

# מנהל רפואה

חוזר מס' : 50/2006

ירושלים, כ"ט כסלו תשס"ז  
20 דצמבר 2006

תיק מס' : 14/1/4 א'

אל: מנהלי בתי החולים הכלליים  
מנהלי האגפים הרפואיים – קופות החולים  
מנהלי המחלקות לגינקולוגיה  
מנהלי היחידות להפריה חוץ גופית (I.V.F)  
מנהלי המכונים לגנטיקה

הנדון: הנחיות לביצוע אבחנה גנטית טרום השרשה  
(Preimplantation Genetic Diagnosis) PGD

רצ"ב ההנחיות לביצוע אבחנה גנטית טרום השרשה (Preimplantation Genetic Diagnosis) PGD  
כפי שהומלצו ע"י המועצה הלאומית לרפואת נשים נאונטולוגיה וגנטיקה.

הנחיות אלה הוכנו ע"פ בקשת הוועדה המשותפת של המועצה הלאומית לביואתיקה  
והוועדה העליונה לניסויים רפואיים בבני אדם.

ההנחיות עוסקות בעניינים טכניים ואינן עוסקות בהיבטים אתיים, חברתיים ואחרים.

הואילו להעביר תוכן חוזר זה ליריעת כל הנוגעים בדבר במוסדכם.

בברכה,  
ד"ר מיכאל דור  
מ"מ ראש מינהל רפואה

העתק : המנהל הכללי  
המשנה למנהל הכללי  
יו"ר המועצה הלאומית לגנטיקה, נאונטולוגיה ורפואת נשים.  
יו"ר המועצה הלאומית לביואתיקה

יו"ר הוועדה העליונה לניסויים רפואיים בבני אדם  
המדען הראשי  
ס/מנכ"ל להסברה ויחסים בינלאומיים  
ראש המינהל לטכנולוגיות רפואיות ותשתיות  
נציב קבילות הציבור  
נציב קבילות הציבור ע"פ חוק ביטוח בריאות ממלכתי  
היועצת המשפטית  
אחות ראשית ארצית וראש מינהל הסיעוד  
ראש שרותי בריאות הציבור  
רופאי מחוזות – לשכות בריאות מחוזיות  
מנהל האגף למדיניות טכנולוגיות רפואיות  
מנהל אגף רישוי מוסדות ומכשירים רפואיים  
מנהל האגף לרפואה כללית  
מנהלת האגף להבטחת איכות  
מנהל אגף ביקורת פנים  
מנכ"ל קופות החולים  
מנהל המחלקה לרפואה קהילתית  
מנהל תחום מינהל ומשק  
מנהל המחלקה לגנטיקה קהילתית  
מנהל המחלקה למעבדות  
מרכזת המועצות הלאומיות  
הספרייה הרפואית  
אחראית ארצית על הסיעוד – ברפואה כללית  
אחות ראשית – קופ"ח הכללית  
קרפ"ר – צ.ה.ל  
רע"ן רפואה- מקרפ"ר  
קרפ"ר – שרות בתי הסוהר  
קרפ"ר – משטרת ישראל  
מנכ"ל הסתדרות מדיצינית – "הדסה"  
רכז הבריאות , אגף תקציבים – משרד האוצר  
יו"ר ההסתדרות הרפואית בישראל  
יו"ר ארגון רופאי המדינה  
יו"ר המועצה המדעית – ההסתדרות הרפואית  
מנכ"ל החברה לניהול סיכונים ברפואה  
בית הספרים הלאומי והאוניברסיטאי  
ארכיון המדינה

כתובת אתר האינטרנט בו מפורסמים חוזרי מינהל הרפואה וחוזרי  
מנכ"ל היא: - [www.health.gov.il](http://www.health.gov.il)

## הערה כללית

הועדה המשותפת של המועצה הלאומית לביואתיקה, והועדה העליונה לניסויים רפואיים בבני אדם לנושא אבחון טרום השרשה בישראל דנה לאחרונה במכלול ההיבטים האתיים, החברתיים, הפילוסופיים והרפואיים של הנושא, ומסקנות מכך יפורסמו בקרוב, ויתווספו לנספח אמות המידה המצורף.

המסמך הנדון בזה על הקווים המנחים לאבחון טרום השרשה הינו רפואי בלבד, ונועד כדי להסדיר את הפעילות המתבצעת בשטח מזה זמן.

## קוים מנחים לבצוע אבחון גנטי טרום השרשה

### **Guidelines for Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD)**

#### **1. הקדמה:**

אבחון גנטי טרום-השרשה – PGD תואר לראשונה בשנת 1990 (Verlinski et al, 1990; ) על מנת לאפשר הריונות של צאצאים בריאים בלבד, ולמנוע את הצורך בהפסקות הריון, המהוות בעיה עבור זוגות רבים על רקע דתי/אתי/מוסרי. אבחון גנטי טרום השרשה-PGD נחשב כיום כאחת מהאפשרויות הפרקטיות הקיימות כדי לאפשר לזוגות שבסיכון-יתר להימנע מלידת צאצא עם ליקוי כרומוזומי או מחלה גנטית. למרות מידת החדשנות של טכניקה זו, מהווה ה-PGD כבר כיום אלטרנטיבה לבדיקות האבחון הטרומ-לידתיות, וע"י כך, מאפשר להשיג הריונות של עוברים בריאים, ולמנוע את הצורך בהפסקות הריון. אמות המידה לביצוע של PGD התרחבו כיום מעבר לאלו המוכרים במקרים של אבחון טרום-לידתי, כמו מחלות עם נטייה גנטית בעלות ביטוי מאוחר אצל האדם המבוגר או בדיקת סוג ה-HLA לפני השרשה כדי ללדת צאצא מתוך מטרה שישמש כתורם פוטנציאלי של תאי גזע לשם טיפול באחיו החולה. העובדה כי עד היום נולדו למעלה מ-1000 ילדים בריאים לאחר שעברו אבחון עם PGD (כ-7000 מחזורי PGD), מצביעה כי הטכנולוגיה אמינה. לא ברורה עדיין מידת ההשפעה ארוכת הטווח של טכנולוגיה זו על בריאות הילדים שנולדו לאחר ביופסיה של טרום-עוברים לצרכי PGD.

ניתן לחלק את ה-PGD לשתי קטגוריות עיקריות: (1) PGD לזוגות נשאים של מחלות גנטיות מונוגניות ו- (2) לזוגות שאחד מבני הזוג הינו נשא של טרנסלוקציה מאוזנת והנמצאים בסיכון גבוה ללידת צאצא לוקה. קיימת תמימות דעים לגבי היעילות, וההצדקה שבביצוע הליך PGD בזוגות אלו.

**(1) מטרה**

קווים מנחים אלו הוגדרו במטרה לקבוע רמת אמינות ודיוק גבוהים בביצוע PGD. קווים מנחים אלו קובעים אמות מידה מינימאליות לכל המרכזים העוסקים בתחום זה, ויש לעדכנם באופן תקופתי. עיקרו של מסמך זה, לאפשר למרכזים העוסקים ב-PGD לתת שרות רפואי ברמה גבוהה.

אין במסמך זה כדי לוודא תהליכי פעולה תקינים או להבטיח הצלחה בתהליך ה-PGD. בקביעת תהליך ודרכי פעולה על הקלינאי והמעבדה להפעיל שיקול דעת מקצועי בכל אחד מהשלבים בתהליך ה-PGD. קוים מנחים אלו מבוססים על הנחיות לביצוע PGD המקובלות בעולם [ראה פרק מסמכים ישימים], ואשר עובדו והותאמו לאוכלוסיה בישראל.

**(2) עקרונות**

מעבדות המבצעות בדיקות בתחום ה-PGD יאמצו ויפעלו על-פי קווים מנחים אלו. מעבדה בתחום ה-PGD שאמות מידה מינימאליות של קוים מנחים אלו אינם מתקיימים בה, לא תוכר על ידי משרד הבריאות.

**(3) מסמכים ישימים**

1. חוק זכויות החולה, התשנ"ו 1996 ס"ח תשנ"ו 252.
2. חוק מידע לגנטיקה, התשס"א-2000
3. קווים מנחים למעבדות לגנטיקה מולקולרית בישראל – חוזר מינהל רפואה 04/2002 - ינואר 2002
4. נייר עמדה- איגוד הגנטיקאים הרפואיים בישראל לעניין בדיקת FISH – 2005.

The PGD Int'l Society report- guidelines for good practice of <a href="http://www.rbmonline.com">www.rbmonline.com</a> 9(4) 430-434 - (2004) PGD	.5
Gianaroli L, Plachot M., van Kooij R et al. (2000) ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Human Reproduction 15, 2241-2246	.6
Standards Guidelines: Clinical Genetics Laboratories, Published by the American College of Medical Genetics, The Laboratory Practice Committee (1994)	.7
Promoting the safe and effective genetic testing in the United	.8

States, an NIH task force report, September 1997 (published on <a href="http://www.nhgri.nih.gov/ELSI/TFGT_finalline">www.nhgri.nih.gov/ELSI/TFGT_finalline</a> –	
---	--

Quality Guidelines and Standards for genetic laboratory's (1997) .9

Journal of Human Genetics 5:342-350

<http://BioMedNet.com/Karger>

College of American Pathologists Reproductive Laboratory 10

Accreditation Program. Standards for accreditation (2004)

[www.cap.org/apps/docs/laboratory\\_accreditation/rlap.html](http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/rlap.html)(

The Interface between Medically Assisted Reproduction 11

and Genetics: Technical, Social, Ethical and Legal issues.

European Society of Human Genetics and ESHRE - Joint

statement (Draft) June 5, 2005 – [www.eshg.org](http://www.eshg.org)

#### (4) הנוהל

קווים מנחים אלו יחולו על כל המעבדות המבצעות בדיקות PGD באדם בישראל

#### (5) הגדרות

##### א. כללי

1. **בדיקה גנטית מולקולרית** - בדיקה המתבססת על שיטות מולקולריות על

מנת לבדוק שינויים מולדים או נרכשים של הגנום האנושי – לשם אבחנה וטיפול בחולה או לגילוי מצב של נשאות של תכונות אשר עלולות להיות קשורות במצב של מחלה.

2. **בדיקת PCR** - (Polymerase Chain Reaction) - שיטה מהירה

ובטוחה המאפשרת לייצר מספר רב של מקטעי DNA ייחודיים של גן/ים. תהליך זה דרוש כדי לקבל כמות מספקת של חומר לגנטיקה לשם ביצוע בדיקה גנטית מולקולרית.

3. **בדיקת FISH** – (Fluorescence in situ hybridization) - בשיטה זו,

רצפי DNA ייחודיים המסומנים בגלאי פלורסצנטי עוברים היברידיזציה עם אתרים זהים להם ב-DNA.

הבדיקה מאפשרת לזהות הפרעות במספר הכרומוזומים (אנאפלואידיה, טרנסלוקציות ומיפוי גנים ייחודיים לכרומוזומים שונים). אבחון

באמצעות FISH הוכנס לשימוש לפני כ- 20 שנה ונחשב לשיטה אמינה ומקובלת. השיטה מאושרת ע"י FDA ואומצה ע"י ACMG כשיטת הבחירה במקרים הנ"ל.

4. **טרומ-עוברים** – (pre-embryos) - תוצרי ההפריה בטרם הושרשו ברחם.

## 6) ביסוס משפטי

1. תקנות בריאות העם (מעבדות רפואיות) – תיקון התשנ"ד 1994
  2. חוק זכויות החולה התשנ"ו - 1996
  3. חוק זכויות החולה, התשנ"ו 1996 ס"ח תשנ"ו 252
  4. חוק מידע לגנטיקה, התשס"א-2000
  5. חוזרי מנכ"ל משרד הבריאות:
- (א) 17/03 - בחירת מין ילוד בתהליכי IVF;
- (ב) 21/05 - מינוי ועדה ארצית לפי נוהל משרד הבריאות לברירת מין הילוד באבחון גנטי טרום השרשתי;

## 3. השיטה (גוף הנוהל)

### 1) כללי

תכנית PGD מחייבת שיתוף פעולה בין המכון לגנטיקה, היחידה להפריה תוך גופית ומעבדת PGD אבחנתית (מולקולרית ו/או ציטוגנטיקה), המבצעת את האבחון בתאים בודדים. הקשר בין הגופים הללו חייב להיות ברור, מעודכן ותחת בקרת איכות גבוהה. לפיכך יש להתייחס לאחריות של כל גוף בכל אחד משלבי התהליך, הכוללים:

1. יעוץ גנטי;
2. ייעוץ פריון;
3. בדיקת היתכנות האבחנה על ידי אנליזה גנטית של תאים בודדים בבני משפחה רלוונטיים;
4. השראת ביוץ, שאיבת ביציות, הפריה וגידול טרום-העוברים;
5. ביופסיית טרום-עוברים (בלסטומרים ו/או polar body);
6. אנליזה גנטית של טרום-עוברים;
7. החזרת טרום-עוברים בריאים לרחם האישה;
8. הקפאת טרום-עוברים עודפים באם נמצאו ראויים להקפאה;
9. אבחון טרום לידתי, מעקב הריון ותוצאות לידה.

### 2) יעוץ גנטי - באחריות המכון לגנטיקה

בהליך זה תיבדק ההצדקה הרפואית לביצוע PGD (לפי אמות המידה המובאות בנספח) ותיבדק ההיתכנות העקרונית של ביצוע PGD למחלה זו מבחינת היכולת להבדיל בתא בודד בין הגנוטיפים התקינים לבלתי-תקינים. יינתן הסבר לגבי שלבי התהליך, יתרונותיו, חסרונותיו ומגבלותיו. הזוגות יתנו את הסכמתם (הסכמה מדעת ומפורשת מראש) לביצוע התהליך על ידי חתימה על טפסי הסכמה אחידים וייחודיים (למשל, ל-PGD במחלות מונוגניות או PGD לטרנסלוקציות, כדוגמת הטפסים הערוכים על ידי הר"י ו-MCI). ההסכמה של הנבדקים צריך שתהיה ברורה, עם מידע מפורט על הסיכונים הכרוכים

בתהליך, ועל מידת הטעות המקובלת והצפויה כמו גם המלצות מקובלות (למשל-אודות דרכי אבחון טרום לידתיות במקרה של הריון).

### **3) ייעוץ פריון - באחריות היחידה ל-IVF**

בהליך זה ייבדק האם הזוג מתאים לעבור הפריה חוץ גופית. נבדקים בעלי תגובה ירודה (poor responders) יודעו אודות מידת סיכויי ההצלחה הנמוכים בתהליך. יינתן הסבר על שלבי ההפריה החוץ גופית, במיוחד בנבדקים ללא ליקויי פריון. יינתן הסבר על מידת הסיכון המקובלת בתהליך. יש להדגיש בפני אלה כי עליהם להשתמש באמצעי מניעה על מנת להימנע מהריון עצמוני. בכל מקרה של אבחון מולקולרי, על המטופלים לחתום על טופס הסכמה לטיפול בהפריה חוץ גופית עם מיקרומניפולציה (ICSI), גם בהעדר ליקויי פריון.

### **4) בדיקת היתכנות על ידי אנליזה גנטית של תאים בודדים בבני משפחה רלוונטיים**

#### ***באחריות מעבדת ה-PGD האבחנתית והמכון לגנטיקה.***

במחלות מונוגניות המאובחנות ב-PCR מומלץ לבצע בדיקה של כל הגנוטיפים האפשריים במשפחה (חולה, נשא, בריא ולא-נשא) בתאים בודדים (לויקוציטים, תאי חלב הפה, תאי זרע, וכו'). PGD יבוצע לאחר שנבדקו לפחות 10 תאים מכל גנוטיפ, ורק לאחר שהושגה מידת דיוק גבוהה המתבטאת בשיעור הגברה של מעל 95%, ושיעור allele drop (ADO) הנמוך מ-10% לכל אתר שנבדק. מומלץ לבסס את האבחנה על שימוש בסמנים פולימורפיים הנמצאים סמוך לאתר המוטציה, ו/או באמצעים אחרים שיאמתו את האבחנה במספר דרכים שונות ובלתי תלויות.

לצורך אבחון ליקויים כרומוזומיים ב-FISH, במיוחד באבחון טרנסלוקציות ייחודיות, יש להעמיד מערכת אבחון עבור כל משפחה. ניתן להשתמש בגלאים מסחריים או גלאים שפותחו במעבדה. יש לבדוק את הגלאים על תאים יחידים כדי להעריך את מידת האפקטיביות שלהם, במיוחד במקרה של גלאים שיוצרו במעבדה. יש לוודא שהגלאים מזהים באינטרפזות את הטרנסלוקציות, ויש להכיר את תנאי ההיברידיזציה בבולסטומרים, ולא בתאים בודדים. שילוב הגלאים הנכון צריך להיות מאושר על תאים בודדים של נשא, ובמידת הקיים, גם של פרט בלתי-מאוזן במשפחה. כדי לוודא את מידת היכולת לאתר מצב בלתי מאוזן [Munné et al., 2000; Gianaroli et al., 2002]. יש לשאוף לכך שבדיקת ה-FISH תזהה נכונה לפחות 95% מהתאים הבודדים שייבדקו.

**(5) השראת ביוץ, שאיבת ביציות, הפריה וגידול טרום-עוברים - באחריות**

***היחידה להפריה חוץ גופית***

יש לשאוף להתאים לאישה את פרוטוקול השראת הביוץ שנייב מספר ביציות מספיק לצורך ביצוע PGD מחד גיסא, אך ללא סיכון מוגבר לגירוי יתר שחלתי מאידך גיסא. במקרה של PGD באמצעות FISH, אין הגבלות על דרכי החדרת הזרע. באבחון באמצעות PCR יש לבצע הפריה בטכניקת ICSI כדי למנוע קונטמינציה ב-DNA ממקור תאי הזרע. בשל אותה סיבה, יש צורך לקלף את תאי הקומולוס העוטפים את הביצית ביסודיות על מנת להימנע מקונטמינציה ב-DNA ממקור אימהי. גידול העוברים החל משלב הביופסיה יעשה לכל עובר בנפרד ותוך מתן זיהוי חד ערכי לכל עובר.

**(6) ביופסיית טרום-עוברים (בלסטומרים ו/או PB) - באחריות היחידה**

***להפריה חוץ גופית***

1. לצורך PGD ניתן להשתמש במספר מקורות של תאים:

1. בלסטומרים מטרם-עוברים ביום 3 להפריה, בשלב של 6-8 תאים. ניתן להוציא תא אחד או שניים. במידה ובטרם-עובר  $\leq 7$  תאים – מומלץ לדגום 2 תאים.
2. גופיפים הקוטביים (PB) polar bodies הראשון והשני שנלקחו ביום 0 ו/או 1 להפריה. ב-PGD לשם אנאיאופלואידיה, ניתן לסלק אתה-PB מהזיגוטה הפרונוקליארית, במקביל, לעומת במקרה של PGD למחלות מונוגניות, יש לסלקם האחד אחרי השני. PGD על ה-PB בלבד, מאפשר רק אבחנה של הגנוטיפ הנקבי.
3. תאי הטרופואקטודרם מעובר בשלב הבלסטוציסט. האפליקציה הקלינית של הטכניקה הנ"ל הינה חדשנית וקיים מעט מידע אודותיה. באנליזה הגנטית ניתן להתבסס על מידע המתקבל משילוב של כל אחד ממקורות התאים הנ"ל. ניתן להשתמש בשילוב בדגימת PB וגם בבדיקת בלסטומרים, למשל כאשר יש צורך באבחון כפול של ליקויים כרומוזומיים ושל מחלה מונוגנית.

**2. *תהליך הביופסיה:***

פתיחת ה-zona pellucida יכולה להתבצע באמצעים מכניים עם מחט זכוכית (PZD), באמצעים כימיים עם תמיסת acid tyrodes או על ידי שימוש בלייזר. לאחר ביצוע הביופסיה יש לגדל כל טרום-עובר בכלי נפרד מסומן על מנת לאפשר קשר חד-ערכי בינו לבין התוצאות של האנליזה של התאים שהוצאו ממנו. סימון התאים והעוברים מהם הוצאו, יאומת על ידי 2 אנשים.



מומלץ כי התאים יועברו עוד באותו היום לביצוע הבדיקה. התאים הבודדים יועברו לצורך אנליזה גנטית למעבדה האבחנתית.

### 3. העברת התאים למעבדה האבחנתית:

לצורך אבחון ב-PCR התאים יועברו תחת הסתכלות במיקרוסקופ למבחנות מסומנות עם בופר מתאים, כדרישת המעבדה. לצורך אבחון ב-FISH התאים ישוטחו על גבי זכוכית נושאת עם מיפוי המסמן את מיקומו של כל תא מטרום-העובר ממנו נלקח.

## 7) אנליזה גנטית של הטרום-עוברים

מוכרות כיום שתי טכניקות כלליות לשם אבחון טרום השרשה:

1. PCR – לשם אבחון מחלות מונוגניות (אפשרי גם לקביעת מין העובר ולסקר אנאופלואידיה).
2. FISH – לאיתור ליקויים כרומוזומיים כגון שינויים מבניים (טרנסלוקציות), קביעת מין העובר במחלות הנמצאות בתאחיזה למין, ולזיהוי שינויים מספריים (אנאופלואידיה).

### 1. אבחון מחלות מונוגניות בשיטת PCR: - באחריות המכון לגנטיקה באמצעות

#### מעבדת PGD מולקולרית.

יש להעמיד מערכת אבחון עבור כל משפחה. מומלץ להשתמש באבחון בסמנים פולימורפים אינפורמטיביים במשפחה, בנוסף לאבחון המוטציה הידועה. מומלץ לדגום 2 בלסטומרים מכל טרום-עובר בתנאי שהוא מכיל לפחות 7 תאים בעת הדגימה, במיוחד באבחון של מחלות דומיננטיות או במחלות רצסיביות הנגרמות על ידי 2 מוטציות שונות (ESHRE PGD consortium, 2004).

#### שלבי אבחון ב-PCR:

כאמור לעיל, יש לאמת תחילה את ההיתכנות של האבחנה על ידי זיהוי המוטציות בתאים בודדים של בני הזוג, וכן מציאת סמנים פולימורפיים אינפורמטיביים במשפחה. באופן עקרוני, שלבי התהליך כוללים ליזיס של התא, ראקציית PCR בשני שלבים (nested PCR) תוך שימוש במספר תחלים (multiplex PCR), וזיהוי המוטציות והפלוטיפ תוך שימוש בסמנים פולימורפיים.

#### ביקורות:

בתהליך האבחון יש להשתמש בסטנדרטים המקובלים עם שימוש בביקורות מתאימות על פי הקווים המנחים של ESHRE PGD Consortium לקביעת דרישות מינימום

[Rechitsky., 2001; Sermon 2002, Int'l Society, 2004]. מומלץ בכל אנליזה לבדוק במקביל

תאים בודדים שיהוו ביקורות חיוביות ושיליות מתאימות:

- לפחות 5 תאים בודדים (תאי חלל הפה, לויקוציטים, פיברובלסטים) של כל פרט רלוונטי.
- במחלות רצסיביות - דגימה של לפחות 5 תאים בודדים של חולה, נשא ובריא
- במחלות דומיננטיות - דגימה לפחות 5 תאים בודדים של חולה, ובריא,
- דגימות בופר שטיפה
- בבדיקת סמנים פולימורפיים - דגימה של מבצע הבדיקה.

#### אמינות התהליך:

- יש לוודא יעילות הגברה שאיננה נמוכה מ-95%
- שיעור ה- Allele Drop Out (ADO) צריך להיות נמוך מ- 10%
- שיעור הקונטמינציה של DNA חיצוני צריך להיות נמוך מ- 0.5%.
- שימוש בסמנים פולימורפיים יאפשר גילוי ADO וקונטמינציה.

#### אישור התוצאות:

האבחנה של כל טרום עובר תקבע לאחר שאושרה באופן זהה ובלתי תלוי על ידי שני עובדי מעבדה. מומלץ להגיע לאבחנה על סמך שני נתונים בלתי תלויים לפחות: אנליזה זהה בשני תאים, אימות התוצאות על ידי שימוש בסמנים פולימורפיים, וכו'). תוצאות האנליזה הסופיות של כל הטרומ-עוברים יתועדו בכתב.

## 2. אבחון ליקויים כרומוזומיים באמצעות FISH - באחריות המכון לגנטיקה

### באמצעות מעבדת PGD לציטוגנטיקה

יש להעמיד מערכת אבחון עבור כל משפחה. ניתן להשתמש בגלאים מסחריים או גלאים שפותחו במעבדה. יש לבדוק את הגלאים על תא יחיד כדי להעריך את מידת האפקטיביות שלהם, במיוחד במקרה של גלאים שיוצרו במעבדה. יש לשאוף לכך ש בדיקת ה- FISH תזהה נכונה לפחות 95% מהתאים הבודדים שייבדקו. ב- PGD לשם זיהוי טרנסלוקציות, שילוב הגלאים הנכון צריך להיות

מאושר על תאים בודדים של נשא, ובמידת הקיים, גם של פרט בלתי-מאוזן במשפחה. כדי לוודא את מידת היכולת לאתר מצב בלתי מאוזן [Munné et al., 2000; Gianaroli et al., 2002].

#### שלב אבחון ב-FISH:

בשלב ראשון יש לבצע פיקסציה של התא שנדגם על גבי זכוכית נושאת, על פי פרוטוקולים מקובלים. מומלץ לסמן את מיקום התאים על גבי הזכוכית וכן לשרטט מפה המתעדת את מיקום התאים.

בשלב שני מבצעים היברידיזציה עם גלאים ייחודיים לצורך האבחנה. ניתן לבצע שטיפה להסרת הגלאים שנבדקו בשלב הראשון, ולבצע בדיקה עם סדרת גלאים נוספת באותו תא. יש לתעד בצילום את תוצאות האנליזה ב-FISH.

### אימות התוצאות:

התוצאות יאומתו על ידי 2 עובדים בלתי תלויים. יש להשוות את התוצאות ולקבל החלטה אחת במידה ואין אחידות בתוצאה, יש לקבוע קריטריונים לאנליזה של הסיגנלים של בדיקת ה-FISH (Munné et al., 1998 Magli et al., 2001). תוצאות האנליזה של כל הטרומ-עוברים יתועדו בכתב.

### בדיקה חוזרת של טרום-עוברים שלא הוחזרו:

בטרומ-עוברים שאינם בני-החזרה או הקפאה מוצע לאשר את תוצאות ה-PGD ע"י אנליזה חוזרת על מנת לוודא את מידת היעילות של טכניקת הבדיקה וכדי להעריך את מידת השגיאה שבבדיקת תא-יחיד.

## **(8) החזרת טרום-עוברים בריאים לרחם האישה - באחריות יחידת IVF והמכון**

### ***לגנטיקה באמצעות מעבדת ה-PGD***

מעבדת ה-IVF תקבל מהמעבדה המולקולרית או הציטוגנטית תוצאה כתובה של האנליזה של כל טרום-עובר שנבדק. לפני ההחזרה יש לייצע את הנבדקים על תוצאות האבחון, גם במקרה שלא נמצאו טרום-עוברים להחזרה. בטרם ההחזרה יש לאמת את הטרומ-עוברים המוחזרים על ידי 2 עובדי מעבדה. החזרת העוברים תיעשה כמקובל ביחידת ה-IVF. אין להחזיר טרום-עוברים שלא עברו ביופסיה או שלא אובחנו, אלא אם בני הזוג ביקשו זאת במפורש, בתהליך ההסכמה מדעת. במקרה שכזה, יש לוודא כי בני הזוג הבינו את משמעות פעולת החזרת טרום-עוברים שלא עברו אבחנה. כמו כן יש לוודא בתהליך ההסכמה מדעת כי בני הזוג הבינו שאפשר ויוחזרו טרום-עוברים שבדיקתם הגנטית-מולקולרית נמצאה זהה לזו של הוריהם הבריאים, קרי, הינם נשאים למוטציה של המחלה. יש לקבל את הסכמת בני הזוג לעובדה זו בכתב מראש, וכתנאי להתחלת הליך ה-PGD.

## **(9) הקפאת טרום-עוברים עודפים - באחריות יחידת IVF**

במחזור טיפול בו הושג מספר גבוה של טרום-עוברים, ניתן להקפיא חלק מהם ביום 1/2/3 להתפתחות בטרם נערכה במ אבחנה. במידה והאישה לא הרתה במחזור הנוכחי, ניתן יהיה להפשיר עוברים אלו, ובמידה ויתפתחו - לבצע במ ביופסיה ואבחון טרום השרשה במחזורים עתידיים. טרום-עוברים שאובחנו כתקינים, אשר לא הוחזרו, ואשר איכותם מאפשרת זו - יוקפאו לצורך החזרה לפני ביצוע מחזור IVF חדש, כמקובל (ראה מסמך קווים מנחים ליח' IVF שבנדון).

## **(10) אבחון טרום לידתי, מעקב הריון ותוצאות לידה**

### ***אבחון טרום לידתי - באחריות המכון לגנטיקה.***

בשל העובדה כי PGD אינו יכול להבטיח בוודאות של 100% את האבחנה בעובר, חובה להמליץ על אבחון טרום לידתי לאימות תוצאות ה-PGD. בתהליך ההסכמה מדעת ל-

PGD יש לוודא כי בני הזוג הבינו את החיוניות של אבחון טרום לידתי לאימות האבחנה. יש לקבל את הסכמת בני הזוג לפעולה זו, בכתב, מראש, ובטרם יוחל בהליך.

במקרים של אי-הסכמת ההורים לביצוע בדיקות אלו, יש ליידע את בני הזוג שוב על מידת הרגישות של בדיקת ה-PGD, ומגבלותיה, ולקבל את אישורם הרשמי לכך בתהליך ההסכמה מדעת.

#### מעקב הריון ותוצאות לידה:

**לידת צאצאים בריאים הנה המטרה של תכנית ה-PGD.** לכן, מעקב הריון הינו ציר מרכזי בהערכת היעילות של השיטה. יש לבחון את המשתנים הבאים:

- שיעורי ההשרשה - מאפשרים לקבל מידע על מידת החיוניות של טרום-העוברים לאחר הביופסיה.
- שיעור ההריונות ושיעור ה- take-home baby - מאפשרים לקבל מידע על שיעור ההצלחה של השיטה והכדאיות שלה למטופלים.
- שיעור ההפלות ובמיוחד אנליזה של חומר מהפלות יסייע לקבוע את מידת ההתאמה עם תוצאות בדיקת ה-PGD.
- מעקב ורישום מרכזי של הילודים – מאפשר זיהוי של טעויות באבחנה וכן זיהוי מומים מלידה העשויים להיות כרוכים בתהליך הביופסיה. מעקב נרחב חשוב בעיקר כדי לאתר אפקטים ארוכי-טווח הנגרמים כתוצאה מהפולשנות של הטכניקה.

#### **4. נוהלים מחייבים למעבדת PGD אבחנתית**

מעבדות שיעסקו ב-PGD יפעלו על פי נוהל "קיום מנחים למעבדות לגנטיקה מולקולרית בישראל-2000", בכל הנוגע להסמכת עובדים, הכרה ומבחני ובדיקות טיב, עקרונות לאימוץ שיטות חדשות, קריטריונים ובדיקות גנטיות חדשות למעבדות מוכרות, סודיות רפואית, רשומות, דוחות, ציוד, מתקנים, הספקה, מכשירים ונוהלי העבודה.

#### **1) בנוסף יש לקיים את התנאים הבאים:**

##### ***א. דרישות למקום ולציוד:***

בשל סכנת הקונטמינציה יש להכין את ריאקציות ה-PCR הראשוניות בחדר "סופר-נקי" שהכניסה אליו מוגבלת לצוות מורשה בלבד, בלבוש הכולל חלוק נקי כיסוי נעליים, ראש וכו'. הציוד בחדר זה ייעודי לראקציות של תאים בודדים בלבד. יש להימנע מכל וכל משימוש במכשירים אלו להגברת DNA גנומי, להגברה של תוצרי PCR ראשוני. יש לשאוף שחדר זה יהיה מרוחק מאזורי מעבדה אחרים במבצע PCR ל-DNA גנומי. החדר "הסופר-נקי" יכלול:

1. כניסה כפולה לחדר (מערכת של 2 דלתות או דלת ווילון אטום).

2. מערכת מיזוג הכוללת מסננים מתאימים, והמאפשרת לחץ אויר חיובי בחדר.
3. רצפת PVC.
4. חופה נקיה – 3X4 m
5. Hood ביולוגי, בעל זרימת אויר מסונן מתאימה
6. צנטריפוגת שולחן
7. מקרר/פריזר
8. מכשיר PCR ייעודי
9. מערכת פיפטורים
10. מאזניים + ציוד סטנדרטי וכלי מעבדה נפרדים

## ב. בקרת ואבטחת איכות

תוצאות של PGD חייבות בניטור באופן קבוע.

- יש לבדוק את:
    - שיעור הטרומ-עוברים שניזוקו במהלך הביופסיה
    - שיעור הטרומ-עוברים בם לא ניתן היה להגיע לאבחנה
    - שיעור אבחנות כוזבות על פי בדיקה חוזרת של עוברים של הוחזרו
    - שיעור אבחנות כוזבות על פי אבחון טרום לידתי או לאחר הלידה
    - שיעור ההשרשה
    - שיעור ההפלות
    - שיעור ההריונות הקליניים
    - לידות חי
    - שיעור ההריונות מרובי עוברים (תאומים זהים/לא – זהים)
- מומלץ כי יחידות PGD יירשמו ל- ESHRE PGD consortium וישלחו דיווחים תקופתיים, הכוללים את כל הנתונים הנ"ל.

## 5. פרספקטיבה עתידית

טכניקות חדשניות ואפליקציות לביצוע של PGD הוכנסו בשנים האחרונות כדי לשפר את טכניקת ה-PGD:

- a. Metaphase conversion for second polar body and blastomeres
- b. Spectral imaging (SKY)
- c. Chip technology CGH-Comparative genomic hybridization.

מידע רב קיים מפרסומים מוקדמים, אבל יש צורך במידע נוסף לפני שניתן יהיה להשתמש בטכניקות הללו כחלק מסטנדרט הברור הקליני.

## ספרות

- Gianaroli L, Plachot M., van Kooij R et al. (2000) ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. *Human Reproduction* 15, 2241-2246.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al. (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Human Reproduction* 17, 3201-3207.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K et al. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature (London)* 344, 768-770
- Jericho H, Wilton L, Gook DA et al. (2003) A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Human Reproduction* 18,568-571.
- Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A et al. (2002) Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Human Reproduction* 17,1166-1170.
- Joris H, Van den Abbeel, De Vos A et al. (1999) Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Human Reproduction* 14,2833-2837.
- Kuliev A and Verlinsky Y (2004). Thirteen years experience of preimplantation diagnosis. *Reproduction Biomedicine Online* 8, 229-235.
- Magli MC, Gianaroli L, Fortini D et al. (1999) Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Human Reproduction* 14,770-773.
- Magli MC, Sandalinas M, Escudero T et al. (2001) Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenatal Diagnosis* 21,1080-1085.

- McArthur S, Marshall J, Wright D et al. (2003) Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics, 5-7 June, Antalya, Turkey, p. 33
- Munné S, Marquez C, Magli MC et al. (1998) Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes XY, 13, 16, 18 and 21. *Molecular Human Reproduction* 4,863-870.
- Munné S, Sanadlinas M, Escudero T et al. (2000) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertility and Sterility* 73, 1209-1218.
- Rechitsky S, Verlinsky O, Amet T et al. (2001) Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology* 183, S65-S68.
- Sermon K (2002) Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Human Reproduction Update* 8, 11-20.
- Simpson J, Liaebaers I (1996) Assessing congenital anomalies after preimplantation genetic diagnosis. *Journal of Assisted Reproductive Genetics* 13, 170-176.
- Staessen et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2849-58. Epub 2004 Oct 7.
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A et al (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human Reproduction* 5, 826-829.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M et al. (1996) Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13, 157-162.

## נספח

### אמות מידה לבדיקות PGD

#### I קטגוריה I

מחלות גנטיות חמורות המופיעות בגיל צעיר (לדוגמה טיי-זקס, X שביר, סיסטיק פיברוזיס). בקטגוריה זו נכללות כל המחלות המונוגניות החמורות המופיעות בגיל צעיר, עם סיכויי הישנות של 25% (אוטוזומי רצסיבי), 50% (אוטוזומי דומיננטי) ועד 50% במקרה של עובר ממין זכר במחלה האחוזת למין. בצורות תורשה אחרות, או בחדירות שאינה מלאה עם סף סיכון של 10% להישנות המחלה בצאצאים נוספים.

#### II קטגוריה II

בבני זוג שאחד מהם נשא של ליקויים כרומוזומים מאוזנים כגון טרנסלוקציות או אינברסיות העלולות לגרום לתחלואה או תמותה בצאצאים.

#### III קטגוריה III

אבחון כפול של מחלה מונוגנית והתאמת רקמות. במקרה כזה הצאצא הבריא שיוולד לאחר PGD יוכל לשמש גם תורם מוח עצם לאחאים לוקים במחלה. 3 הקטגוריות הנ"ל עונות לקריטריונים הרפואיים והאתיים המקובלים כיום בארץ ובעולם לבדיקות טרום-לידתיות, ויש לראות בהן אינדיקציות רפואיות מוחלטות.

## הערה

היות והבסיס לביצוען של בדיקות טרום-לידתיות לאבחון מחלות גנטיות מבוסס על קריטריונים מקובלים ומוכרים היטב, ביצוע אבחון זה תוך שימוש בטכנולוגיית ה-PGD אמור להיות מבוסס על קריטריונים זהים בעיקרם. לכן, אין להשתמש בטכנולוגיה הנ"ל אלא על פי הקריטריונים שנקבעו, ולמען הסר ספק, אין להשתמש בה למטרות שאינן רפואיות כגון איתור תכונות, במידה וקיימות מחלות גנטיות שאינן עונות לקריטריונים המקובלים לבדיקות טרום-לידתיות, יש לדון בהן אחת לאחת, על פי הקריטריונים של:

\* חומרת המחלה, יעילות הטיפול בה, מידת הסיכון להישנותה, מידת הסיכון להתפתחות בעיות רפואיות גם בנוכחות גנוטיפ בלתי תקין (כגון חדירות מופחתת) או גיל הופעה משוער של המחלה.

\* האפשרות ל-PGD עבור מחלות חמורות, המופיעות מאוחר בחיים, כדוגמת מחלת הנטינגטון, או כגון גנוטיפים המעלים באופן ניכר את הפרהדיספוזיציה למחלות סרטן, נמצאת כעת בבדיקה ע"י המועצה הלאומית לביואתיקה, והועדה הלאומית לניסויים רפואיים בבני-אדם. נספח אמות המידה ל-PGD, והמצורף בזה יותאם בעתיד בהתאם להחלטות הועדות הללו. ועדות אלו ידונו מעת לעת בהיבטים הביואתיים של הכללת אמות מידה נוספות.

\* בהתאם, איגוד הגנטיקאים הרפואיים בישראל יבחן מפעם לפעם את הקריטריונים נוכח ההתפתחויות המדעיות בתחום זה, ויוציא ניירות עמדה מתאימים או יתקן הנחיות שפורסמו בניירות עמדה קודמים.