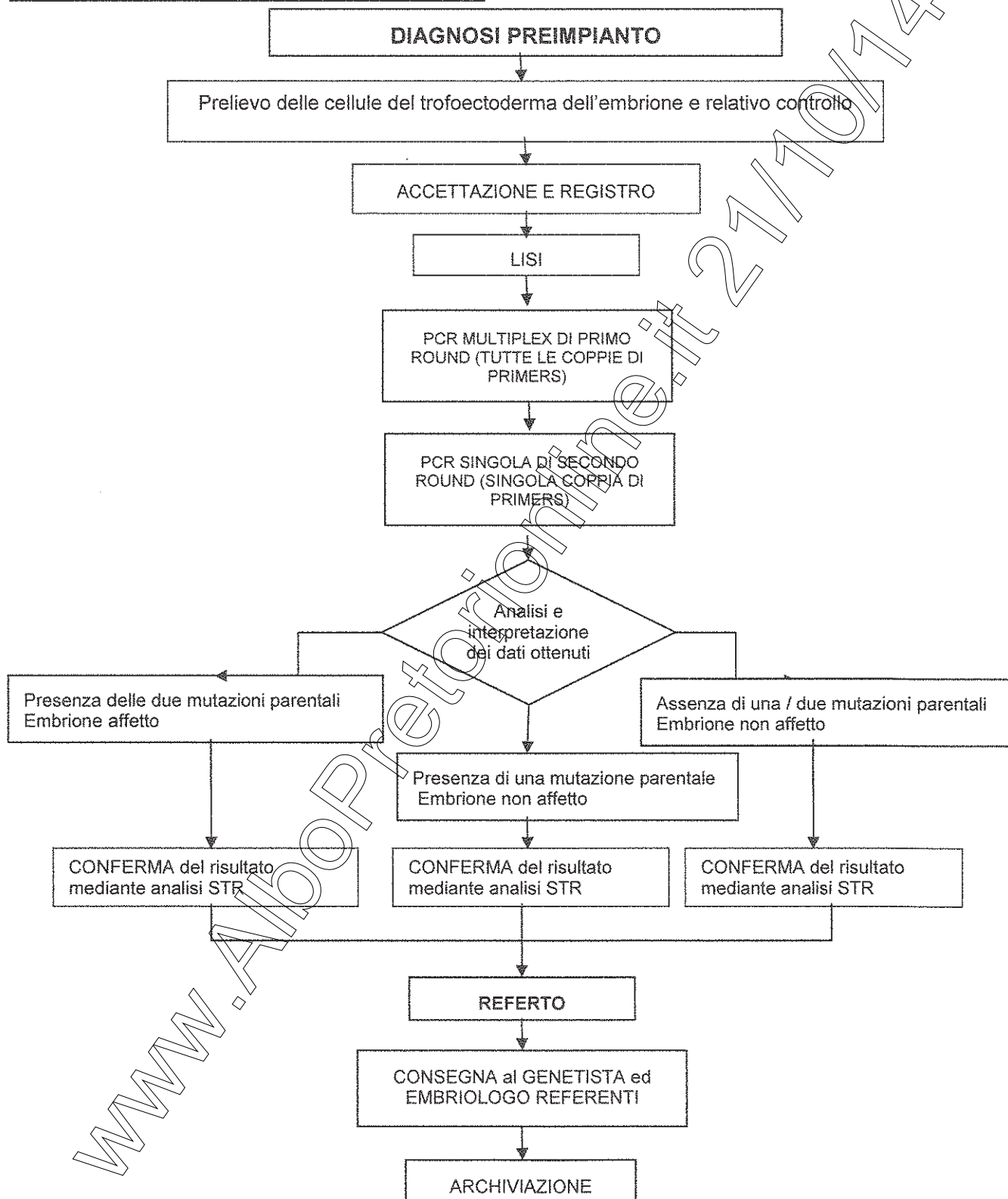


5.4.1 PERCORSO FATTIBILITA'





5.4.2 DIAGNOSI PRE-FECONDAZIONE SU EMBRIONE





5.5 METODICHE DI LABORATORIO ASSOCIATE ALLO STUDIO DEI CASI SPECIFICI

Vedi P.701.500.G All.1 Manuale Metodiche – Capitolo 13.

- Analisi genetica su singola cellula
- Analisi STR tramite fluorescent PCR
- Analisi mutazioni tramite sequenziamento del DNA

• 5.6 INTERPRETAZIONE RISULTATI OTTENUTI E REFERTAZIONE.

La lettura dei frammenti STR (elettroferogrammi) e l'interpretazione dei risultati viene eseguita in doppio manualmente.

I risultati delle analisi, con date e riferimenti per la tracciabilità del dato, vengono registrati sul foglio di lavoro in cartella paziente cartacea e sulla versione informatizzata a conclusione dell'iter diagnostico prima o durante la refertazione.

I risultati dei test genetici vengono refertati e archiviati, secondo quanto specificato nel Processo (P.701.500.G) e inviati al genetista richiedente che si prende carico di avvisare e consulente la coppia.

Viene prodotto un referto unico per ciascuna coppia richiedente l'analisi di fattibilità al programma di PGD.

Per ogni prelievo di ovociti (pick up) è prodotto un referto cumulativo contenente i risultati molecolari di ogni singolo globulo polare.

La stampa dei referti avviene attraverso l'applicazione del programma informatico in uso.

5.7 CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni di sangue vengono conservati fino al controllo postnatale e stoccati nel -20°C dedicato in sacchetti divisi per anno [Tutti i DNA sono conservati sino a esaurimento, salvo diversa indicazione del paziente espressa nel consenso informato al trattamento dati genetici (P.18.F.M.02)].

I campioni di cellule del trofoectoderma amplificate sono conservati sino al controllo postnatale in frigorifero dedicato e sono stoccati in scatole tipo NALGENE numerate in modo progressivo (es. 1, 2 ecc). La tracciabilità dei campioni è garantita dalla registrazione su apposito modulo (M.719.500.G Registrazione Stoccaggio DNA) compilato nella cartella (P:\Archivio Molecolare\database- Diagnosi Preimpianto).





FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

LABORATORIO CENTRALE ANALISI
CHIMICO CLINICHE E MICROBIOLOGIA

U.O. S. LABORATORIO GENETICA MEDICA
SETTORE: GENETICA MOLECOLARE

M.723.500.G
RICHIESTA ANALISI GENETICA
PREIMPIANTO SU EMBRIONE
REV. 0. DEL 10/10/2014.
PAGINA 1 DI 1

VERIFICA: RQS S.T.
APPROVAZIONE: RUOS M.S.

RICHIESTA ANALISI GENETICA PREIMPIANTO SU EMBRIONE

Settore Genetica Molecolare
Referente: Dr.ssa Alice Biffignandi

Segreteria Tel. 0255032433 – fax 0255032277- e-mail laboratorio.genetica@policlinico.mi.it

Data arrivo Il medico richiedente

Nome e Cognome Data di

Indirizzo Telefono

Nome e Cognome Coniuge

Richiesta diagnosi preimpianto per:

Data biopsia Numero embrioni recuperati

Eseguita da

Embrione N.	Etichetta embrione	Etichetta controllo	commenti



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004
via Francesco Sforza, 28 – 20122 Milano – Telefono 02 5503.1 – Fax 02 58304350
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968

Sistema Sanitario



Regione
Lombardia