

SATE (SOCIEDAD ARGENTINA DE TECNOLOGÍAS EMBRIONARIAS)

Conferencia: BIOSEGURIDAD DE LAS TRANSFERENCIAS EMBRIONARIAS

Dr. Carlos José Munar

24-10-2020

El ánimo de esta presentación es informar sobre:

- Bioseguridad de los embriones y el riesgo de transmisión de enfermedades a través de las transferencias embrionarias. (Michel Thibier, 2010)
- Protocolos sanitarios internacionales para exportar embriones desde Argentina.

Fuentes de información:

Resolución SAGyP 304/88 Decreto reglamentario de las TE en la RA

The International Embryo Technology Society (IETS).

Manual of the International Embryo Transfer Society - 4th edition (2010)

Health And Safety Advisory Committee (HASAC)

World Animal Health Organization (OIE)

Terrestrial Animal Health Code – 2019 Chapter 4.8 (IVD) and 4.9 (IVP)

Lab Policies and Procedures of the P.J. Hansen Laboratory

Department of Animal Sciences, University of Florida, FL. USA

Version of September 21, 2017

Association of Clinical Embryologists – Guidelines on Good Practice in Clinical Embryology Laboratories 2012

Compiled & edited by: Ciara Hughes on behalf of the Association of Clinical Embryologists

The British Fertility Society

Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)

Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology

BIOSEGURIDAD DE LAS TRANSFERENCIAS EMBRIONARIAS

Resumen: Biosecurity –its added value to Embryo Transfer - Michel Thibier

Acta Scientiae Veterinariae. 38(Supl 2): s649-s659, 2010

“Tanto embriones obtenidos in vivo (IVD) como producidos in vitro (IVP) en ganado bovino se han transferido a todo el mundo durante muchas décadas con gran éxito. Entre las muchas razones para que esto ocurra, una concierne a la Bioseguridad, problemas que si se gestionan adecuadamente, pueden agregar un valor significativo a esta tecnología de transferencia de embriones (ET). Existen una serie de condiciones para que este sea el caso.

La presente revisión enfatizó los puntos críticos a lo largo de los procedimientos que permiten a los practicantes proporcionar un alto grado de seguridad a sus operaciones porque si no bajo estricta atención, los patógenos principalmente del tracto genital de los donantes de embriones o de ovocitos, pero no exclusivamente, puede estar asociado a los embriones y, por lo tanto, contribuir a propagar enfermedades en las rodeos de receptoras.

La información científica sólida ha sido elaborada por investigadores a lo largo de las últimas décadas que han sido capaces de generar medidas regulatorias apropiadas. Los riesgos en juego que debemos controlar tanto de embriones producidos in vivo como in vitro se refieren principalmente a diversos virus y bacterias como el virus de la enfermedad de la fiebre aftosa u otros y esta revisión resumieron estudios relevantes que se refieren a ellos. También describimos las secuencias de eventos a lo largo de los procedimientos que podrían contribuir a tal asociación entre los patógenos y los embriones. El conocimiento de tales secuencias permitieron que la industria de transferencia de embriones adoptara los medios apropiados para administrar los riesgos y por lo tanto mitigar casi un nivel insignificante de tales riesgos y proporcionar el valor agregado de Bioseguridad a esta tecnología. Esos medios han sido identificados y evaluados a través de una participación activa de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones / Salud y Comité Consultivo de Seguridad (**HASAC**), que actúa entonces como comité ad hoc para la Organización Mundial de Sanidad Animal (**OIE**). La reciente 4ª edición del Manual de la **IETS** (2009) proporciona un excelente documento para que el profesional proceda sin peligro. Aquí resumimos algunos de los pasos más importantes y, en particular, la forma en que los embriones deberían ser manejados una vez que los embriones obtenidos in vivo o los ovocitos para embriones producidos in vitro son recolectados. Para embriones producidos in vitro, aquí se hizo énfasis en la colección de ovarios cuando esto ocurre en los mataderos destacando el hecho de que ningún animal debería estar presente en la cadena del matadero por razones de despoblación cuando los ovarios son recolectados para embriones IVP. La estrecha relación entre el IETS y la OIE ha permitido a la OIE introducir estas medidas como recomendaciones en su Código Sanitario para los Animales Terrestres, dando al mundo internacional, eficiencia y directrices comprobables factibles.

La presente revisión informó también sobre los principios básicos a seguir para dar su grado completo de Bioseguridad. Esos principios se basan en el papel crítico y ético de equipos de trabajo bajo el liderazgo de un veterinario, para la transferencia de embriones o la producción de embriones.

Conclusión: varias décadas de experiencia con cerca de 10 millones de embriones transferidos desde el comienzo de este siglo han demostrado que, siempre que se cumplan estrictamente esas normas, la bioseguridad es un valor añadido real a estas tecnologías." (M.Thibier)

Las transferencias de embriones derivados in vivo (IVD- MOET) se expandieron desde el 1975 con el desarrollo de las técnicas no-quirúrgicas y desde 1978 con la criopreservación. Las TE de embriones producidos in vitro (IVP) tienen más de 30 años pero se expandieron después del 2010.

Anualmente se transfieren aproximadamente 1 millón de embriones en todo el mundo. Hasta el 2010 el 70% de MOET y el 30% de IVP, actualmente la proporción está en 50:50, debido al gran desarrollo de la IVP en Brasil y USA.

Embriones in vivo – IVD (in vivo derived)

Evaluación del riesgo

Evaluación de riesgo desde el ovocito, la fertilización con IA o servicio natural, desarrollo del embrión, colecta a los 7 días, manipulación, almacenaje y transferencia.

Los riesgos derivan de la Interacción agente patógeno y embrión, durante la secuencia de eventos: 1) Exposición al agente; 2) la asociación continuada del agente con el embrión; 3) mantenimiento de la infectividad del agente patógeno durante la manipulación del embrión; 4) Descarga del embrión portador de una dosis infectante del agente patógeno en el útero de una receptora susceptible. (Stringfellow and Givens)

Los estudios de riesgo de Infección del embrión fertilizado con semen de toros infectados, dieron resultado negativo para: EBLV (leucosis), BTV (lengua azul), BHV1 (IBR-Herpes virus 1) y VSV (estomatitis vesicular - trypsin). (Wrathall)

Riesgo de transmisión de enfermedades utilizando materiales de origen animal, TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathies) dieron resultado negativo. (Wrathall)

Nitrógeno líquido contaminado: la transmisión de agentes patógenos a embriones y semen conservados en envases herméticos (pajuelas) dieron resultados negativos.

Manejo del riesgo

No se han reportado casos de transmisión de enfermedades a través de embriones in vivo (IVD), no obstante el riesgo teóricamente existe y para garantizar la bioseguridad los científicos de la **IETS-OIE** recomiendan procedimientos para el control de calidad y manejo sanitario de embriones. Las enfermedades transmisibles a través de embriones (**OIE-IETS-HASAC**), están clasificadas en 4 categorías. Cat.1: con riesgo de transmisión despreciable para bovinos de agentes patógenos causales de Aftosa, Brucelosis, Lengua Azul, Leucosis, Rinotraqueitis (IBR) y BSE (vaca loca). Otras enfermedades de las categorías 2, 3 y 4 requieren más datos y trabajos científicos que demuestren la inocuidad del embrión, por lo tanto se puede requerir certificación opcional, en particular Tuberculosis como zoonosis.

Resumen de recomendaciones del Manual de la IETS y del Cap. 4.8.14 de Código de salud animal terrestre de la OIE (2019), para embriones IVD:

- Donantes y rodeos clínicamente sanos dentro del área.
- Semen con certificación de sanidad y calidad de origen en CIA oficialmente habilitados.
- Embriones observados con 50X, de calidad acorde con su estadio de desarrollo, zona pelúcida intacta y libre de materiales adheridos.
- Lavado sanitario mediante 10 pasajes de cultivo, dilución 1:100, 1 minuto por paso, con cambio de tip en cada pasaje.
- Lavado con Tripsina, en el 4 y 5 pasaje durante 90 segundos (BHV1, IBR-IPV, Estomatitis vesicular).
- Envasado hermético (pajuelas) y conservados en NL sin contacto directo con el líquido.
- Certificado por veterinario oficialmente habilitado, ética y valores para la supervisión y DT del equipo de TE.
- Normas de Higiene durante las operaciones de IA, colecta de embriones u ovocitos.
- Origen y composición de los medios de cultivo, antibióticos, esterilidad de los medios, instrumental y envases que rodean al embrión.
- Rotulación de envases, ID donantes.
- Registros de producción in vivo e in vitro (2 años).
- Supervisión de los servicios sanitarios oficiales (**SENASA**) una vez por año.

“Como conclusión de esta parte y en lo que respecta a la bioseguridad en el contexto de los embriones obtenidos in vivo, el sistema vigente en todo el mundo y aprobado por la OIE ha demostrado su eficacia. Se basa en la ciencia y la integridad en los procedimientos de recolección y procesamiento, por lo que brinda una inmensa ventaja comparativa a esta técnica en mover germoplasma de una manada a otra.”(M.Thibier)

Embriones in vitro – IVP

Evaluación del riesgo

Depende del origen de los ovocitos:

Ovocitos colectados de donantes por OPU el riesgo es muy similar al de los embriones IVD, y

se puede controlar además utilizando donantes sanas analizadas de la misma manera que los toros en CIA.

Ovocitos colectados de frigorífico, la situación es más complicada, los riesgos de contaminación ambiental y de tropa son particularmente frecuentes para BVDV y BHV-1. Importante la identificación de la tropa, análisis en origen y evitar la contaminación con otras tropas de sanidad desconocida.

El factor zona pelúcida es diferente a los embriones IVD, los embriones de IVP tienen la ZP con poros de mayor tamaño y experimentos infectando embriones IVP con cargas altas de virus dieron resultados positivos, son susceptibles a la adherencia de virus FMDV (virus Aftosa), BVDV (virus Diarrea Viral) BVH-1 (virus Herpes Bovino-1, IBR, Estomatitis Vesicular).

El riesgo de contaminación ambiental durante la semana de manipuleo y procesamiento de los ovocitos y embriones, incluye el ambiente de laboratorio, los envases, control de la atmósfera gaseosa, temperaturas y los tiempos. La calidad y origen de los medios de cultivo con sustancias de origen animal, se recomienda utilizar medios sintéticos (SOF) y reemplazar por aminoácidos de origen vegetal.

La presencia de suero fetal (FCS) en los medios de cultivo favorece el desarrollo de los blastocistos, proporcionando nutrientes, factores de crecimiento, antioxidantes y otros. El FCS aumenta el contenido de lípidos intracelulares que son utilizados como fuente de energía pero al mismo tiempo disminuyen la viabilidad post congelación. Por eso se utilizan sustancias que restringen la formación de ácidos grasos (phenazine ethosulfate) en día 4 de cultivo, o sustancias lipolíticas en día 5 (forskolin), al mismo tiempo que reducen la proporción de FCS, obteniéndose embriones similares a los de IVD (MOET) en el contenido lipídico y supervivencia a la congelación.

La infección de embriones IVP por BVDV y BHV-1 baja con la criopreservación, disminuye la proporción de embriones contaminados pero no se elimina completamente. Embriones infectados in vitro con BVDV transmiten la enfermedad en las receptoras, ocasionando pérdidas, pero no afectan a las crías que permanecen seronegativas.

Los sistemas de vitrificación abiertos en OPS (Open Pulled Straw, o pajuelas abiertas), exponen los embriones y crioprotectores al contacto directo con NL, y por lo tanto están cuestionados en el comercio internacional por el riesgo de transmisión de virus y bacterias contaminantes del nitrógeno líquido.

Manejo del riesgo

Resumen de recomendaciones del Manual de la IETS y del Cap. 4.9 de Código de Salud Animal Terrestre de la OIE (2019), para embriones IVP se repiten las guías para embriones IVD y se hacen otras consideraciones:

Se ha elaborado un conjunto de recomendaciones para controlar los riesgos asociados con dichos embriones dentro de la IETS y publicado en el capítulo correspondiente de la última edición del Manual de procedimientos de la IETS. Aquí también, deben ser considerados por todos los profesionales como un código obligatorio de buenas prácticas.

En casos de donantes de OPU se aplican las mismas normas que para embriones IVD, de examen clínico de las donantes, del rodeo y área geográfica próxima. Además se pueden realizar análisis serológicos y otros opcionales (medios de cultivo de lavado, huevos degenerados, UFO o embriones de la misma donante).

Control de calidad de todos los procesos de laboratorio, higiene de las instalaciones y área de trabajo, campana de flujo laminar y áreas restringidas son esenciales para mantener la bioseguridad. Cuidados durante la OPU, la IVM con el transporte de los ovocitos, la calidad del semen y los diferentes medios de cultivo. La adición de antibióticos durante la IVF, IVC para controlar la contaminación bacteriana del semen, es una indicación válida. No se tienen sustancias antivirales disponibles para los medios de cultivo.

Los embriones IVP de manera similar a los IVD también son sometidos a los 10 lavados sanitarios para controlar el riesgo de contaminación bacteriana, fúngica y viral.

El sistema de envases para transporte de los embriones para TEF en pajuelas o criotubos, y la criopreservación por vitrificación abierto (OPS), o cerrado (CPS, Cryotop), o sistema de enfriamiento lento para DT (cerrado en pajuelas) implican ciertos riesgos de contaminación según el envase considerado.

Para garantizar la bioseguridad de los embriones IVP la **IETS-OIE** destaca la importancia de la idoneidad del veterinario y del equipo técnico, de manera similar a los embriones IVD, para el control de calidad de los procedimientos.

Está claro que los procedimientos de IVP requieren cuidado particular del equipo de producción porque se ha comprobado que algunos patógenos se adhieren más fácilmente a la zona pelúcida de tales embriones. Sin embargo, cuando todo el procedimiento se efectuó en un laboratorio bien establecido con personal competente bajo la dirección del veterinario del equipo proporciona los medios apropiados para liberar y transferir tales embriones de FIV. Por lo tanto, esta generación de Biotecnologías Reproductivas también puede, al igual que para embriones derivados in vivo, dar toda la garantía de un alto nivel de bioseguridad.

CONCLUSIONES

“En conclusión, la declaración hecha hace unos 21 años de que la transferencia de embriones in vivo derivados era el medio más seguro para intercambiar genes entre hatos, áreas o continentes sigue siendo más que válido. Nada durante esos años contradice esta afirmación gracias al alto grado de profesionalismo y buenas prácticas de la industria del embrión basada en la investigación sólida que se ha hecho y pasó a las agencias reguladoras.

Respecto al segundo tipo de embriones, es decir, los producidos por fertilización y cultivo in vitro, investigaciones recientes, particularmente en BVDV ha confirmado que algunos tipos o subtipos de virus podrían estar fuertemente adheridos con la zona pelúcida de tales embriones IVP. Esto le da aún más responsabilidad al equipo de producción de embriones, para seguir estrictamente las normas y su compromiso con la aprobación oficial por parte de la autoridad veterinaria competente. Hay reglas a seguir que han demostrado que en tales condiciones, esta tecnología también podría ofrecer una garantía total en términos de bioseguridad. Tales posibilidades en el momento de la globalización mundial con el aumento del comercio internacional proporcionan a estas tecnologías un claro valor agregado.” (M.Thibier)

Las autoridades sanitarias requieren de trabajos científicos que demuestren el riesgo de transmisión de enfermedades a través de los embriones IVP y las medidas efectivas de control. No obstante hay evidencias “fácticas” de no transmisión de enfermedades por medio de embriones in vitro, después de millones de TE en diferentes países miembros de la OIE (M.Thibier, IETS. 2015).

Los embriones producidos por OPU-IVP de donantes vivas tienen prácticamente las mismas garantías de bioseguridad que los IVD, siguiendo las normas de la IETS-OIE. Además se pueden

incluir medidas de control serológico sobre las donantes para virus de diarrea viral bovina (BVDV), herpes virus (BHV1) agentes de la IBR-IPV y fiebre aftosa (FMDV).

La gestión de bioseguridad y control de riesgo depende de los profesionales actuantes, son auditados por SENASA y certificados en los protocolos sanitarios internacionales.

Las autoridades de SENASA están particularmente alertas ante el riesgo de transmisión de la BSE (encefalopatía espongiforme bovina). Está demostrada la no transmisión de BSE con embriones IVD, pero faltan trabajos científicos relativos para embriones IVP.

SENASA está considerando protocolos sanitarios para la importación y exportación de embriones IVP con Mercosur y otros países. Argentina tiene protocolos sanitarios para embriones IVP con Brasil y Filipinas.

Desde 1985, Munar y Asociados SA ha exportado más de 18.000 embriones IVD de las razas Angus, Hereford, Shorthorn, Simental, Charolais, Brangus, Braford, Brahman, Nelore, Wagyu y Holstein, a los siguientes 14 países: Uruguay, Brasil, Paraguay, Bolivia, Colombia, Canadá, Escocia, Francia, España, Portugal, Israel, Armenia, China y Nigeria.