

Manual EndomeTRIO

Una visión completa de la salud endometrial

Índice

ERA – Endometrial Receptivity Analysis - 4

- Antecedentes - 5
- Indicaciones para ERA - 6
- Metodología -7
- Interpretación de resultados - 9
- Ejemplo informe ERA- 11
- Reproducibilidad de los resultados - 12
- Árbol de decisiones ERA- 13
- Referencias - 14

EMMA – Endometrial Microbiome Metagenomic Analysis - 17

- Antecedentes - 18
- Indicaciones para EMMA - 19
- Metodología - 19
- Ejemplo informe EMMA- 20
- Beneficios del análisis molecular de la microbiota vs cultivo microbiano – 25
- Árbol de decisiones EMMA- 26
- Referencias – 27

ALICE – Analysis of Infectious Chronic Endometritis - 29

- Antecedentes - 30
- Indicaciones para ALICE - 30
- Metodología - 31
- Ejemplo informe ALICE - 32
- Beneficios del análisis molecular de la microbiota vs histología, histeroscopia y cultivo microbiano – 34
- Árbol de decisiones ALICE- 35
- Referencias - 36

Biopsia endometrial- 37

Requisitos para la toma de biopsia endometrial - 38

Día de la biopsia endometrial para ERA solo o combinado con EMMA/ALICE – 39

Protocolo THS rutina– 40

Ciclo natural: Protocolo de rutina- 42

Día de la biopsia endometrial para EMMA y/o ALICE (sin ERA)– 43

Día de la biopsia endometrial: Cuadro resumen– 44

Día de la biopsia endometrial: Protocolos no válidos- 45

Protocolo biopsia endometrial - 46

Logística – 48

Una visión completa de la salud endometrial– 49

Lista de abreviaturas- 50



ERA[®]

Endometrial Receptivity Analysis

Antecedentes

El factor endometrial es clave para que la implantación embrionaria ocurra con éxito. No solo es importante evaluar la presencia de malformaciones o anomalías en la cavidad uterina, sino que también es importante determinar el momento en el que el endometrio de una paciente adquiere un fenotipo receptivo, es decir, cuándo comienza su ventana de implantación. Pacientes con fallo de implantación recurrente (RIF) podrían presentar un desplazamiento de esta ventana, provocando que la transferencia embrionaria se realice en un endometrio no receptivo (Ruiz-Alonso et al. Fertil Steril, 2013).

La firma de expresión génica del endometrio permite evaluar la receptividad endometrial, identificando la ventana de implantación personalizada de cada paciente. Este análisis se realiza con una herramienta diseñada, desarrollada y patentada en 2009 (PCT/ES2009/000386) por Igenomix, después de más de 10 años de investigación (Diaz-Gimeno et al. Fertil Steril, 2011-2013).

Identificar el momento del ciclo endometrial en que la ventana de implantación (WOI) está abierta en cada paciente nos permite personalizar la transferencia embrionaria (pET) acorde a este resultado.

Las investigaciones de Igenomix han demostrado que la sincronización entre un embrión listo para implantar y un endometrio receptivo incrementa las probabilidades de éxito de las técnicas de reproducción asistida (Ruiz-Alonso et al. Fertil Steril, 2013; Ruiz-Alonso et al. Hum Reprod, 2014; ClementeCiscar et al. Hum Reprod, 2018; Simon et al. Reprod Biomed Online, 2020).

Otros grupos externos también han publicado resultados similares en sus pacientes tras guiar la transferencia embrionaria según el resultado del ERA (Mahajan J Hum Reprod, 2015; Hashimoto et al. Reprod Med Biol, 2017; Findikli et al. Hum Reprod, 2018; Pasternak et al. Fertil Steril, 2018; Taguchi et al. Fertil Steril, 2018; Jia et al. Med Sci Monit, 2022).

ERA (Análisis de la Receptividad Endometrial), determina el momento óptimo del ciclo endometrial en el que realizar la transferencia embrionaria.. De esta forma, el test ERA puede incrementar las probabilidades de conseguir un embarazo al sincronizar un embrión preparado para implantar con un endometrio receptivo

Indicaciones para ERA

El test ERA está indicado para **pacientes con Fallo de Implantación Recurrente (RIF)**, ya que presentan un riesgo mayor de tener un desplazamiento de su ventana de implantación (Ruiz-Alonso et al. Fertil Steril, 2013). Por ello este análisis podría ser beneficioso para pacientes con 2 ciclos fallidos de ovocitos propios o 1 de ovodonación, en ambos casos con embriones de buena calidad. Por otro lado, también se ha explorado la aplicación de ERA en pacientes sin RIF (Simon et al. Reprod BioMed Online, 2020).

Nuestros estudios han demostrado que existen otras circunstancias en las que las pacientes tienen un mayor riesgo de tener una WOI desplazada. En estos casos, ERA podría ayudar a encontrar el momento óptimo para la transferencia embrionaria:

- Pacientes con **IMC > 30** (Comstock et al, 2017; Bellver et al, 2021)
- Pacientes con **atrofia endometrial** (grosor endometrial < 6 mm) (Valbuena et al, 2016)
- Pacientes con **adenomiosis** (Mahajan et al, 2018)
- Pacientes con **embarazos bioquímicos recurrentes** (Diaz-Gimeno et al, 2017)

Metodología

Este test utiliza tecnología de **secuenciación masiva (NGS)** para analizar la **expresión génica de 248 genes relacionados con el estatus de receptividad endometrial.**

Los resultados del test se basan en el análisis de la expresión de estos 248 genes con un predictor informático diseñado y desarrollado por Igenomix. Tras secuenciar el material genético (RNA) de una biopsia endometrial, es posible evaluar si el endometrio de la paciente es Receptivo o No receptivo en un momento dado de su ciclo endometrial. **Este resultado irá acompañado de una recomendación para realizar la transferencia embrionaria personalizada en cada paciente según su perfil endometrial.** En algunos casos (10%), se podría necesitar validar la ventana de implantación personalizada realizando una segunda biopsia en el día especificado por el análisis del primer test ERA.

Para que el resultado sea reproducible, el test ERA debe realizarse reproduciendo exactamente las mismas condiciones que tendrá el ciclo de la transferencia embrionaria (tipo de ciclo, medicación, forma de administración...), **y siempre en ciclos naturales o terapias de reemplazo hormonal.** Este test no puede realizarse en ciclos de estimulación ovárica.

En algunos casos en los que se haya precisado más de una biopsia, nuestro equipo puede ponerse en contacto con usted para recabar información en relación a los ciclos de la paciente. Esto es para entender si los protocolos se replicaron exactamente y saber si los resultados de los ciclos pueden correlacionarse o no. **La correlación de los resultados ayuda a nuestro equipo de diagnóstico a revisar ambos resultados y proporcionar una recomendación más personalizada,** por ejemplo en el caso de una WOI estrecha. Si no confirmamos esta información y no tenemos en cuenta la correlación, es posible que estemos pasando por alto una observación especial que requiera una recomendación más personalizada para la transferencia, más allá de lo que proporciona nuestro algoritmo.

La primera biopsia endometrial deberá realizarse siempre tras 5 días completos de administración de progesterona (P+5) en un ciclo de THS (120 horas con administración de progesterona). En Ciclo Natural, la primera biopsia debe tomarse 7 días (168 horas) después del uso de hCG (hCG+7) o después del pico de LH (LH+7). También podría tomarse 6 días después de la ovulación confirmada por ecografía (aunque esta última opción no es la óptima, ya que es difícil asegurar la reproducibilidad de los resultados).

En el caso de transferir embriones en día 3, la biopsia deberá hacerse igualmente en P+5 o hCG+7, ya que el test ERA analiza el endometrio en el momento de la implantación. De esta manera, si se obtiene un resultado receptivo en P+5 se deberá transferir un blastocisto en P+5 o un embrión de día 3 dos días antes, es decir, en P+3.

Interpretación de los resultados

Receptivo: El perfil de expresión génica es compatible con un endometrio receptivo. Se recomienda la transferencia de blastocisto(s) en las mismas condiciones en las que se realizó el test ERA.

Receptivo tardío: El perfil de expresión génica es compatible con un endometrio al final de la fase receptiva. Se recomienda adelantar la transferencia de blastocisto(s) 12 horas respecto al momento en el que se realizó el test ERA.

Pre-receptivo: El perfil de expresión génica es compatible con un endometrio en fase pre-receptiva. Esto podría deberse a un desplazamiento de la ventana de implantación. En un 5% de los casos (cuando este desplazamiento es de 2 días) se podría requerir, para su validación, una nueva biopsia endometrial en el día indicado.

Post-receptivo: El perfil de expresión génica es compatible con un endometrio en fase post-receptiva. Esto podría deberse a un desplazamiento de la ventana de implantación. Para su validación, se debe realizar una nueva biopsia endometrial en el día indicado.

Proliferativo: El perfil de expresión génica es compatible con un endometrio en fase proliferativa. Se recomienda contactar con el laboratorio ERA para evaluar el protocolo en el que se haya realizado la biopsia endometrial.

* En aproximadamente el 3,3% de las muestras recibidas no se puede obtener un diagnóstico, esto se debe a la obtención de un perfil no informativo o a la baja cantidad/calidad del material genético obtenido.

* Seguir las recomendaciones del informe ERA no garantiza la implantación. Los fallos de implantación pueden deberse a otros factores.

Seguimos estrictos criterios de calidad para garantizar que la integridad y la cantidad de ARN sean adecuadas, evitando posibles resultados artefactuales que podrían afectar negativamente el resultado clínico de sus pacientes.

ARN no válido: En el análisis transcriptómico (cualquiera que sea la técnica) se necesita una adecuada integridad del ARN para garantizar la fiabilidad del resultado. En los casos en los que el ARN esté muy degradado, el perfil de expresión génica obtenido no sería fiable. Esto ocurre en aproximadamente el 1,2% de las muestras recibidas. En estos casos es necesario evaluar una nueva biopsia endometrial (sin ningún cargo). Posibles causas: tamaño de muestra demasiado grande, contaminación y/o temperatura alta (≥ 35 °C) durante el envío.

ARN insuficiente: Aunque con NGS la cantidad mínima de ARN necesaria para el análisis es muy baja, a veces una baja concentración de ARN puede conducir a un resultado inexacto. Nuestros estrictos sistemas de control nos permiten identificar la fiabilidad del resultado obtenido. Solo en alrededor del 1,5% de las muestras recibidas no es posible determinar un perfil de expresión génica preciso porque no hay suficiente material genético. En estos casos es necesario evaluar una nueva biopsia endometrial (sin ningún cargo). Posibles causas: baja cantidad de tejido adecuado.

No Informativo: Este resultado se obtiene cuando el perfil analizado no coincide con los perfiles de expresión génica de control presentes en el predictor de ERA. En estos casos nuestro equipo de ERA se pondrá en contacto usted para evaluar el protocolo en el que se realizó la biopsia endometrial. Solo ocurre <0,7% de las muestras analizadas y en >95% de los casos, está relacionado con la muestra en sí, no con el endometrio, ya que con una nueva biopsia (sin cargo) es posible obtener un resultado válido. Este resultado está relacionado con la muestra en sí, no con el endometrio, ya que con una nueva biopsia (sin cargo) es posible obtener un resultado válido.

En cualquiera de estos casos, nuestro equipo de ERA lo apoyará y guiará, asegurándose de que podamos encontrar un resultado válido para su paciente, confiando, en que buscamos calidad y confiabilidad.

Ejemplo informe ERA

El objetivo de este test es proporcionar a los doctores un diagnóstico molecular objetivo de la salud reproductiva endometrial de la paciente.

Este test deberá ser prescrito e interpretado por el doctor que realizará la posterior transferencia embrionaria

CLIA
#9902146167





PART OF VITROLIFE GROUP

ERA (DIAGNÓSTICO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL)

Información Paciente	Información Muestra	Información Clínica
NHC:	Fecha recepción:	Clinica:
Tipo de muestra: Biopsia endometrial	Fecha informe:	Doctor:
Nombre paciente:	Progesterona: [*]	Nº biopsias:
Fecha nacimiento:	Fecha medida:	
	Fecha inicio P4:	
	Fecha biopsia:	
	Tipo de ciclo:	

RESULTADO DEL TEST:

RECEPTIVO: RECEPTIVO TARDÍO

Recomendación: La transferencia embrionaria personalizada (pET) de blastocisto/s debe realizarse con 113 ± 3 horas con administración de progesterona (12 horas menos con administración de progesterona respecto al momento en el que se tomó esta biopsia endometrial). No se requiere una nueva biopsia endometrial. **



INTERPRETACIÓN DE SU RESULTADO:

El perfil de expresión génica es compatible con un endometrio receptivo tardío. Por lo tanto recomendamos realizar la transferencia de blastocisto/s con 113 ± 3 horas con administración de progesterona (12 horas menos con administración de progesterona respecto al momento en el que se tomó esta biopsia endometrial). Para ello puede comenzar la administración de progesterona 12 horas más tarde o bien adelantar 12 horas la transferencia embrionaria respecto al momento en el que se tomó esta biopsia endometrial.

Para transferir embriones de día 3, se deberá realizar la transferencia dos días antes respecto a la recomendación anterior para transferencia de blastocistos.

^{*} Nivel de la progesterona basal antes de la primera toma de progesterona o pico de LH/HCG administración: Menor que 1 ng/ml. Fecha de la medida: 30/01/23.

^{**} Este resultado es reproducible únicamente para el mismo tratamiento en el que se ha realizado esta biopsia endometrial y siempre que la progesterona exógena previa a la primera toma de progesterona exógena haya sido <1ng/ml.

DESCRIPCIÓN DEL TEST:

ERA (Análisis de receptividad endometrial) es un test diagnóstico molecular que se utiliza para determinar si el endometrio (la membrana mucosa que recubre el útero) presenta un perfil receptivo después de 5 días con exposición a progesterona, el momento en que el endometrio está normalmente listo para la implantación del embrión. Este método de diagnóstico molecular se basa en medir el perfil de expresión génica del tejido endometrial. En consecuencia, ERA ayuda a determinar cuándo el endometrio presenta las condiciones ideales para la implantación del embrión, aumentando la posibilidad de un tratamiento de fertilización in vitro exitoso.

I GENOMIX SPAIN LAB, S.L., C/ Nards Monturidi nº11, Edificio Europark B, Parque Tecnológico, ES-46100 PATERNA, Valencia, Tel: +34 963 905 310

Buenos Aires | Dubai | Hangzhou | Istanbul | Kobe | Kuwait City | Lima | London | Los Angeles | Ciudad de Mexico | Miami | Moscow | New Delhi | New York | Recife | Riyadh | Santiago de Chile | Sao Paulo | Taipei | Tokyo | Toronto | Valencia | Vicenza



MLA-0002773 1 | 4

SPAIN, P. 001, 001, 001, 001, 001

Source: 434 963905310

Para **obtener una recomendación pET expresada en horas, necesitamos la fecha y hora de la biopsia endometrial y uno de los siguientes datos (dependiendo del tipo de ciclo):**

- Fecha y hora de la primera toma de P 4 (ciclo TRH)
- Fecha y hora de inyección de hCG , o pico de LH u ovulación (Ciclos naturales)

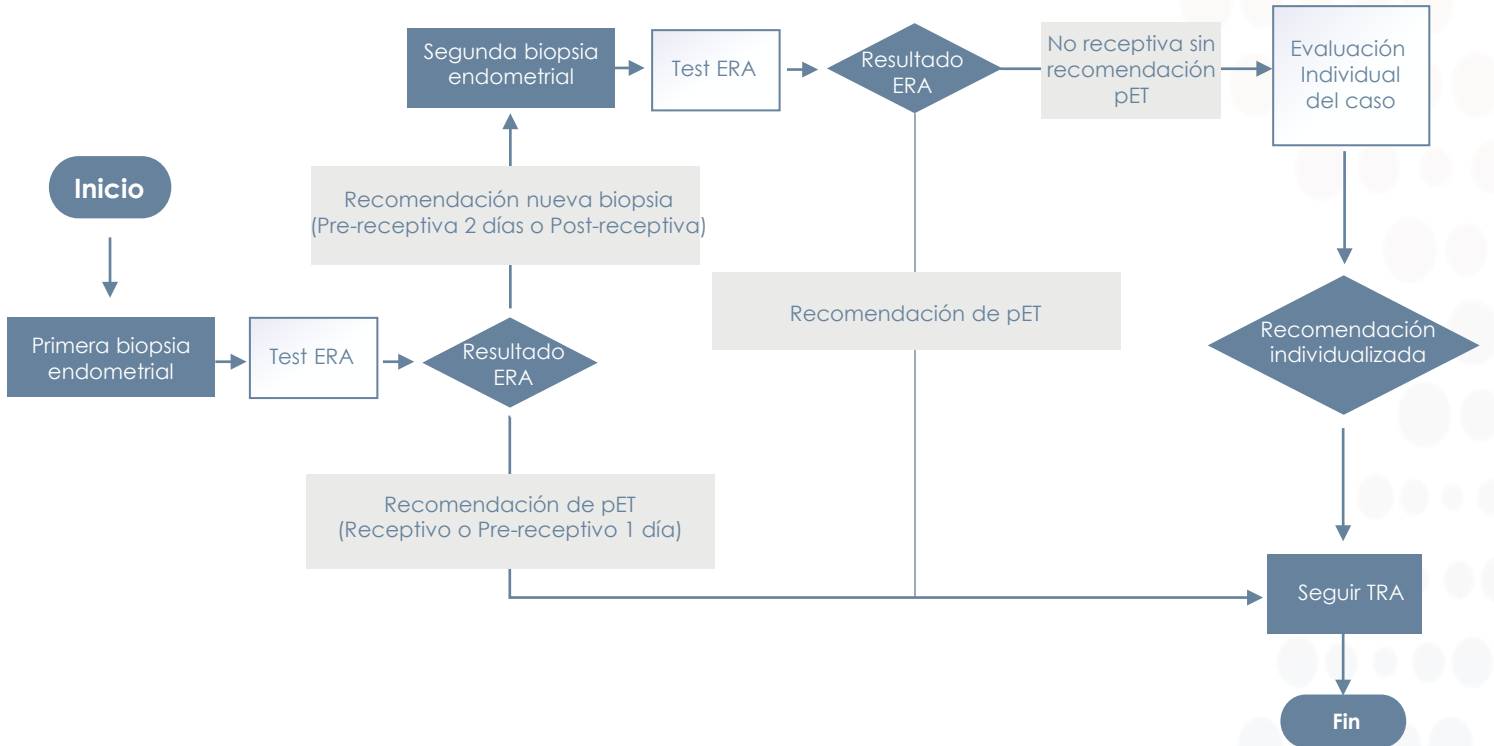
El informe ERA indicará el momento óptimo para realizar la transferencia personalizada de embriones (pET), o cuándo realizar una nueva biopsia ERA (según corresponda) .

Reproducibilidad de los resultados

Se ha demostrado que el resultado de **ERA es reproducible durante al menos 36 meses**, siempre que se cumpla lo siguiente:

- El **protocolo de preparación** del endometrio debe replicarse exactamente para los ciclos de biopsia y transferencia.
- El **grosor del endometrio** debe estar dentro del mismo rango de uno de los tres siguientes: **<6 mm, 6-12 mm, >12mm**; tanto en ciclo de biopsia como de transferencia.
- **Los cambios en el IMC pueden ir acompañados de un cambio en la ventana de implantación.** Es posible que deba repetirse la prueba ERA después de cambios significativos en el IMC (cambiar de > 30 a < 30) para garantizar la precisión de los resultados.
- La **intervención a nivel uterino** puede afectar la WOI. Después de este tipo de intervención, se debe evaluar si es necesario realizar un nuevo test ERA. De hecho, si su paciente requiere alguna **intervención a nivel uterino** antes de la transferencia embrionaria, el test ERA debe realizarse después de este procedimiento.
- **Progesterona endógena** debidamente controlada en ciclos de biopsia y transferencia, **debe ser < 1 ng/ml** dentro de las 24 horas previas a la primera toma de progesterona (ciclos THS) o en LH+0/hCG+0 (ciclos Naturales).

Árbol de decisión ERA



Referencias

- Bellver, J., Marín, C., Lathi, R.B. et al. Obesity affects Endometrial Receptivity by displacing the Window of Implantation. *Reprod. Sci.* **2021**; 1-10.
- Carranza F, González-Ravina A, Blasco V, Fernández-Sánchez M. Different Endometrial Receptivity in Each Hemiuterus of a Woman With Uterus Didelphys and Previous Failed Embryo Transfers. *J Hum Reprod Sci.* **2018**;11(3):297-299.
- Clemente-Ciscar M, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Jimenez-Almazan J, Bahceci M, Banker M et al. Endometrial receptivity analysis (ERA) using a next generation sequencing (NGS) predictor improves reproductive outcome in recurrent implantation failure (RIF) patients when compared to ERA arrays. *Hum Reprod.* **2018**; 33(Supp1):8-8.
- Comstock IA, Diaz-Gimeno P, Cabanillas S, Bellver J, Sebastian-Leon P, Shah M et al. Does an increased body mass index affect endometrial gene expression patterns in infertile patients? A functional genomics analysis. *Fertil Steril.* **2017** Mar;107(3):740-748.e2.
- Cruz F, Bellver J. Live birth after embryo transfer in an unresponsive thin endometrium. *Gynecol Endocrinol.* **2014**;30(7):481-4.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial Receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril.* **2011**; 95(1):50-60, 60.e1-15.
- Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P et al. The accuracy and reproducibility of the endometrial Receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial Receptivity. *Fertil Steril.* **2013**; 99(2):508-17.
- Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Sebastian-Leon P, Pellicer A, Valbuena D, Simón C. Window of implantation transcriptomic stratification reveals different endometrial subsignatures associated with live birth and biochemical pregnancy. *Fertil Steril.* **2017**;108(4):703-710.e3
- Findikli N, Gultomruk M, Boynukalin K, Kavrut M, Oral E, Bahceci M. Combinatorial use of Endometrial Receptivity Array (ERA) and PGT-A can improve the clinical outcome in cases with previous ART failures. *Hum Reprod.* **2018**; 33(Supp1):84-85.
- Hashimoto T, Koizumi M, Doshida M, Toya M, Sagara E, Oka N et al. Efficacy of the endometrial Receptivity Array for repeated implantation failure in Japan: A retrospective, two-centers study. *Reprod Med Biol.* **2017**; 16(3):290-296.
- Hromadová L, Tokareva I, Veselá K, Trávník P, Veselý J. Endometrial Receptivity Analysis - a tool to increase an implantation rate in assisted reproduction. *Ceska Gynekol.* **2019**; 84(3): 177-183.

- Jia Y, Sha Y, Qiu Z, Guo Y, Tan A, Huang Y. et al. Comparison of the Effectiveness of Endometrial Receptivity Analysis (ERA) to Guide Personalized Embryo Transfer with Conventional Frozen Embryo Transfer in 281 Chinese Women with Recurrent Implantation Failure. *Med Sci Monit.* **2022**;28:e935634.
- Kasahara Y, Hashimoto T, Yokomizo R, Takeshige Y, Yoshinaga K, Toya M et al. Evaluation of pregnancy outcomes of vitrified-warmen blastocyst transfer before and after Endometrial Receptivity Analysis in identical patients with Recurrent Implantation Failure. *Fertility & Reproduction.* **2020**; 3(2):35-41.
- Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J Hum Reprod Sci.* **2015**; 8(3):121-9.
- Mahajan N, Kaur S, Ruiz-Alonso M. Window of implantation is significantly displaced in patients with adenomyosis with previous implantation failure as determined by endometrial receptivity assay. *Journal of human reproductive sciences.* **2018**; 11(4):353.
- Ota T, Funabiki M, Tada Y, Karita M, Hayashi T, Maeda K et al. The Reproductive Outcomes for the Infertile Patients with Recurrent Implantation Failures May Be Improved by Endometrial Receptivity Array Test. *Journal of Medical Cases.* **2019**;10(5):138-140.
- Patel JA, Patel AJ, Banker JM, Shah SI, Banker MR. Personalized Embryo Transfer Helps in Improving In vitro Fertilization/ICSI Outcomes in Patients with Recurrent Implantation Failure. *J Hum Reprod Sci.* **2019**; 12(1):59-66.
- Pasternak M, Schattman G, Rosenwaks Z. Pregnancy outcomes in patients undergoing embryo transfer in cycle following endometrial Receptivity assay. *Fertil Steril.* **2018**; 110(4):e243-244.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F et al. The endometrial Receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* **2013**; 100(3):818-24.
- Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simón C. What a difference two days make: “personalized” embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study. *Hum Reprod.* **2014**; 29(6):1244-7.
- Simón C, Gómez C, Cabanillas S, Vladimirov I, Castillón G, Giles J et al. A 5-year multicentre randomized controlled trial comparing personalized, frozen and fresh blastocyst transfer in IVF. *Reproductive BioMedicine Online* **2020**; 41(3):402-415.

- Simrandeep K, Padmaja N. Why results of endometrial receptivity assay testing should not be discounted in recurrent implantation failure? *The Onco Fertility Journal*. **2019**; 2(1):46-49.
- Stankewicz T, Valbuena D, Ruiz-Alonso M. Inter-cycle consistency versus test compliance in endometrial receptivity analysis test. *J Assist Reprod Genet*. **2018**; 35(7):1307-1308.
- Taguchi S, Funabiki M, Hayashi T, Tada Y, Iwaki Y, Karita M et al. The implantation rate of Japanese infertile patients with repeated implantation failure can be improved by endometrial Receptivity arrat (ERA) test: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*. **2018**; 110(4):e90.
- Valbuena D, Ruiz-Alonso M, Marin C, Soria J, Simon C, Garcia Velasco J. A. Endometrial thickness does not predict endometrial receptivity. In *HUMAN REPRODUCTION* **2016** (ESHRE); 31:255-256.

EMMA

Endometrial Microbiome Metagenomic Analysis

Antecedentes

El Proyecto Microbioma Humano (HMP) destaca **la importancia de los microorganismos y sus genomas en la salud de las personas y el estudio de las enfermedades** (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Este estudio ha demostrado la importancia de identificar desequilibrios (disbiosis) en la microbiota para mejorar el manejo clínico en diferentes áreas de la medicina.

Un estudio científico realizado por Igenomix **confirmó la existencia del microbioma endometrial**, y puso de manifiesto que la disbiosis de la cavidad uterina está asociada a peores resultados en pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida. Esto sugiere que, desviaciones patogénicas en los niveles de bacterias endometriales juegan un papel clave en la infertilidad. (Moreno et al. Am J Obstet Gynecol, 2016).

EMMA (Endometrial Microbiome Metagenomic Analysis) puede determinar si el entorno microbiano uterino es óptimo para la implantación del embrión.

EMMA proporciona una visión completa de la composición bacteriana endometrial, incluidos los patógenos causantes de endometritis crónica (EC) que pueden estudiarse específicamente en ALICE.



EMMA

Evaluates the
endometrium at the
microbiological level

Indicaciones para EMMA

Las ventajas del análisis del microbioma endometrial en pacientes con Fallo de Implantación Recurrente (RIF) y Aborto de Repetición (CM) han sido demostradas (Moreno et al. Am J Obstet Gynecol, 2016). En cualquier caso, **EMMA puede ser beneficioso para cualquier mujer que desee ser madre**, analizando el ADN microbiano presente en el entorno que recibirá al embrión.


Metodología

El **EMMA es un test molecular** que proporciona información sobre la microbiota en el tejido endometrial mediante el análisis de un panel personalizado de bacterias que incluye información sobre las especies de Lactobacillus más frecuentes y bacterias potencialmente patógenas del tracto reproductivo (algunas de ellas relacionadas con la endometritis crónica). Este método **se basa en la detección del ADN bacteriano mediante RT-PCR, que se traduce en diferentes perfiles que se han relacionado con el éxito del embarazo. La extracción de ADN seguida de la amplificación específica del microorganismo** permite cuantificar las bacterias específicas presentes en una muestra.

Una sola muestra de endometrio contiene células endometriales y bacterianas. Éstas pueden analizarse para predecir tanto la receptividad endometrial (mediante el test ERA) como el microbioma endometrial. **EMMA proporciona así una visión microbiológica del endometrio, dar soporte al manejo clínico de las pacientes.**

Ejemplo informe EMMA

El informe EMMA muestra 3 tablas con los rangos de referencia y los valores obtenidos para cada bacteria del panel, mediante el análisis de una muestra endometrial:



PART OF VITROLIFE GROUP

ENDOMETRIAL MICROBIOME METAGENOMIC ANALYSIS (EMMA)

Información de la paciente	Información de la muestra	Información de la clínica
NHC:	Fecha de recepción:	Clínica:
Nombre de la paciente:	Fecha/hora del informe:	Doctor:
Fecha de nacimiento:	Tipo de muestra:	
Alergia a antibióticos:	Tipo de ciclo:	
	Día del ciclo:	
	No. Biopsia:	
	Fecha de la biopsia:	

RESULTADOS DEL TEST EMMA:

LACTOBACILLUS			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Lactobacillus crispatus</i>	No detectada	N/A	≥ 3.71
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Detectada	4.26	≥ 3.60
<i>Lactobacillus iners</i>	No detectada	N/A	> 3.57
<i>Lactobacillus jensenii</i>	No detectada	N/A	≥ 3.70

PATÓGENOS DEL TRACTO REPRODUCTIVO			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Actinomyces israelii</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Atopobium vaginae</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Bacteroides fragilis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Bifidobacterium spp</i>	No detectada	N/A	≤ 4.22
<i>Clostridium sordellii</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Dialister spp</i>	Detectada	3.62*	≤ 3.57
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Gardnerella vaginalis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.72
<i>Haemophilus ducreyi</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Mobiluncus spp</i>	Detectada	3.77*	≤ 3.57
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Prevotella bivia</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Prevotella disiens</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Sneathia spp</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Treponema pallidum</i>	No detectada	N/A	absent

RESULTADOS DEL TEST ALICE:

PATÓGENOS RELACIONADOS CON ENDOMETRITIS CRÓNICA			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Enterococcus faecalis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.63
<i>Escherichia coli</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma genitalium</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma hominis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Staphylococcus aureus</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Streptococcus agalactiae group B/ Streptococcus viridans</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58

*Valores fuera del rango de referencia.

RECOMENDACIÓN

Igenomix recomienda realizar una transferencia de embriones en un endometrio Lactobacillus-dominado para aumentar las probabilidades de lograr un embarazo exitoso (1,2,3). Según las guías estándares de Microbiología (4,5), en caso de posible infección por las bacterias, cuyo ADN ha sido detectado, el tratamiento sugerido sería amoxicilina 500mg/8h, vía oral durante 7 días. Para recolonizar posteriormente el tracto reproductivo, se sugiere el uso de probióticos vaginales compuestos por Lactobacillus durante el periodo de días establecido por el fabricante y en la dosis indicada por el mismo.

Asimismo, recomendamos el análisis de una nueva biopsia una vez completado dicho tratamiento, siguiendo las instrucciones del test para la toma de muestras.

Los rangos de referencia para todas las bacterias incluidas en el test EMMA se han calculado analizando muestras de mujeres con un nacido vivo pertenecientes a un estudio clínico que dio lugar a la publicación científica *Moreno et al, Microbiome 2022*.

Los resultados del test EMMA se muestran en 3 tablas con la siguiente información:

1) **Tabla 1: cantidades de Lactobacillus** que se encuentran con mayor frecuencia en el tracto reproductivo.

LACTOBACILLUS			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Lactobacillus crispatus</i>	No detectada	N/A	≥ 3.71
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Detectada	3.21*	≥ 3.60
<i>Lactobacillus iners</i>	No detectada	N/A	> 3.57
<i>Lactobacillus jensenii</i>	No detectada	N/A	≥ 3.70

***Valores fuera del rango de referencia.**

Los valores **fuera del rango de referencia** se identifican en negrita y con un asterisco:

- Si al menos una de las especies de *Lactobacillus* se encuentra dentro del rango de referencia, se considera un resultado normal.
- Los niveles de *Lactobacillus* se considerarán fuera del rango cuando no se detecta ninguna de las especies analizadas o se detectan con valores por debajo del rango de referencia establecido.

2) **Tabla 2: patógenos comunes del tracto reproductivo con relevancia clínica y no relacionados con la endometritis crónica:**

PATÓGENOS DEL TRACTO REPRODUCTIVO			
<i>Actinomyces israelii</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Atopobium vaginae</i>	Detectada	3.72*	≤ 3.57
<i>Bacteroides fragilis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Bifidobacterium spp</i>	No detectada	N/A	≤ 4.22
<i>Clostridium sordelii</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Dialister spp</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Gardnerella vaginalis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.72
<i>Haemophilus ducreyi</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Mobiluncus spp</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Prevotella bivia</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Prevotella disiens</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Sneathia spp</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Treponema pallidum</i>	No detectada	N/A	absent

***Valores fuera del rango de referencia.**

Los valores de patógenos **fuera del rango de referencia** se identifican en negrita y con un asterisco.

Nota: Si alguno de los patógenos asociados a las Infecciones de Transmisión Sexual (*Haemophilus ducreyi* y/o *Treponema pallidum*) está fuera del rango de referencial, se recomendará una prueba confirmatoria adicional. Las infecciones causadas por estas bacterias son de notificación obligatoria a las Autoridades Sanitarias locales en los diferentes países. En caso de que se identifiquen estos patógenos, es responsabilidad del médico declarar estas infecciones.

3) **Tabla 3:** patógenos más frecuentes causantes de endometritis crónica (test ALICE)**RESULTADOS DEL TEST ALICE:**

PATÓGENOS RELACIONADOS CON ENDOMETRITIS CRÓNICA			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Enterococcus faecalis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.63
<i>Escherichia coli</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma hominis</i>	Detectada	3.71*	≤ 3.57
<i>Myoplasma genitalium</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Staphylococcus aureus</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Streptococcus agalactiae group B/ Streptococcus viridans</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58

***Valores fuera del rango de referencia.**

Los valores de **patógenos fuera del rango de referencia** se identifican en negrita y con un asterisco.

Nota: Si alguno de los **patógenos asociados a las Infecciones de Transmisión Sexual (*Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria Gonorrhoeae*)** está fuera del rango de referencia, se recomendará una prueba confirmatoria adicional. Las infecciones causadas por estas bacterias son de notificación obligatoria a las **Autoridades Sanitarias locales en los distintos países**. En caso de que se identifiquen estos patógenos, es responsabilidad del médico declarar estas infecciones.



El informe EMMA también incluye una recomendación (si es necesario) para lograr un tracto reproductivo dominado por *Lactobacillus*, aumentando las posibilidades de lograr el embarazo, como se describe en la literatura científica. Asimismo, se incluye también un apartado con la interpretación de todos los resultados obtenidos. Ejemplos:

RECOMENDACIÓN

Igenomix recomienda realizar una transferencia de embriones en un endometrio *Lactobacillus*-dominado para aumentar las probabilidades de lograr un embarazo exitoso (1,2,3). Según las guías estándares de Microbiología (4,5), en caso de posible infección por las bacterias, cuyo ADN ha sido detectado, el tratamiento sugerido sería azitromicina 500mg/24h el primer día y 250mg/12h durante 4 días. Para recolonizar posteriormente el tracto reproductivo, se sugiere el uso de probióticos vaginales compuestos por *Lactobacillus* durante el periodo de días establecido por el fabricante y en la dosis indicada por el mismo.

Asimismo, recomendamos el análisis de una nueva biopsia una vez completado dicho tratamiento, siguiendo las instrucciones del test para la toma de muestras.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO DE EMMA:

No se ha detectado DNA de bacterias potencialmente patógenas del tracto reproductivo, no relacionadas con endometritis crónica, en la muestra endometrial.

No se ha detectado DNA de *Lactobacillus* en la muestra endometrial. *Lactobacillus* es la bacteria predominante en el tracto reproductivo femenino durante la edad reproductiva. No es necesario tener diferentes especies de *Lactobacillus*, pero al menos una de ellas debería estar dentro del rango establecido como valor normal.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO DE ALICE:

Se ha detectado ADN de bacterias potencialmente patógenas del tracto reproductivo relacionadas con endometritis crónica fuera del rango de referencia. Igenomix recomienda normalizar esos valores antes de realizar una transferencia embrionaria para aumentar las probabilidades de lograr un embarazo según lo descrito en la bibliografía científica (1,2,3).

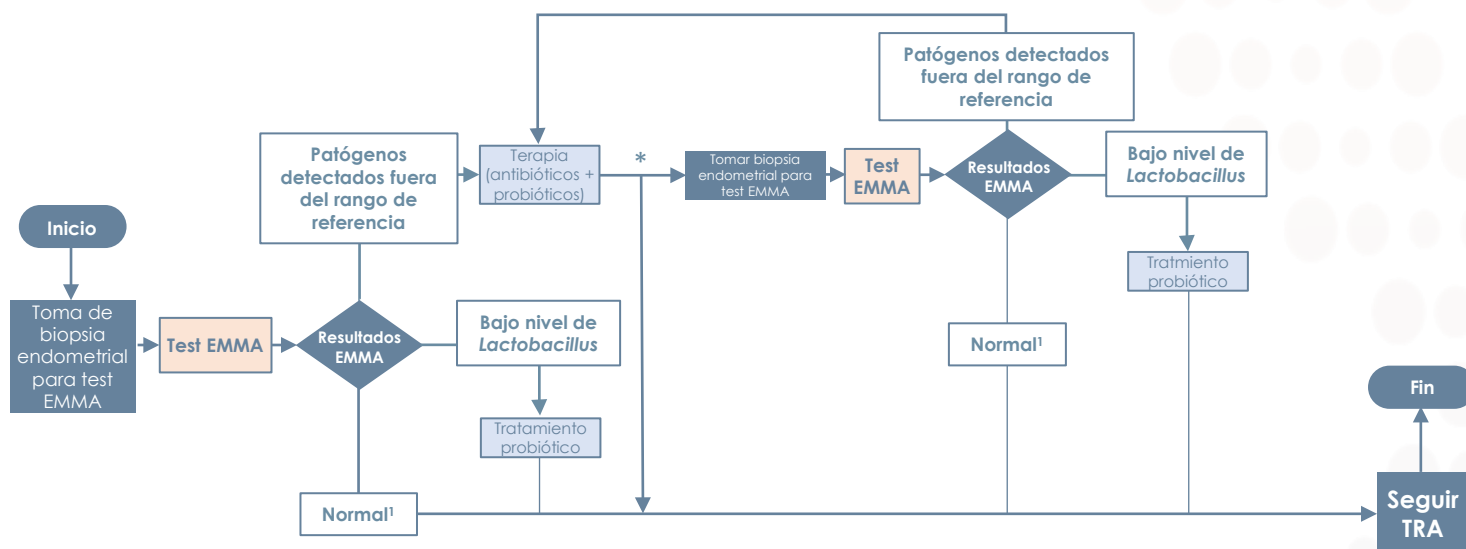
Nota: los números entre paréntesis en los texto del informe, hacen referencia a publicaciones científicas que se indican al final de informe.

Beneficios del análisis molecular de la microbiota vs el cultivo microbiano

El cultivo microbiano es el método estándar utilizado para la evaluación de la población de bacterias y las infecciones. Sin embargo, se ha demostrado que, dependiendo de la ubicación, entre el 20% y el 60% de las bacterias, no pueden ser cultivadas. La evaluación molecular del microbioma permite detectar las bacterias cultivables y no cultivables presentes en la muestra.

	CULTIVO	MOLECULAR
BASADO EN	La identificación de patógenos endometriales cultivables	El uso de RT-PCR para detectar todas las bacterias (incluyendo las de cultivo difícil)
OBJETIVIDAD EN LOS RESULTADOS	SI	SI
ESPECIFICIDAD (TTO AB DIRIGIDO)	SI	SI
DETECC. BACT. NO CULTIVABLES	NO	SI
TIEMPO RESULTADOS CORTO	NO	SI

Árbol de decisiones EMMA



¹ Normal: no se detectan patógenos y Lactobacillus dentro del intervalo de referencia.

* Tras el tratamiento, debe decidirse si se pasa directamente a la transferencia embrionaria o se repite la prueba EMMA para garantizar la eliminación de patógenos.



Referencias

- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207–14.
- Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazan J, Alonso R, Alama P, Remohi J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 215:684-703.
- Inmaculada Moreno; Jason M Franasiak. Endometrial microbiota - new player in town. *Fertility and Sterility.* 2017;108, pp. 32 - 39.
- Jason M Franasiak; Inmaculada Moreno; Carlos Simon. Microbiome in Embryonic Implantation and Implantation Failure. In: *Recurrent Implantation Failure, Etiologies and Clinical Management.* 2018; Chapter 11, pp. 175 - 195. Springer, Cham. ISBN 978-3-319-71966-5
- Carlos Simon; Inmaculada Moreno. Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction. *Reproductive Medicine and Biology.* 2018;18 - 1, pp. 40 - 50.
- Inmaculada Moreno; Carlos Simon. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertility and Sterility.* 2018 Aug;110(3):337-343. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.041.
- Garcia-Grau I, Simon C, Moreno I. Uterine microbiome-low biomass and high expectations. *Biol Reprod.* 2018 Dec 13; doi: 10.1093/biolre/iroy257. PMID: 30544156
- Inmaculada Moreno and Carlos Simon. Screening the Uterine Microbiome Prior to Embryo Transfer. In: *How to Prepare the Endometrium to Maximize Implantation Rates and IVF Success* Edited by G. Kovacs & L. Salamonsen; 2019. Chapter 6 (pp. 54-64). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781108236263.007
- Inmaculada Moreno, Iolanda Garcia-Grau, Carlos Simon. Microbiota and Pathogen Screening in the Female Reproductive Tract. In: *Encyclopedia of Reproduction.* 2018; Chapter 9, vol. 4, pp. 36 - 44. Academic Press: Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64730-X
- Garcia-Grau, I., Perez-Villaroya, D., Bau, D., Gonzalez-Monfort, M., Vilella, F., Moreno, I., Simón, C. Taxonomical and functional assessment of the endometrial microbiota in a context of recurrent reproductive failure: a case report. *Pathogens* **2019**,8, 205.



- Moreno, I., Garcia-Grau, I., Bau, D., Perez-Villaroya, D., Gonzalez-Monfort, M., Vilella, F., Romero, R., Simón, C. The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **2020** Apr;222(4):296-305.
- Moreno, I., Garcia-Grau, I., Perez-Villaroya, D., Gonzalez-Monfort, M., Bahçeci, M., Barrionuevo, M.J., Taguchi, S., Puente, E., Dimattina, M., Lim, M.W., Meneghini, G., Aubuchon, M., Leondires, M., Iquierdo, A., Perez Olgíati, M., Chavez, A., Seetharm K., Bau, D., Gomez, C., Valbuena, D., Vilella, F., Simón, C. Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in fertile patients. *Microbiome*. **2022** Jan 4;10(1):1. doi: 10.1186/s40168-021-01184-w

ALICE

Analysis of Infectious Chronic Endometritis



Antecedentes

El mejor ejemplo de una patología causada por una microbiota anormal es la Endometritis Crónica (EC). **La EC es una inflamación persistente del endometrio, causada por una infección uterina provocada por bacterias patógenas.** Generalmente es asintomática y los métodos habituales de diagnóstico (histología, histeroscopia y cultivo microbiano) no son eficaces, por lo que la enfermedad suele pasar desapercibida a pesar de que afecta aproximadamente al 30% de las pacientes infértiles, y puede llegar al 66% de las pacientes con Fallo de Implantación Recurrente y Aborto de Repetición.

Un estudio realizado por Igenomix ha demostrado que el análisis molecular de la EC es un método de diagnóstico fiable en comparación con los métodos clásicos (*Moreno et al. Am J Obstet Gynecol, 2018*). **Este nuevo enfoque debería mejorar la detección de esta patología endometrial a menudo no diagnosticada, al identificar microorganismos específicos y permitir un tratamiento guiado y personalizado.**

ALICE (Analysis of Infectious Chronic Endometritis), detecta las bacterias más frecuentes causantes de endometritis crónica. Esto amplía el servicio ofrecido por Igenomix, para evaluar el endometrio a nivel microbiológico, con el objetivo de mejorar el manejo clínico de las pacientes con esta enfermedad silenciosa.

Indicaciones para ALICE

ALICE puede ser beneficioso para cualquier paciente que desee concebir, al evaluar el entorno microbiológico que encontrará el embrión en el momento de la implantación. ALICE también puede ser beneficioso para pacientes con antecedentes de aborto recurrente y/o fallo de implantación, ya que el CE se ha relacionado con estos eventos.

Metodología

El test ALICE utiliza RT-PCR para proporcionar un cribado molecular de la EC en el tejido endometrial mediante el análisis de las bacterias que con mayor frecuencia se relacionan con la enfermedad (*Streptococcus agalactiae* (grupo B) y *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*).

La tecnología utilizada para este fin se basa en la extracción de ADN seguida de una amplificación específica del microorganismo que permite cuantificar las bacterias objetivo presentes en una muestra. Tras recibir la biopsia endometrial y extraer el material genético (ADN), se evalúan los requisitos mínimos de calidad de la muestra antes de utilizar las técnicas de detección.

Una sola muestra de endometrio contiene tanto células endometriales como bacterianas. Éstas pueden analizarse mediante secuenciación para predecir la receptividad endometrial y RT-PCR para el estudio de los patógenos mencionados.



ALICE

Detects the bacteria causing chronic endometritis

Ejemplo informe ALICE

El informe EMMA muestra una tabla con los rangos de referencia y los valores obtenidos para cada bacteria del panel, obtenido del análisis de una muestra endometrial:



Igenomix[®]
PART OF VITROLIFE GROUP

ANALYSIS OF INFECTIOUS CHRONIC ENDOMETRITIS (ALICE)

Información de la paciente	Información de la muestra	Información de la clínica
NHC:	Fecha de recepción:	Clínica:
Nombre de la paciente:	Fecha/hora del informe:	Doctor:
Fecha de nacimiento:	Tipo de muestra:	
Alergia a antibióticos:	Tipo de ciclo:	
	Día del ciclo:	
	No. Biopsia:	
	Fecha de la biopsia:	

RESULTADOS DEL TEST ALICE:

PATÓGENOS RELACIONADOS CON ENDOMETRITIS CRÓNICA			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Enterococcus faecalis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.63
<i>Escherichia coli</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma genitalium</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma hominis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Staphylococcus aureus</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Streptococcus agalactiae group B/ Streptococcus viridans</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58

RECOMENDACIÓN

No recomendamos realizar ninguna intervención microbiológica.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO DE ALICE

No se ha detectado DNA de bacterias potencialmente patógenas, relacionadas con endometritis crónica, en la muestra endometrial.

COMENTARIOS ADICIONALES

Ninguno

Los valores de **patógenos fuera del rango de referencia** se identifican en negrita y con un asterisco.

RESULTADOS DEL TEST ALICE:

PATÓGENOS RELACIONADOS CON ENDOMETRITIS CRÓNICA			
BACTERIA	RESULTADO	VALOR	RANGO DE REFERENCIA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Enterococcus faecalis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.63
<i>Escherichia coli</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma genitalium</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Mycoplasma hominis</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	No detectada	N/A	absent
<i>Staphylococcus aureus</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Streptococcus agalactiae</i> group B/ <i>Streptococcus viridans</i>	No detectada	N/A	≤ 3.57
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	No detectada	N/A	≤ 3.58

*Valores fuera del rango de referencia.

Nota: Si alguno de los **patógenos asociados a las Infecciones de Transmisión Sexual (*Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria Gonorrhoeae*)** está fuera del rango de referencia, se recomendará una prueba confirmatoria adicional. Las infecciones causadas por estas bacterias son de notificación obligatoria a las Autoridades Sanitarias locales en los distintos países. En caso de que se identifiquen estos patógenos, es responsabilidad del médico declarar estas infecciones.

El informe ALICE también muestra una recomendación (en caso necesario) para aumentar las probabilidades de lograr un embarazo sano, tal como se describe en la literatura científica, así como una interpretación del resultado obtenido.

RECOMENDACIÓN

Igenomix recomienda realizar una transferencia de embriones en un endometrio Lactobacillus-dominado para aumentar las probabilidades de lograr un embarazo exitoso (1,2,3). Según las guías estándares de Microbiología (4,5), en caso de posible infección por las bacterias, cuyo ADN ha sido detectado, el tratamiento sugerido sería amoxicilina 500 mg/8h, vía oral durante 7 días. Para recolonizar posteriormente el tracto reproductivo, se sugiere el uso de probióticos vaginales compuestos por Lactobacillus durante el periodo de días establecido por el fabricante y en la dosis indicada por el mismo. Asimismo, recomendamos el análisis de una nueva biopsia una vez completado dicho tratamiento, siguiendo las instrucciones del test para la toma de muestras.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO DE ALICE:

Se ha detectado ADN de bacterias potencialmente patógenas del tracto reproductivo relacionadas con endometritis crónica fuera del rango de referencia. Igenomix recomienda normalizar esos valores antes de realizar una transferencia embrionaria para aumentar las probabilidades de lograr un embarazo según lo descrito en la bibliografía científica (1,2,3).

En caso de prescribir un tratamiento, recomendamos analizar una nueva biopsia una vez terminado para confirmar la normalización de los valores de las bacterias patógenas. La nueva muestra debe tomarse siguiendo las indicaciones del test.

COMENTARIOS ADICIONALES

Ninguno.

Nota: los números entre paréntesis en los texto del informe, hacen referencia a publicaciones científicas que se indican al final de informe.

Beneficios del análisis molecular de la microbiota vs histología, histeroscopia y cultivo microbiano.

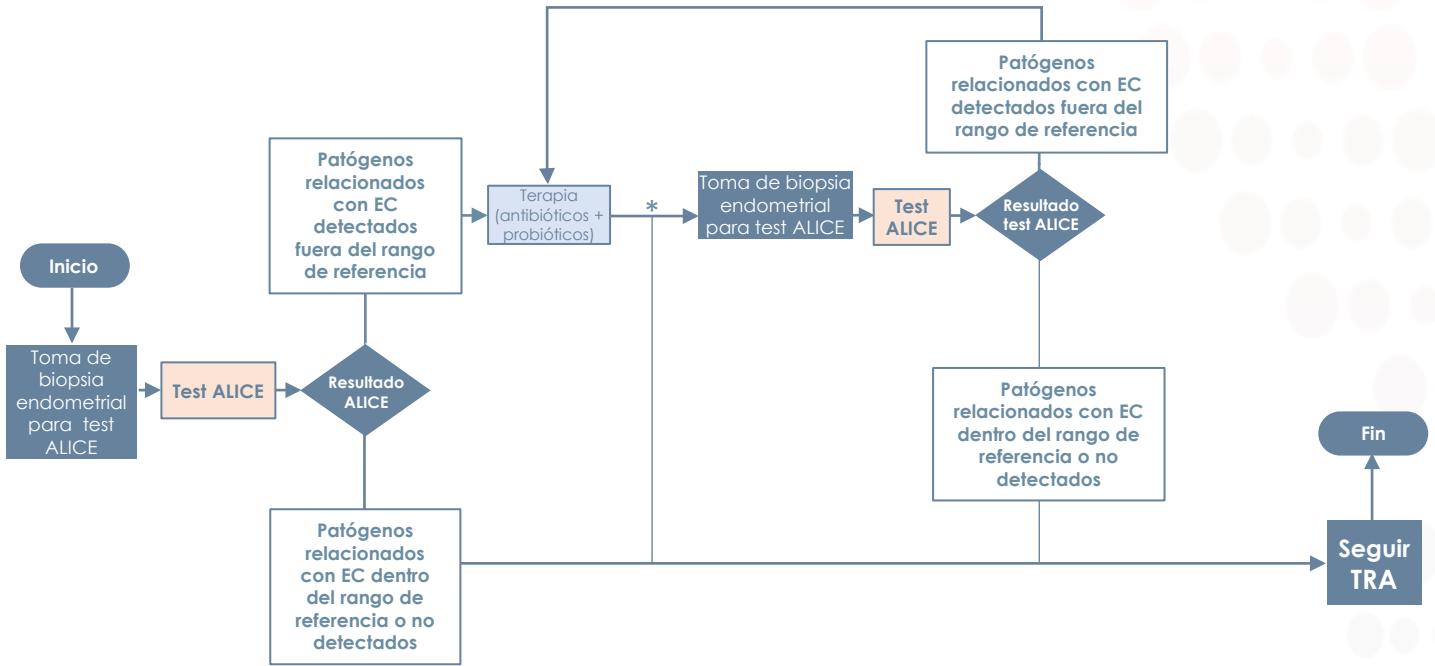
El diagnóstico actual de la EC se basa tradicionalmente en la histología, la histeroscopia y/o el cultivo microbiano. Sin embargo, **estos tres métodos clásicos proporcionan resultados no concluyentes o erróneos en el 80% de los casos.** Mientras que la histología suele infradiagnosticar la EC, la histeroscopia suele sobrediagnosticar la enfermedad. Estos métodos no pueden identificar con precisión los agentes patógenos causantes de la enfermedad, y a menudo se prescriben antibióticos de amplio espectro.

El cultivo microbiano es capaz de aislar el patógeno causante; sin embargo, entre el 20% y el 60% de las bacterias no pueden cultivarse en condiciones de laboratorio estándar o no suelen evaluarse en la práctica clínica.

La microbiología molecular presenta resultados equivalentes a los resultados combinados obtenidos mediante el uso de histología, histeroscopia y cultivo microbiano (Moreno et al. Am J Obstet Gynecol, 2018).

	HISTOLOGÍA	HISTEROSCOPIA	CULTIVO	MOLECULAR
BASADO EN	Identificación de células plasmáticas CD138+ en el estroma endometrial	Identificación de edema estromal, hiperemia epitelial focal o difusa y/o la presencia de micropólipos	Identificación de patógenos endometriales cultivables	Uso de RT-PCR para detectar el ADN de todas las bacterias (incluso las difíciles de cultivar)
OBJETIVIDAD EN LOS RESULTADOS	NO	NO	SI	SI
ESPECIFICO (Tto AB dirigido)	NO	NO	SI	SI
DETECC. BACT NO CULTIVABLES	NO	NO	NO	SI
TIEMPO RESULTADOS CORTO	NO	SI	NO	SI

Árbol de decisión ALICE



* Tras el tratamiento, debe decidirse si se pasa directamente a la transferencia embrionaria o se repite la prueba ALICE para garantizar la eliminación de patógenos.



ALICE

Detects the bacteria
causing chronic
endometritis

Referencias

- Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, Marocchella S, Greco P, Resta L. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum Reprod*, 2015; 30(2):323-30.
- Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, De Ziegler D, Resta L. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci* 2014; 21(5):640-7.
- Moreno I, C. Simón. Microbiological diagnosis: the human endometrial microbiome—Endometritis. In: *The Endometrial Factor, A Reproductive Precision Medicine Approach*. Edited by Simón C and Giudice L. Taylor & Francis Group; 2017. Chapter 5. DOI: 10.1201/9781315151472
- Moreno I, Cicinelli E, Garcia-Grau I, Gonzalez M, Bau D, Vilella F, De Ziegler D, Resta L, Valbuena D, Simon C. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am J Obstet Gynecol*. 2018; 218(6):602.e1-602.e16

Biopsia Endometrial



Requisitos para la toma de la biopsia endometrial

- La biopsia endometrial para los test ERA, EMMA, ALICE o EndomeTRIO debe tomarse siguiendo todas las indicaciones de este manual.
- La biopsia endometrial puede tomarse en la consulta del ginecólogo, sin utilizar anestesia. **Si se va a tomar una biopsia durante una histeroscopia, se recomienda tomarla al inicio del procedimiento**, antes de distender la cavidad uterina y sin utilizar tratamiento antibiótico antes, durante o después del procedimiento. La biopsia sólo puede tomarse si la histeroscopia es observacional y no se va a realizar alguna intervención.
- **Para realizar los test EMMA o ALICE (solos o con el test ERA), debe evitarse la administración de antibióticos al menos los 7 días previos a la toma de la muestra, durante el procedimiento y hasta la recepción de los resultados del test.** De este modo, el microbioma del día de la biopsia será representativo del microbioma del paciente el día en que se reciban los resultados de la prueba. **Cualquier fármaco que pueda alterar la microbiota o el estado inmunológico del paciente también debe incluirse en el formulario de solicitud del test**, incluyendo todos los datos relacionados con la toma de antibióticos durante el mes anterior a la biopsia (principio activo, vía de administración, dosis y duración del tratamiento).



Día de la biopsia endometrial para ERA solo o combinado con EMMA/ALICE

En el caso de que se solicite un test ERA (solo o combinado con otros test), la biopsia endometrial debe realizarse de acuerdo con las indicaciones descritas a continuación:

- 1. El diagnóstico ERA es válido para el tipo de ciclo en el que se realizó el test**, por lo que el embrión debe transferirse en el mismo tipo de ciclo y en la ventana personalizada de implantación dentro de la cual se obtuvo un diagnóstico "Receptivo". Por lo tanto, el tipo de ciclo para la biopsia debe coincidir con el tipo de ciclo previsto para la transferencia embrionaria.
- 2. Tipo de ciclo:** Terapia hormonal sustitutiva (P+5) o Ciclo natural (hCG+7/LH+7/Ovulación+6) como se explica a continuación. Nota: Si se van a transferir embriones de día 3, la biopsia debe realizarse igualmente en P+5 o hCG+7/LH+7/Ovulación+6, ya que la ERA comprueba el endometrio en el momento de la implantación. De este modo, si tiene un resultado receptivo en P+5, transferirá un blastocisto en P+5 o un embrión de día 3 dos días antes, es decir, en P+3.

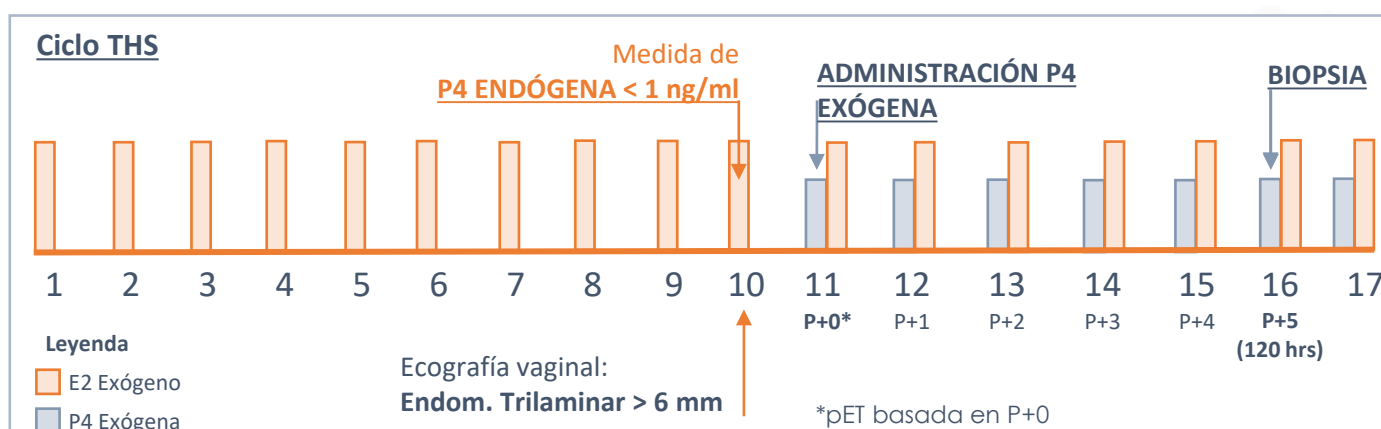
2a) Ciclo de Terapia Hormonal Sustitutiva (THS): consiste en un tratamiento con estrógenos y progesterona para preparar el endometrio de forma controlada, similar a un ciclo natural para la transferencia de embriones, utilizando el protocolo habitual de la clínica o nuestro protocolo estándar:

La paciente inicia la terapia con estradiol a partir del 1º o 2º día del ciclo menstrual. La ecografía se realiza entre 7 y 10 días después. Tenga en cuenta que no recomendamos que la terapia con estradiol se prolongue más de 17 días antes del inicio de la toma de progesterona.



Se inicia la toma de progesterona (P4) cuando se alcanza un endometrio trilaminar >6 mm con una P4 sérica <1 ng/ml (en las 24 horas previas al inicio de la P4 exógena), continuando con el tratamiento de estradiol. El día en que se inicia el tratamiento con P4 se denomina P+0, y la biopsia se toma el día P+5, tras 5 días completos (120 horas desde la primera toma hasta la recogida de la biopsia).

Protocolo THS de rutina:



- En un ciclo de THS es muy importante asegurarse de que no hay ovulación, por lo que el nivel de P4 endógena debe medirse siempre en las 24 horas previas a la primera toma de P4. El nivel debe ser <1ng/ml, de lo contrario la recomendación es cancelar el ciclo y comenzar uno nuevo. Si no se controla adecuadamente la P4 endógena, puede producirse un artefacto de P4 endógena que puede afectar a la precisión y reproducibilidad de los resultados de la ERA.
- El tiempo de transferencia embrionaria personalizado (pET) se basará en el tiempo total de exposición a la progesterona exógena (el punto de referencia será el día P+0).



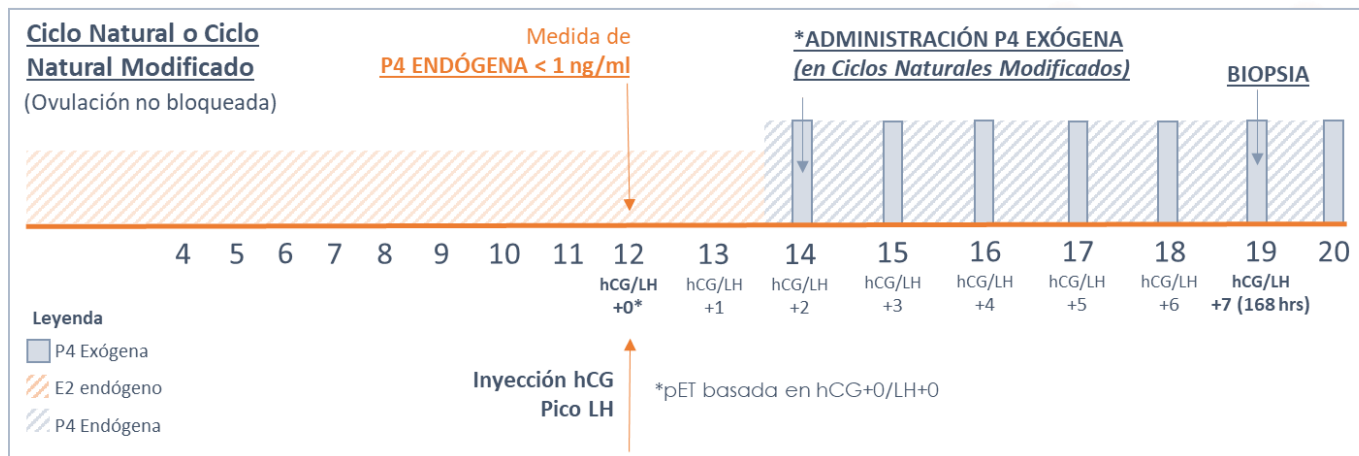
2b) Ciclo natural: Para los Ciclos Naturales siempre necesitamos tener una fecha de referencia en cuanto al momento de la ovulación, que podría ser una de las tres opciones siguientes:

- i. Fecha de hCG (recombinante o urinaria):** se administra hCG según los parámetros rutinarios en un ciclo natural (tamaño del folículo >17 mm). El día de la administración de hCG se considera como hCG+0 y la biopsia se tomará 7 días después, a las hCG+7 (168 horas después del disparo de hCG).
- ii. Fecha del pico de LH:** para detectar correctamente el pico de LH, los niveles de LH en orina o sangre deben medirse durante varios días seguidos (a partir del día 9 en un ciclo regular) obteniendo al menos un resultado positivo flanqueado por dos negativos. El día del pico de LH se considera como LH+0 y la biopsia se tomará 7 días después, a LH+7.
- iii. Fecha de ovulación:** La muestra también puede recogerse en un ciclo natural, durante la fase secretora, ya que la ovulación induce la producción de estrógenos y progesterona. El día de la ovulación determinado por ecografía se considerará Ov+0 y la biopsia se recogerá 6 días después, a Ov+6.

En los ciclos Naturales, se puede administrar un suplemento de progesterona, denominándose entonces ciclos Naturales Modificados. En estos ciclos la fecha de referencia para la recomendación de pET sigue siendo la fecha de hCG/LH/Ovulación. La suplementación con progesterona puede iniciarse a partir de LH+1/hCG+1/Ov+0 en el momento en que habitualmente se realiza en la práctica clínica habitual de su centro (nunca previo disparo de hCG o aumento de LH). Debe tenerse en cuenta que el momento en el que se inicia la suplementación con progesterona, debe replicarse también en el ciclo de transferencia (es decir, si una paciente inicia la suplementación con progesterona en hCG+2 para el ciclo de biopsia, debe iniciarse también en hCG+2 en el ciclo de transferencia, independientemente del resultado obtenido).



Ciclo natural: Protocolo de rutina



Para asegurarse de que no hay escape de progesterona endógena en el momento del disparo de hCG/pico de LH, el nivel de P4 endógena debe medirse siempre en hCG+0/LH+0 y éste debe ser <1ng/ml, de lo contrario la recomendación es cancelar el ciclo y comenzar uno nuevo. Si no se controla adecuadamente la P4 endógena puede producirse un artefacto de P4 endógena que puede afectar a la precisión y reproducibilidad de los resultados de la ERA.

La transferencia personalizada de embriones (pET) se basará en hCG/LH/ovulación. Tenga en cuenta que si no disponemos de esta información en los ciclos naturales, nuestra recomendación es cancelar el análisis. El test ERA no puede realizarse sin esta fecha de referencia ya que el resultado no sería reproducible.



Día de la biopsia endometrial para EMMA y/o ALICE (sin ERA)

Para los test EMMA/ALICE la paciente debe **evitar los antibióticos al menos 7 días antes de la recogida de la biopsia, durante el procedimiento y después del mismo hasta que se reciban los resultados.**

Las **biopsias endometriales para las pruebas EMMA&ALICE deben recogerse siempre en fase secretora** porque éste es el periodo de máxima estabilidad de la microbiota del tracto reproductivo debido a la influencia de los estrógenos y la progesterona. **Una muestra tomada fuera de la fase indicada a continuación, podría darnos un resultado poco fiable.**

Si sólo se solicita una prueba EMMA o ALICE, la biopsia endometrial puede tomarse siguiendo el mismo protocolo que para la ERA. Si no se sigue el protocolo ERA, la biopsia debe tomarse de la siguiente manera:

- a) **Ciclos THS:** las muestras deben tomarse durante los días de toma de progesterona (P+1 en adelante), preferiblemente el día P+5.
- b) **Ciclo Natural o Natural Modificado:** La biopsia debe tomarse entre los días 15 y 25 del ciclo menstrual si la paciente tiene ciclos regulares (entre 26 y 32 días).

Para las pacientes con ciclos no regulares, se recomienda realizar un ciclo de THS o controlar la ovulación. En este caso, la biopsia puede tomarse en los días:

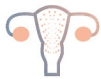
- LH+2 a LH+12 (ambos inclusive)
- hCG+2 a hCG+12 (ambos inclusive)
- Ov+1 a Ov+11 (ambos inclusive)



- c) **Píldoras anticonceptivas orales (ACO):** sólo para ACO con determinadas composiciones. Por favor, confirme siempre con nuestros especialistas clínicos antes de programar la biopsia. La biopsia debe tomarse entre **los días 14 y 21 de ACO (días de toma de píldoras activas cuando la paciente toma las píldoras placebo), o a partir del día 14 (si la paciente no toma píldoras placebo ni descansa, y está en uso continuo).**

Día de la biopsia endometrial: tabla resumen

Tipo ciclo	ERA	EMMA&ALICE	Comentarios
THS	P+5 (120hrs)	P+1 en adelante	
Natural o Natural Modificado	hCG+7 (168 hrs) LH+7 (168 hrs) Ov+6 (144 hrs)	hCG+2 a hCG+12 LH+2 a LH+12 Ov+1 a Ov+11 Días de ciclo 15 a 25 (solo para pacientes con ciclos regulares)	Para pacientes con ciclos no regulares que soliciten test EMMA/ALICE, recomendamos realizar un ciclo THS o monitorizar la ovulación. Para cada periodo, se incluyen la primera y la última fecha.
Durante ACOs	NO	Días 14 - 21 de ingesta de píldoras activas (si la paciente toma píldoras placebo) Día 14 en adelante (ingesta continua de píldoras activas)	No todos los ACOs son adecuados para los test EMMA/ALICE. Recomendamos consultar con nuestros especialistas la idoneidad del mismo antes de programar la biopsia. Para cada periodo, se incluyen la primera y la última fecha.



Día de la biopsia endometrial: Protocolos no válidos

Tipo de ciclo	Día de ciclo	ERA	EMMA&ALICE	Comentarios
Ciclo de estimulación ovárica	NA	NO	NO	Las muestras no se pueden recolectar en un ciclo de estimulación ya que las condiciones no se pueden replicar durante el ciclo pET y el microbioma no es representativo debido a que los niveles hormonales no son comparables a los de un ciclo Natural o THS.
Biopsia durante la fase folicular	NA	NO	NO	Las muestras solo se deben recoger durante la fase secretora para garantizar la estabilidad del microbioma.



Protocolo Biopsia Endometrial

Una sola biopsia endometrial es suficiente para un test individual o para EndomeTRIO (ERA, EMMA o ALICE). Igenomix suministrará un criotubo para cada biopsia. El criotubo contiene 1,5 ml de una solución transparente para conservar el material genético.

1. **Limpiar el cuello uterino con una gasa estéril y seca** (evitar el uso de betadine) y no introducir líquido en el endometrio.
2. **Etiquete el tubo** con: nombre del paciente, fecha de nacimiento y fecha de la biopsia.
3. **La biopsia endometrial debe tomarse del fondo uterino mediante un catéter Pipelle** (Genetics, Hamont Achel, Bélgica) o similar.
4. **Recoja al menos 70 mg de tejido** (corresponde a una pieza cúbica de tejido con lados de aproximadamente 7mm). **El volumen de la muestra no debe exceder la línea blanca marcada en el criotubo (correspondiente a 1/3 del volumen total del criotubo; ver imagen abajo)**. Para cantidades mayores de tejido, no habrá suficiente solución estabilizadora en el criotubo pudiendo dar lugar a la degradación del ARN.





5. **Asegúrese de que la muestra realmente contenga tejido endometrial, no solo de sangre o mucosidad.** También se deben evitar cantidades excesivas de sangre o moco.
6. **Evite el contacto de la muestra con cualquier solución que no sea la solución estabilizadora del criotubo (no lave la muestra).**
7. **Una vez realizada la biopsia, la muestra debe transferirse inmediatamente al criotubo suministrado, evitando tocarlo con la pipeta y agitando enérgicamente durante al menos 10 segundos** (para garantizar que la solución penetre en el tejido y establezca el ARN de la muestra).
8. **El criotubo que contiene la muestra debe transferirse inmediatamente a un refrigerador (4-8°C /39-46°F) y almacenarse allí durante al menos 4 horas** (no colocar en el congelador antes de completar estas 4 horas).
9. **Después de refrigerar durante al menos 4 horas, las muestras pueden enviarse a Igenomix a temperatura ambiente.** Si las muestras van a estar expuestas a temperaturas >35°C/95°F, recomendamos enviar las muestras con un paquete de gel frío. Las entregas a temperatura ambiente nunca deben exceder los 5 días.
10. **Las muestras también se pueden guardar en nevera hasta 3 semanas o se pueden congelar a -20°C/-4°F** (después de las primeras 4 horas a 4-8°C/39-46°F) si no se van a enviar a Igenomix de inmediato. Sin embargo, en el caso de una prueba EMMA, ALICE, o EndomeTRIO, la recomendación es procesar la muestra lo antes posible después de la recolección, ya que el microbioma puede fluctuar con el tiempo. No recomendamos retrasar el envío de muestras más de una semana.



Logística

Muestras y documentos:

- Lea y cumplimente debidamente la información requerida en “Formulario de solicitud” y “Consentimiento Informado”.
- Coloque el criotubo suministrado por Igenomix, que ya contiene la biopsia endometrial, en el interior del receptáculo de plástico que encontrará en el kit y ciérrelo. Introduzca el receptáculo dentro de la caja del kit y ésta dentro del sobre de plástico de retorno.
- Incluya el documento “Formulario de solicitud y Consentimiento” dentro del sobre de retorno.
- Dependiendo de su localización, puede necesitar incluir en el sobre de retorno la etiqueta “UN3373”. Dicha etiqueta viene incluida dentro del kit proporcionado. Por último, pegue el albarán que se le ha proporcionado desde Atención al paciente en el sobre de retorno.
- Los envíos a temperatura ambiente no deberán exceder los 5 días de duración para asegurar la acción estabilizadora del líquido del criotubo. Cuando se superen los 35°C/95F°, se recomienda añadir un acumulador de frío al paquete. En caso de duda, por favor contacte con nuestro departamento de Atención al Cliente.

Envío:

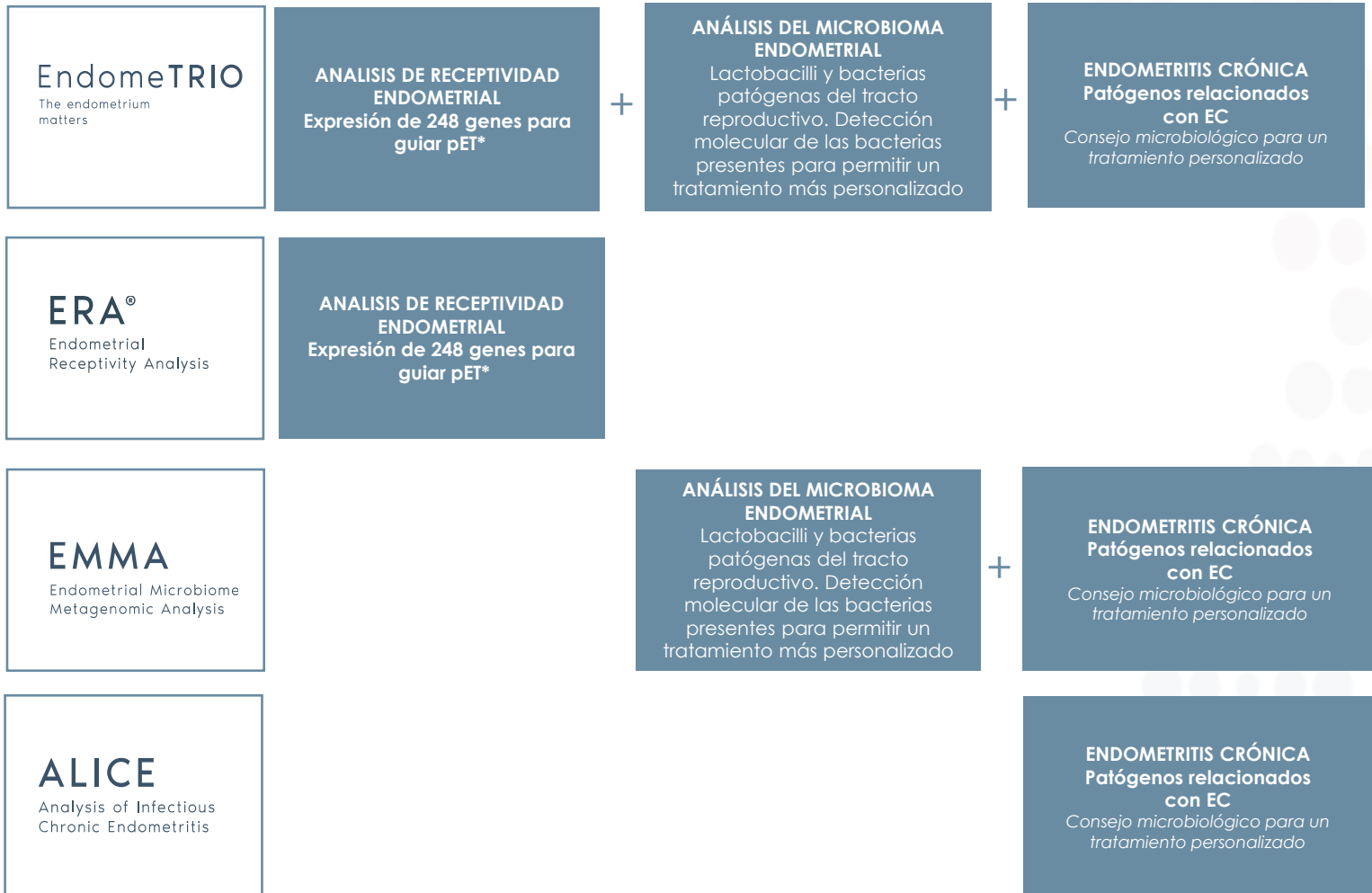
- Por favor, infórmenos mediante correo electrónico de cada envío, indicando el número de muestras y su número de historia clínica o referencia.
- Puede usar su empresa de mensajería habitual, o si lo desea, podemos informarle sobre nuestro servicio de recogidas.



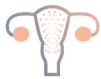
Una visión completa de la salud endometrial

TEST SOLICITADO

TEST INCLUIDOS Y APLICACIÓN



*pET: transferencia embrionaria personalizada



Lista de abreviaturas

ACOs	Píldoras Anticonceptivas Orales
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALICE	Análisis de endometritis crónica infecciosa
ARN	Ácido Ribonucleico
E2	Estrogenos
EC	Endometritis crónica
EMMA	Análisis Metagenómico Microbioma Endometrial
ERA	Análisis Receptividad Endometrial
hCG	Gonodotropina coriónica humana
HMP	Proyecto de Microbioma Humano
IMC	Índice de masa corporal
LH	Hormona Luteinizante
NGS	Secuenciación de nueva generación
Ov	Ovulación
P4	Progesterona
pET	Transferencia embrionaria personalizada
RIF	Fallos Recurrentes de Implantación
RPL	Aborto Recurrente
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
THS	Terapia Hormonal Sustitutiva
WOI	Ventana de implantación

