
	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 1 de 12

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO	3
2. ALCANCE	3
3. CAMPO DE APLICACIÓN	3
4. RESPONSABLES	3
5. DEFINICIONES	3
6. DESARROLLO	4
6.1 CONDICIONES DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	4
6.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA FERTILIZACIÓN IN VITRO	6
6.3 PROCEDIMIENTOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO	12
6.3.1 CAPTACIÓN OVOCITARIA	12
6.3.2 FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL	17
6.3.3 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)	22
6.4 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO ENBRIONARIO	31
6.4.1 DÍA 1 DE DESARROLLO (FECUNDACIÓN)	32
6.4.2 DÍA 2 DE DESARROLLO (CLIVAJE)	36
6.4.3 DÍA 3 DE DESARROLLO (CLIVAJE)	37
6.4.4 DÍA 4 DE DESARROLLO (MÓRULA)	41
6.4.5 DÍA 5 - DÍA 6 DE DESARROLLO (BLASTOCISTO)	41
6.5 TRANSFERENCIA EMBRIONARIA	44
6.6 SCREENING GENETICO PGS NO INVASIVO	47
6.7 ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES	51
7. BIBLIOGRAFÍA	56
8. CONTROL DE REGISTRO.	57

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 2 de 12

1. OBJETIVO

Definir los procedimientos que se realizan en el laboratorio de Fecundación In Vitro de la IPS Fertility Care y los lineamientos generales para el aseguramiento de la calidad y seguridad de los pacientes al momento de su ejecución.

2. ALCANCE

Dirigido a todo el personal encargado del Laboratorio de Fecundación In Vitro y al personal asistencial que apoyo de procesos relacionados con el área.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Laboratorio de Fecundación In Vitro

4. RESPONSABLES


Embriólogos
Bacteriólogos
Personal Asistencial

5. DEFINICIONES

MEDIO DE CULTIVO: Líquidos con formulación específica para permitir el desarrollo de células o microorganismos.

ALÍCUOTA: es una parte que se toma de un volumen (alícuota líquida) o de una masa (alícuota sólida) iniciales, para ser usada en una prueba de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.

GAMETO: son las células sexuales haploides de los organismos pluricelulares originadas por meiosis a partir de las células germinales

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 3 de 12

CCO: complejo cúmulo-corona -ovocito

FIV: Fecundación In vitro convencional

ICSI: Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides por sus siglas en inglés (Intracytoplasmic Sperm Injection).

EMBRIÓN: etapa inicial del desarrollo de un ser vivo mientras se encuentra en el útero.

BLASTOCISTO: embrión de 5/6 días de desarrollo que presenta una estructura celular compleja formada por aproximadamente 200 células. es el estadio de desarrollo previo a la implantación del embrión en el útero materno.

6. DESARROLLO


6.1 CONDICIONES DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO

6.1.1 Ubicación del Laboratorio:

El laboratorio de FIV de la IPS Fertility Care es exclusivo para Tratamientos de Reproducción Asistida y se encuentra ubicado en la torre médica de la clínica Porto Azul.

Cuenta con:

- Filtros de aire (HEPA)
- Presión positiva
- Temperatura estable (22-25°C)
- Humedad controlada
- Luz regulable
- Ubicado contiguo a la sala de transferencia

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 4 de 12

- Acceso restringido al personal externo
- Se debe utilizar la vestimenta adecuada (pijama, polainas, gorro y tapabocas)

6.1.2 Calidad del aire


Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) son altamente embriotóxicos, y conocer su concentración en el ambiente es de vital importancia. Existen normas con respecto a los niveles aceptados en un laboratorio de FIV y es de vital importancia su cumplimiento porque cualquier contaminación en pequeño o alto grado afecta la viabilidad de los embriones, es por ello que, para garantizar la calidad del aire del laboratorio, éste cuenta con presión positiva y purificador de aire el cual permanece encendido.

6.1.3 Luz

La luz provoca en los embriones de ratón la formación de dímeros de timina y ROS (reactive oxygen species) los cuales afectan negativamente al DNA, proteínas y lípidos que como consecuencia trae retraso en el crecimiento y disminución en las tasas de feto vivo. Estos son agentes causantes de estrés en los embriones en cultivo que se traduce en variaciones importantes en su metabolismo. Por esta razón se utiliza dentro del laboratorio luz amarilla en vez de blanca.

6.1.4 Equipos y Materiales

- La pintura utilizada en un laboratorio de FIV es pintura tipo Epoxi que no contiene disolventes orgánicos.
- Superficies de trabajo de acero inoxidable.
- Piso de vinilo.
- Paredes y Techo de superficie no porosa de fácil limpieza.
- El detergente que se utiliza para limpiar el piso, las paredes y superficies de amplio espectro y no toxico para los gametos y embriones
- Todo equipo nuevo o reparado es evaluado y validado.
- La incubadora de CO₂ (HERACELL) maneja una temperatura de 37°, CO₂ al 6%, humedad al 95%, pH=7.23. La incubadora posee un suministro constante sin interrupciones (SAI: Suministro automático independiente). Se realiza el registro de temperatura en y CO₂ diario FERT-BR-F-050-

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 5 de 12

INCUBADORA, esto permite detectar variaciones en las mediciones de gases y Temperatura y así tomar acciones correctivas pertinentes


- La incubadora Trigas (K-SYSTEMS) (CO₂, NITRÓGENO, OXÍGENO) maneja una temperatura de 37°, concentraciones de CO₂ 7.5% y Oxígeno 5.0%, pH=7.23. La incubadora posee un suministro constante sin interrupciones (SAI: Suministro automático independiente). Se realiza el registro de temperatura, CO₂ y O₂ diario FERT-BR-F-002 CONTROL DE GASES INCUBADORA TRIGAS, esto permite detectar variaciones en las mediciones de gases y Temperatura y así tomar acciones correctivas pertinentes
- Cuenta con circuito de alerta, alarmas de aviso conectadas al servicio de mantenimiento y de alerta a embriólogos encargados del área
- Cabina de flujo laminar
- Estación de trabajo con platinas térmicas
- Estereomicroscopio
- Microscopio invertido con sistema de micro manipulación.
- Material estéril
- Material embriotestado

6.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA FERTILIZACIÓN IN VITRO

6.2.1 Consideraciones generales

En el laboratorio de Reproducción Asistida, la calidad del desarrollo embrionario y la consecuente posibilidad de embarazo dependen en gran medida de la calidad del medio de cultivo que se utilice y la forma en cómo se manipulen dichos medios.

Cada medio de cultivo en su inserto detalla las condiciones de almacenamiento y preparación que se deben seguir al pie de la letra. En la mayoría de los casos estos medios deben mantenerse en nevera 2-8°C ó congelador -20°C. La temperatura óptima de trabajo es de 37°C. La osmolaridad debe estar controlada (285-287 mosmol/Kg) y el pH controlado (7.2 - 7.4). Se debe trabajar (dependiendo del caso) con medios tamponados, dispensados en microgotas (más estable, más económico), cubiertos con aceite para evitar la evaporación y mantener las condiciones del medio. Siempre que se esté manipulando con medios de cultivo, se debe trabajar sobre superficies calefactadas. Adicionalmente se debe contar con accesorios que mantengan la temperatura como son los “heating blocks” y los


	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 6 de 12

“termocoins”, entre otros. Se recomienda abrir poco la incubadora y minimizar el tiempo de exposición de los líquidos foliculares, ovocitos y embriones fuera de la incubadora. Se ha demostrado científicamente que temperaturas más bajas pueden provocar alteraciones en la placa metafásica y aneuploidías. Temperaturas altas, pueden provocar la desnaturalización de las enzimas de las proteínas embrionarias.


6.2.3 Características de los Medios de cultivo utilizados en el laboratorio de Fecundación In Vitro

A Continuación, se describen las características y el uso de cada uno de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio de Fecundación In Vitro de la IPS Fertility Care.

MEDIO	FABRICANTE	COMPOSICIÓN	USO
Global® Total® W/ Hepes	Life Global	Cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, bicarbonato de sodio, glucosa, lactato, sal de sodio, piruvato de sodio, aminoácidos, EDTA, rojo de fenol, HEPES, albúmina de suero humano * (10 mg / ml), sulfato de gentamicina * (10 µg / ml), * de material fuente de grado terapéutico	Lavado y manipulación de ovocitos y embriones humanos, fertilización por inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI), transferencia de embriones Se requiere un medio tamponado con HEPES cuando los ovocitos y los embriones se manejan fuera de una incubadora de CO2.
Global® Total® for Fertilization	Life Global	Cloruro de sodio, piruvato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, bicarbonato de	Cultivo de ovocitos humanos y fertilización. Al ser un medio suplementado con

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 7 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		

		sodio, lactato de sodio, glucosa, aminoácidos, EDTA, rojo de fenol, suplemento de proteína LifeGlobal®* (4.4 mg / ml), α y humano β -globulinas * (0,6 mg / ml), sulfato de gentamicina * (10 μ g / ml), * a partir de material fuente de grado terapéutico	proteínas tamponadas con bicarbonato repleto de glucosa, lactato, piruvato y 20 aminoácidos es óptimo para soportar el ovocito, las células cúmulos y los espermatozoides unidos.
Global® Total®	Life Global	Cloruro de sodio, piruvato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, bicarbonato de sodio, lactato de sodio, glucosa, aminoácidos, EDTA, rojo fenol, suplemento de proteína LifeGlobal * (4.4 mg / ml), α y β humano -globulinas * (0.6 mg / ml), sulfato de gentamicina * (10 μ g / ml), * a partir de material fuente de grado terapéutico	Cultivo de embriones humanos de cigoto a blastocisto, transferencia de embriones. Al ser un medio suplementado con proteínas tamponadas con bicarbonato repleto de glucosa, lactato, piruvato y 20 aminoácidos es óptimo para apoyar el crecimiento y desarrollo de embriones humanos in vitro.
LiteOil®	Life Global	Aceite mineral de calidad farmacéutica.	Aceite para cubrir los medios de cultivo en la incubadora y evitar evaporación
Nid Oil™	Nidacon	Aceite ligero de parafina.	Aceite para cubrir los medios de


 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 8 de 12

			cultivo en la y evitar evaporación
Hyase-10X™	Vitrolife	Solución salina fisiológica que contiene hialuronidasa y albúmina sérica humana.	Medio para la eliminación de células del cúmulo y corona radiata que rodea a los óvulos
ICSI™	Vitrolife	Solución viscosa que contiene Albúmina humana recombinante y PVP (Polivinilpirrolidona)	Medio para la inmovilización y aislamiento de espermatozoides para la Inyección intracitoplasmática (ICSI)
Pentoxifilina®	Sanofi laboratorios	Agente hemorreológico medicamento derivado xantínico	Estimulante de la movilidad de los espermatozoides

6.2.3 Preparación de medios de cultivo para procedimientos de fecundación In vitro

Algunos medios por sus características y estabilidad es necesario prepararlos, reconstituirlos o suplementarlos, a continuación, se describe el procedimiento:

1. La preparación debe efectuarse el día anterior a los procedimientos de laboratorio y teniendo en cuenta el número programado de los mismos.
2. Limpiar la superficie de la cámara de flujo laminar donde se van a preparar los medios, teniendo en cuenta que esta debe ser en la zona fría de la misma (Zona no termorregulada). La apertura de los frascos y la preparación de los medios se debe realizar siempre en el interior de la cámara de flujo laminar.
3. Si queda medio en los frascos, los mismos deben ser sellados con cinta Parafilm, colocada la fecha de apertura y colocados en la nevera de refrigeración.
4. Si a los medios y reactivos se les hacen pequeñas alícuotas, deben escribirse en los nuevos frascos el nombre completo del mismo, lote, fecha de vencimiento y fecha de abertura, sellarlos con cinta Parafilm y refrigerarlos hasta su uso.

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	Código	
		PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1
			Página 9 de 12


5. Los medios con HEPES no pueden colocarse en las incubadoras con CO₂ o O₂, a menos que los tubos estén bien sellados con Parafilm; es preferible su colocación en incubadora de temperatura solamente.

Hyase -10X (Enzima de Decumulación de Óvulos)

1. Los tubos de Hyase -10X, deben permanecer bien cerrados y conservados en un lugar oscuro de +2 a +8 °C. (Refrigeración).
2. Hyase -10X es estable hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta del envase y el certificado de análisis del lote correspondiente.
3. Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desechar el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.
4. Esta enzima no se encuentra en la concentración de uso; cada frasco contiene un volumen de 0.1 ml a concentración de 800 UI/ml, lo cual debe diluirse en porción 1:10 con medio Global Total con Hepes bien mezclado.
5. En dicha dilución 1:10, quiere decir que en el frasco de 0.1 ml o 100 µl de Hyase -10X, debemos adicionar 900 µl de Global Total con Hepes, previamente estabilizado a 37°C sin entrada de gases (CO₂ y O₂).
6. Preparar el mismo día de uso, 15 minutos antes de iniciar la decumulación y dejarla en la placa de 4 pozos, en la posición demarcada y sobre la platina calefactada de la cabina de flujo laminar; cada frasco de enzima diluida es para para cada decumulación de una paciente solamente.

Pentoxifilina

1. Preparar una solución de 2 mg/ml.
2. Pesar 2 mg de pentoxifilina en un microtubo de 1,5ml y añadir 1ml de Global for Fertilization.
3. Filtrar la solución utilizando un filtro de 0,22 y una jeringa
4. Hacer alícuota en cantidades de 50 µl en microtubos estériles y se marca en la caja de almacenamiento la fecha de preparación, concentrado de pentoxifilina, así como el lote correspondiente y fecha de vencimiento.
5. Las alícuotas se almacenan después en el congelador con temperaturas de -15 a -30°C y cubierto de la luz.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 10 de 12

6. Este reactivo se prepara según las necesidades y la caducidad.

6.2.4 condiciones de almacenamiento


- Los medios de cultivo en stock deben almacenarse en neveras con temperatura controlada (2-8°C)
- Deben estar protegidos de la luz
- Las tapas luego de su apertura deben ser selladas con Parafilm en caso que haya quedado medio en los frascos madre, se debe anotar la fecha de apertura.

6.3 PROCEDIMIENTOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO

6.3.1 CAPTACIÓN OVOCITARIA

La captación de óvulos es el proceso indicado para las pacientes a las cuales se les ha realizado ciclos de estimulación ovárica para procedimientos de fertilización In vitro (FIV, ICSI), donación de óvulos, acumulación o preservación de los mismos por vitrificación. Ésta consiste en una intervención quirúrgica que realiza un ginecólogo en el quirófano con el fin de recuperar los ovocitos que hay en el interior de los folículos del ovario.

Las pacientes, antes de someterse a la aspiración folicular, han pasado por un proceso controlado por el equipo médico y monitoreado por medio de: controles diarios de ecografía (medida y número de folículos) y niveles de estradiol (cómo crecen y qué hay dentro de los folículos). Cuando se observa que el diámetro de 2-3 folículos es mayor de 18 mm se administrará la HCG con el fin de inducir la ovulación. 36 horas después de la administración de la HCG, se extraen en el quirófano los líquidos foliculares mediante un sistema de aspiración controlado (la presión de aspiración a la que se fija el aspirador es de 100 Pascales) acoplada a una aguja de punción que al mismo tiempo está unida a una sonda vaginal. (Fig. 1)

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 11 de 12

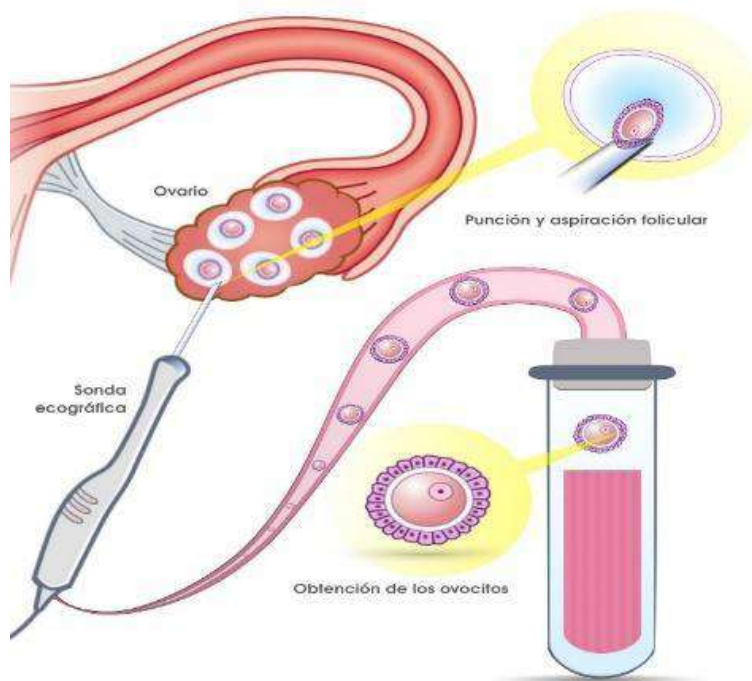



Figura 1. Aspiración folicular de ovarios para obtención de folículos para procedimientos de FIV


- **Día previo a la captación**

1. El médico encargado de la estimulación de la paciente la con el fin de constatar la aplicación del inductor de la ovulación (18 horas post administración) y así programar los últimos detalles de la punción, que será a las 36 horas después de esta administración.
2. Una vez confirmada la hora del procedimiento es informada a laboratorio en donde el embriólogo es el encargado de organizar todo el material necesario para el procedimiento. A continuación, se presenta una tabla resumen. (Tabla. 1)

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 12 de 12

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos	Elementos de protección personal
<ul style="list-style-type: none"> Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl 	<ul style="list-style-type: none"> Cámara de Flujo Laminar con Superficie Térmica 	<ul style="list-style-type: none"> Global total con Hepes 	<ul style="list-style-type: none"> Tapabocas
<ul style="list-style-type: none"> Puntas de Stripper 275 µm 	<ul style="list-style-type: none"> Incubadora 37°C, 5% O₂ y 7.5% CO₂ 		
<ul style="list-style-type: none"> Placas de Petri 35mm 	<ul style="list-style-type: none"> Incubadora 37°C y 7.5% CO₂ 		
<ul style="list-style-type: none"> Placas de Petri 60mm 	<ul style="list-style-type: none"> Micropipeta Stripper 	<ul style="list-style-type: none"> Lite Oil® Global Total for Fertilization 	<ul style="list-style-type: none"> Guantes de nitrilo estériles Gorro desechable
<ul style="list-style-type: none"> Placas de Petri 100 x 15 mm 	<ul style="list-style-type: none"> Micropipeta 20-200 µl 		
<ul style="list-style-type: none"> Tubo Falcon 14ml fondo redondo 	<ul style="list-style-type: none"> Microscopio Óptico Invertido 		
<ul style="list-style-type: none"> Jeringa de 1ml 	<ul style="list-style-type: none"> Estereomicroscopio con Superficie Térmica 		
<ul style="list-style-type: none"> Frasco de Colecta 120 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Lápiz de Punta de Diamante 		
<ul style="list-style-type: none"> Gasas Estériles 	<ul style="list-style-type: none"> Marcado Permanente 		
<ul style="list-style-type: none"> Frasco de Cuello Inclinado 	<ul style="list-style-type: none"> Sistema de Aspiración Folicular 		
	<ul style="list-style-type: none"> Bloque Térmico para Tubos 		

Tabla 1. Materiales, medios y reactivos necesarios para la captación ovocitaria

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 13 de 12


Para cada punción se debe preparar el material así:

- Una vez Analizada la historia clínica de la paciente, se debe diligenciar FERT-BR-F-052 SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI y con base a la información que se tenga de la cantidad de los folículos estimulados y su tamaño se prepararán tubos de 14 ml Falcon de tapa a presión y se dejarán precalentando en la incubadora de temperatura o en el baño seco de sala de procedimiento.
- 2 tubos Falcon con 6 ml de Global total con Hepes, con la tapa bien cerrada y dejarlos en el bloque de calentamiento dentro de la cabina de flujo laminar.
- 2 tubos Falcon con 6 ml de Global total con Hepes con la tapa bien cerrada y dejarlos en el baño seco de temperatura que se encuentra en la sala de procedimientos para el lavado del sistema de aspiración folicular.
- 1 tubo de 15 ml con Aceite mineral según la cantidad de placas de lavado o placas ICSI que se utilizarían.
- Colocar placas de 90 mm medio abiertas en la platina calefactada dentro de la cabina de flujo laminar.
- Colocar material descartable a un lado, dentro de la cabina de flujo laminar, dicho material es: Placas de 35 mm, placas de 60 mm, Cajas 4 pozos, jeringas de insulina, frasco de colecta de 120 ml y gasas estériles.
- Verificar disponibilidad en incubadora y sus compartimientos, demarcar una cámara por paciente preferiblemente y en la parte externa con un papel adhesivo escribirle el nombre de la paciente, procedimiento, fecha de realización y de cultivos; dejar la cámara separada hasta el siguiente día que sería utilizada.

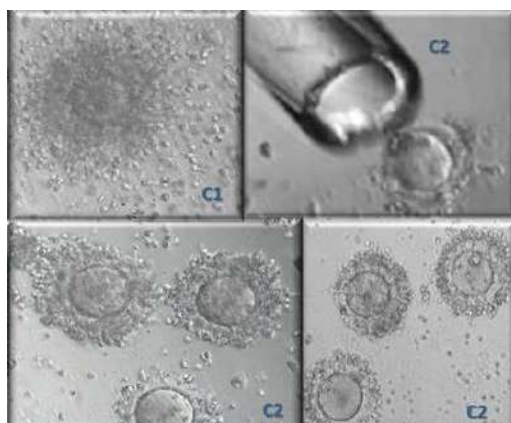
• **Día de la Punción**

Fase 1. Obtención de los óvulos.

1. Preparar un frasco de colecta de 120 ml para descartar los líquidos foliculares, después de ser retirados los óvulos. Terminada la punción, cerrar este recipiente y colocar en la bolsa de residuos hospitalarios o roja.
2. Abrir totalmente las placas de Petri de 100 x 15 mm ya que se aprovecha tanto la tapa como la base y distribuir las en toda la superficie térmica de la cabina de flujo laminar aproximadamente 15 minutos antes de la punción.
3. Identificar con el nombre de la paciente, en la tapa y fondo de dos de las placas de 35 mm o de 60 mm, las cuales serían las placas de lavado de los óvulos.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 14 de 12

4. Verificar que la placa de equilibrio de óvulos que contiene Global Total for Fertilization + Aceite mineral tiene el nombre de la paciente en tapa o el borde de la placa de 4 pozos y numerar los pozos del 1 al 4. Volver a colocar la placa en la incubadora a 37°C y 7.2% CO₂.
5. Identificar a la paciente que entra en la sala de procedimientos para la punción folicular y comprobar que SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI corresponde al paciente que está por iniciar el procedimiento. La auxiliar o enfermera que está en la sala deberá estar atenta en todo a la paciente.
6. Los 1 tubo de 14 ml con 6 ml de global total con Hepes, deberán estar desde el día anterior en la sala para lavar la aguja de aspiración folicular antes y después del procedimiento y así evitar que un óvulo se pierda en el sistema.
7. Cuando la auxiliar o enfermera de él aviso que el ginecólogo inició la aspiración, en ese momento se destapa las placas de 35 mm o de 60 mm y se le vierte los 2 ml de global total con Hepes, este medio está precalentados desde el día anterior.
8. Cuando sea entregado el primer tubo que contenga el líquido folicular aspirado, este debe ser vertido individualmente en una placa de Petri de 100 x 15 mm previamente calentado.
9. Mover cuidadosamente la placa para buscar los óvulos en el Estereomicroscopio con placa calefactada. Adecuar la altura necesaria del equipo para conseguir dominar un mayor campo visual, lo que facilita bastante la localización. La detección de los óvulos es fácil, debido al aspecto refringente de las células del *cúmmulus oophorus* (Figura 2). Revisar con atención a los bordes de la placa.




	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 15 de 12

Figura 2. Imagen C1 un óvulo rodeada de las células del *cúmmulus oophurus* y maduro, imágenes C2, óvulos con pocas células del *cúmmulus oophurus* circundantes. Observación realizada en Estereomicroscopio.

10. Cuando se encuentra el primer Complejo Cúmulo Ovocito (CCO), con la ayuda del sistema de aspiración con chupa, aspirar el CCO con la menor cantidad de sangre y líquido folicular posible y pasarlo inmediatamente a la primera placa de lavado que contiene global total con Hepes, de este modo se procederá con la recuperación de todas las estructuras del líquido folicular contenido ya en las placas de Petri de 100 x 15mm

11. Una vez terminada la punción y la obtención de los óvulos de un ovario, se procede al segundo.


Importante: Nunca se deben acumular más de 3 tubos en el bloque térmico. Si es así, se debe notificar inmediatamente a la sala de procedimientos para que el ginecólogo deje de aspirar durante unos minutos hasta que se analicen todos los tubos. Alternativamente se debe pedir ayuda a algún colega disponible en el laboratorio cualificado para ejecutar esta tarea.

12. Obtener los óvulos del segundo ovario, siguiendo los mismos pasos del primero. Depositar los óvulos en la placa 1 o 2 de global total con hepes (Utilizar una tercera placa, sólo cuando el número de óvulos del primer ovario es mayor que 20). Tener cuidado para mantener las placas siempre en la superficie térmica.

Fase 2. Lavado de los óvulos.

13. Cuando la enfermera o auxiliar marque el aviso que termina la aspiración, ir pasando los óvulos con la ayuda del sistema de aspiración con chupa al primer pozo la placa de 4 pozos para el lavado que contiene 0.5 ml de Global for fertilization cubierto con 0,5 ml de Aceite mineral, previamente gaseado desde el día anterior en atmósfera de 7.2% CO₂/37°C, en donde permanecerán hasta el momento de la Inseminación en caso de que el procedimiento a seguir sea FIV o hasta la denudación 2hrs posteriores en caso de que la técnica sea una ICSI.

14. Limpiar los óvulos de forma mecánica aspirando y liberando en la placa de lavado, verificar su cantidad y que estén totalmente limpios.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 16 de 12

15. Confirmar el nombre del paciente escrito en la placa con el nombre del SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI

Fase 3. Clasificación morfológica de los óvulos.

16. Evaluar morfológicamente los óvulos y clasificarlos de acuerdo con la información de la tabla 2. Registrar todos los datos en el formulario SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI

17. **Tabla 2.** La clasificación del CCO más utilizada

Clasificación	Descripción
Grado 1	Cumulus disperso, corona expandida y suelta, tratándose generalmente de óvulos maduros en el estado de MII (metafase II).
Grado 2	Cumulus en el estado intermedio entre compactado y suelto, pudiendo corresponder a óvulos en MI (metafase I).
Grado 3	Cumulus muy compacto, normalmente corresponde a óvulos en el estado de Vesícula Germinal.
Grado 4	Cumulus oscuro y muy disperso, con agregados de células, corona irregular o incompleto, zona peluda visible, ooplasma oscuro. Corresponde a óvulos post-maduros.

La evaluación morfológica puede presentar algún grado de dificultad, debido a las células de la granulosa que rodean el óvulo, por lo tanto, ésta es meramente subjetiva y puede variar entre observadores.


6.3.2 FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL

La fertilización In Vitro Convencional consiste en la obtención y preparación de gametos femeninos y masculinos y luego dejados en contacto, de modo que entre ellos ocurra una interacción bioquímica y conseguir una fecundación en condiciones in vitro.

La FIV se puede realizar sola o combinada con la ICSI, y se pueden utilizar óvulos propios o de donante y semen de la pareja o de donante.

La FIV se desarrolla inicialmente para el tratamiento de la esterilidad tubárica grave, pero actualmente se emplea en otras muchas indicaciones tales como:

- Infertilidad asociados a patologías tubárica bilateral.
- Endometriosis.
- Fallas de inseminación artificial (homologa y heteróloga).
- Disfunción ovárica.
- Esterilidad de origen desconocido.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 17 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		


- Esterilidad por factor masculino no grave. (Insuficiencia para IA, REM ≤ 3 millones).
- Falla ovárica y disminución de la reserva ovárica.
- Criopreservación de embriones en pacientes oncológicos o con patología médica.

6.3.2.1 PROCEDIMIENTO

- Confirmar e identificar los medios a utilizar en los tubos y placas pertinentes.
- Confirmar la identidad de los pacientes en el formato (SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI con la información de las placas de mantenimiento de óvulos y FIV.
- Los procedimientos solo se realizan después de que los pacientes han leído, aceptado y firmado el consentimiento informado (Consentimiento FIV – ICSI ovulo donado semen donado) (Consentimiento FIV/ ICSI ovulo donado semen propio) (Consentimiento FIV/ ICSI ovulo propio semen donado) o (Consentimiento FIV/ ICSI ovulo y semen propio) según cual será el origen de los gametos utilizados
- Siempre que se realice manipulación de óvulos debe ser en superficies con temperaturas controladas (37°C).
- Se prepara el material necesario el cual se resume en la siguiente tabla.

Tabla. 3 material necesario para FIV

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos	Elementos de protección personal
<ul style="list-style-type: none"> • Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de Flujo Laminar 	<ul style="list-style-type: none"> • Global Total for Fertilization • Global total 	<ul style="list-style-type: none"> • Tapabocas
<ul style="list-style-type: none"> • Placas de Petri 35mm 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubadora 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂ 		<ul style="list-style-type: none"> • Guantes de nitrilo estériles
<ul style="list-style-type: none"> • Placas de Petri 60mm 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubadora 37°C y 6.5% CO₂ 		
<ul style="list-style-type: none"> • Tubo Falcon 14ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Micropipeta 0,2-20 µl 		

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 18 de 12


	<ul style="list-style-type: none"> • Micropipeta 20-200 µl 	<ul style="list-style-type: none"> • Aceite mineral 	<ul style="list-style-type: none"> • Gorro desechable
	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopio Óptico Invertido 		
	<ul style="list-style-type: none"> • Estereomicroscopio 		
	<ul style="list-style-type: none"> • Marcador permanente 		

- Una vez obtenidos los óvulos por punción folicular, éstos se encuentran incubados para su estabilización a 37°C en condiciones de CO₂ 7.2% y O₂ 5.0%, se procederá a ser inseminados de 4 a 6 horas posteriores a su extracción, al ser un procedimiento de FIV los ovocitos no serán deanudados, si no que serán puestos en contacto con la dilución del semen para que se logre una fecundación semi natural, el procedimiento se realizará así:

Dilución de la muestra de semen: La muestra de semen previamente capacitado como se describe en el BR-M-002 - MANUAL DE ANDROLOGÍA se le debe hacer un procedimiento adicional (Swim Up) con el medio Global for fertilization previamente gaseado 7.2% de CO₂ y atemperado a 37°C con mínimo 6 horas de anterioridad. El botón de semen recuperado que queda al final del proceso de capacitación, se pone en contacto con 500µl a 1000ul de Global for fertilization dependiendo la concentración de semen según lo observado por el embriólogo y se deja en la incubadora a 37°C a 7.2% de CO₂ por aproximadamente 45 minutos, con la tapa cerrada para evitar la entrada de gases. Figura. 3



Figura 3. Bloque térmico a 45 grados para swim up.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1
			Página 19 de 12

Luego de pasado este tiempo se procede a realizar el cálculo de la dilución de semen que se utilizará para inseminar los óvulos, para muestras de semen de buena calidad (concentraciones entre 20 – 50 mll/ml) se estima que la concentración ideal de espermatozoides por gota de dilución es de 300.000 a 400.000 (0.3 – 0.4), en sémenes con baja concentración (menores a 10 mll/ml) se ajustará la dilución a una concentración de 700.000 o más, dependiendo de la calidad espermática.

El cálculo se realiza usando esta fórmula:

$$Cd \times Vd$$

$$Vi = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(A+B/100) \times [\quad] \text{ espermatozoides posterior al swim Up}$$

Donde:

Cd= concentración deseada, es la concentración en la que se quiere que esté la dilución del semen, por ejemplo: 0.3 o 0.4 si el semen es de buena calidad.

Vd= El volumen deseado se establece teniendo en cuenta el número de óvulos que se van a inseminar y partiendo de que las gotas para la inseminación se harán de 50 µl, así por ejemplo si tenemos 6 óvulos para inseminar el volumen final de la dilución sería 300µl.


A+B / 100= es la fracción decimal de la suma de espermatozoides con movilidad A y B obtenidos posterior al lavado ejemplo: A:80 B: 10 = 90/100 = 0.90

[] Espermatozoides posterior al swim Up = Concentración final de espermatozoides luego del lavado por ejemplo 10 mll/ml

Ejemplificando el cálculo se realiza así:

$$Vi = \frac{0.3 \times 300\mu l}{0.90 \times 10} = 10 \mu l$$

Entonces debemos tomar 10 µl del recuperado del Swim Up que se realizó con global for fertilization y diluirlo en 290 µl de Global for fertilization previamente atemperado a 37°C y equilibrado con CO2 a 7.2% y O2 a 5.0%, esta dilución se hace en un tubo falcón de 5 ml.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente 25/05/2022	Versión 1	Página 20 de 12

Luego de realizar la dilución se debe hacer 3 conteos en cámara de Makler para verificar que la concentración final si fue la correcta (0.3), una vez verificado que, si la dilución está en la concentración deseada, se prepara las cajas para la inseminación.

Cajas para la fertilización:

1. Las cajas de fertilización se deben marcar con los nombres y apellidos de la paciente y se debe numerar los ovocitos que serán inseminados.
2. Se utilizan cajas de 35 mm o 60 mm y se proceden a hacer gotas con la micropipeta de 20 a 200 μ l, primero se hacen tres gotas de lavado de 40 μ l en la parte superior de la caja, estas se hacen con Global for fertilization, se cambia la punta y se hacen 6 gotas de 50 μ l de la dilución del semen en la parte media y baja de la caja, luego se agrega aproximadamente 3.5 ml de aceite mineral o 6, 5 ml dependiendo la caja usada para cubrir las gotas (**figura 4.**), este procedimiento se hace bajo el lente del estereomicroscopio, de debe dejar el óvulo en el fondo de la gota
3. Las cajas se llevan a incubar a 37°C en atmósfera de CO₂ 7.2% Y O₂ 5.0% hasta la hora de observar la fecundación de 15 a 20 horas posteriores a la inseminación.
4. Diligenciar todos los datos de hora de inseminación, número de óvulos inseminados y dilución de semen utilizada en el FERT-BR-F-052

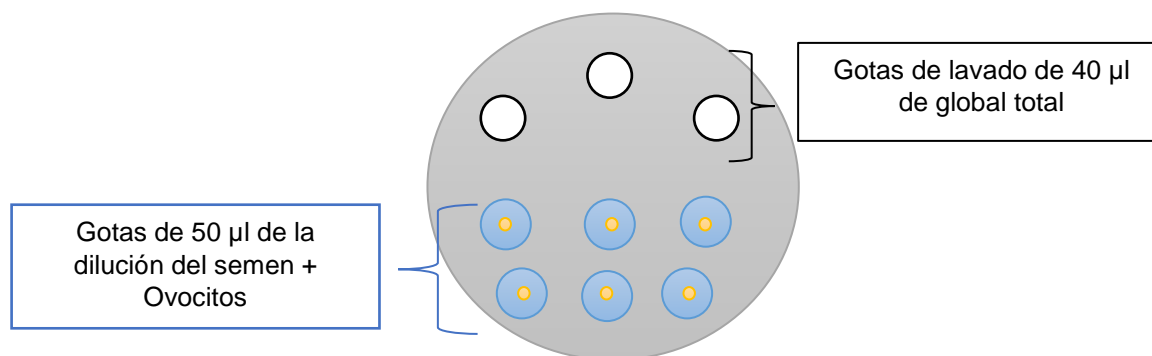



Figura 4. Caja de inseminación para FIV

5. Cumplidas las 20 horas post- inseminación, se procede a cambiar los óvulos inseminados a otra caja de crecimiento, para este procedimiento con la ayuda de un stripper con punta de 175 μ m se toma uno por uno de los ovocitos y se

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente 25/05/2022	Versión 1	Página 21 de 12

lavan en las gotas superiores de la caja para terminar de eliminar el resto de células del complejo cúmulo – corona.

6. Los óvulos se pasan a una caja de crecimiento que se hace con Global Total y se deja de uno a 2 óvulos por gota (**figura 5**), esta caja debe tener lista desde el día anterior bajo condiciones de incubación a 37°C y en atmósfera de CO₂ 7.2% Y O₂ 5.0%.
7. Luego de esto se procede a evaluar la fecundación de los ovocitos en el microscopio invertido.

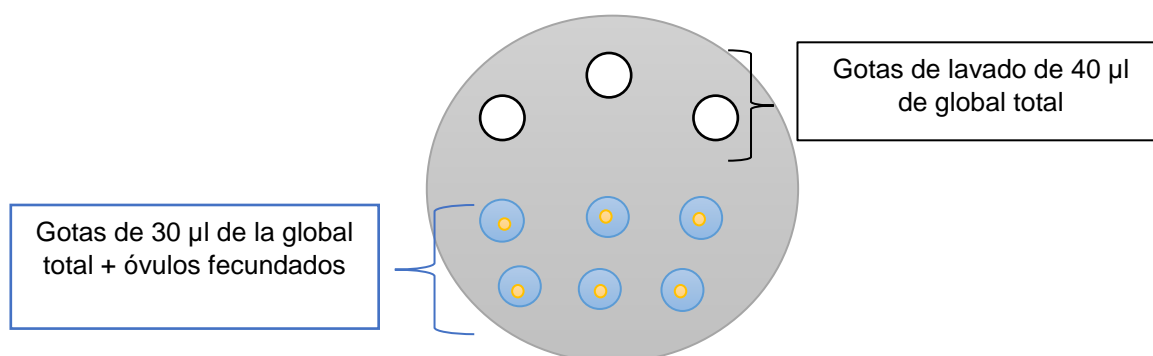


Figura 5. Caja de crecimiento embrionario


8. La evaluación del desarrollo embrionario se explicará detalladamente en numeral **6.3** de este manual.

6.3.3 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La técnica de la ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) consiste en la introducción de un único espermatozoide dentro de un óvulo.

Las principales indicaciones de esta técnica es la esterilidad de causa masculina. Esta técnica ha mejorado notablemente el pronóstico reproductivo de hombres con oligozoospermia, Astenozoospermia, Teratozoospermia e incluso azoospermia. Se recurre a la utilización de esta técnica en casos de:

- Factor masculino grave.
- Muestras de semen que han sido obtenidas por procedimientos invasivos complejos (Biopsias testicular, aspirado de epidídimo).
- Alteraciones en la eyaculación (eyaculación retrograda).
- Semen valioso (pacientes con cáncer).
- Falla de fecundación por FIV.
- Menos de 6 óvulos por aspiración.
- Diagnostico pre-implantación.
- Utilización de óvulos después de desvitrificación.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 22 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		


Esta técnica supone una variación, en cuanto a la manera de inseminar los ovocitos, respecto a la FIV convencional y para la que se necesita disponer de un equipo de micromanipulación con microscopio invertido y personal cualificado.

6.3.3.1 PROCEDIMIENTO

- Confirmar e identificar los medios a utilizar en los tubos y placas pertinentes.
- Confirmar la identidad de los pacientes en el formato SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI con la información de las placas de mantenimiento de óvulos y FIV.
- Los procedimientos solo se realizan después de que los pacientes han leído, aceptado y firmado el consentimiento (Consentimiento FIV – ICSI ovulo donado semen donado) (Consentimiento FIV/ ICSI ovulo donado semen propio) (Consentimiento FIV/ ICSI ovulo propio semen donado) o (Consentimiento FIV/ ICSI ovulo y semen propio) según cual será el origen de los gametos utilizados
- Siempre que se realice manipulación de óvulos debe ser en superficies con temperaturas controladas (37°C).
- Se prepara el material necesario el cual se resume en la siguiente tabla.

Tabla. 4 material necesario para ICSI

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos	Elementos de protección personal
<ul style="list-style-type: none"> • Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl • Puntas de Stripper 155 y 175 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de Flujo Laminar • Incubadora 37°C, 5% O₂ y 7.5% CO₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Global for Fertilization • Lite Oil 	<ul style="list-style-type: none"> • Tapabocas
<ul style="list-style-type: none"> • Placas de Petri 60mm • Placa para ICSI 50 x 9 mm • Pipeta Holding 30° 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubadora 37°C y 7.5% CO₂ • Micropipeta 0,2-20 µl • Stripper metálica 	<ul style="list-style-type: none"> • Nid Oil • Hyase -10X • ICSI™ 	<ul style="list-style-type: none"> • Gorro desechable

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 23 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		

<ul style="list-style-type: none"> Pipeta ICSI 30° 	<ul style="list-style-type: none"> Microscopio Óptico Invertido 	<ul style="list-style-type: none"> Pentoxifilina 	<ul style="list-style-type: none"> Guantes de nitrilo estériles
<ul style="list-style-type: none"> Timer 	<ul style="list-style-type: none"> Sistema de Micromanipulación 	<ul style="list-style-type: none"> Global total con hepes 	
	<ul style="list-style-type: none"> Estereomicroscopio 		
	<ul style="list-style-type: none"> Lápiz de Punta de Diamante 	<ul style="list-style-type: none"> Global Total 	

Día previo al ICSI

- El día previo a la punción folicular para la obtención de los óvulos que serán microinyectados, se deben preparar todas las cajas y medios que se utilizarán para el procedimiento, se deben hacer cajas de 35mm con Global for Fertilization en donde irán los óvulos de día 0 a día 1, el número de cajas a realizar será proporcional al número de óvulos maduros que se espera obtener por la punción, o en caso de usar óvulos vitrificados será proporcional al número de óvulos que serán desvitrificados, las cajas se hacen como se muestra en la **figura 6**. Estas cajas deben mantenerse en la incubadora a 37°C en atmósfera de CO₂ a 7.2% y O₂ a 5.0%.

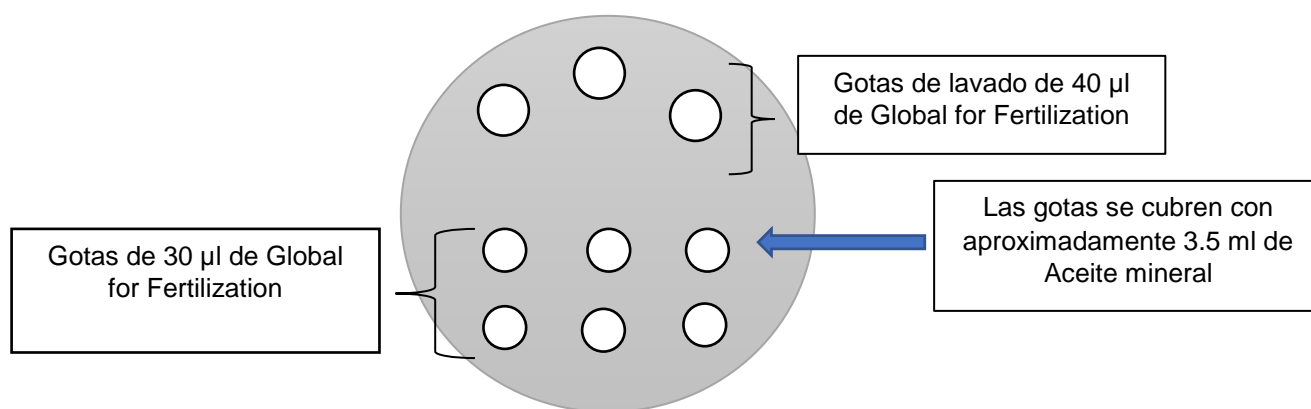



Figura 6. Caja de crecimiento embrionario de Día 0 (D0) a Día 1 (D1)

- Se debe dejar atemperando aproximadamente 12 ml de aceite mineral que es el aceite mineral que se usará en para cubrir las gotas de las cajas que se manejan fuera de la incubadora (caja de denudación y caja de ICSI).

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente 25/05/2022	Versión 1	Página 24 de 12

- Todo el material plástico que será usado el día del procedimiento se debe dejar desde el día anterior dentro de la cabina de bioseguridad, en la zona no calefactada, para ir eliminando cualquier olor fuerte que estos puedan poseer y que puedan afectar a los gametos y embriones.

Día del procedimiento

- Al final de la punción folicular se debe confirmar la hora a la que se va a iniciar la denudación de los óvulos de la paciente (2 horas después de la punción).
- Transcurridos 1 hora y 30 minutos de la obtención de los óvulos, se debe preparar la placa de decumulación (Caja de Hyaluro de 60mm) de la siguiente forma: la caja se divide con un marcador en la parte de atrás de tal forma que se delimiten 2 zonas la parte superior será para las gotas de Hyase - 10X (6 a 8 gotas de 40 µl) cuya preparación se explicó en el numeral **6.2.3** de este manual y en la zona inferior se harán gotas de 30 µl de Global Total con Hepes (aproximadamente 30 gotas) y luego estas gotas se cubrirán con aproximadamente 6 ml de aceite mineral previamente atemperado a 37°C.

.Figura 7.

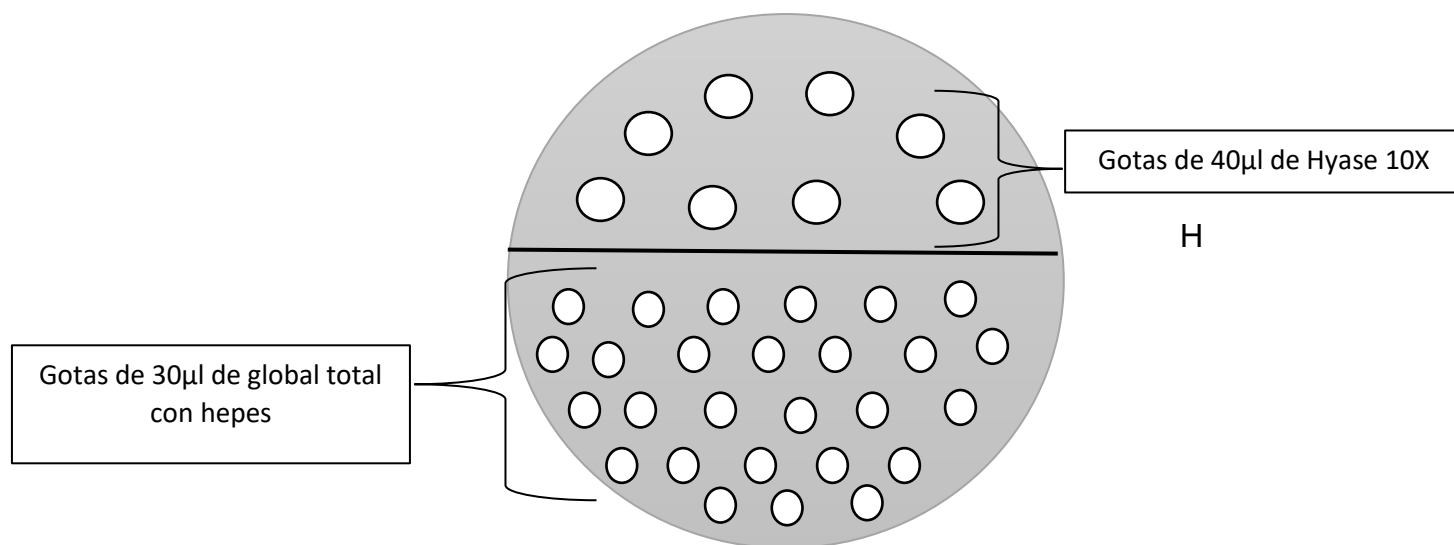



Figura 7. Caja de denudación

Decumulación de los Óvulos

- Preparar la pipeta Stripper de 155 µm.
- Cuando se encuentre preparada la placa de decumulación y se estabilicen los medios dentro de la cabina durante 15 minutos, procedemos a sacar de

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 25 de 12

la incubadora la placa de equilibrio de óvulos y seleccionar aquellos que se van a denudar.


- Con el sistema de aspiración con chupa aspirar los CCO de la placa y colocarlos uno por uno en cada gota de Hyase y a través de la repetida aspiración y liberación en cada gota, estos eliminarían mecánicamente la mayoría de las células de la granulosa (no deben estar en contacto con la enzima más de 1 minuto).

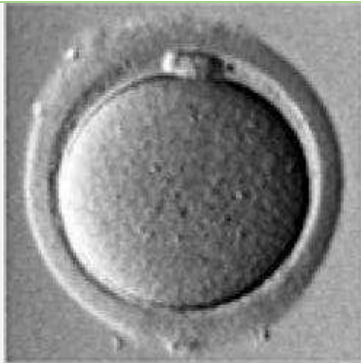
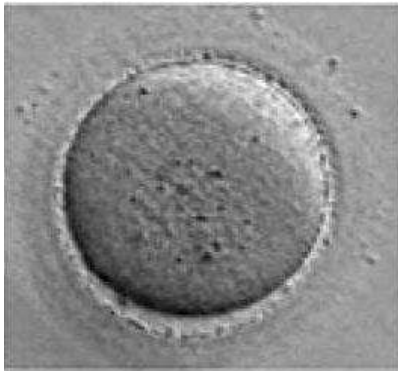
Dependiendo de la experticia del Embriólogo se pueden tomar 6 Cúmulos al tiempo para denudar, si el embriólogo no tiene mucha experiencia se recomienda hacerlo de 3 en 3.


- A continuación, culminado el tiempo, aspirar y pasar los óvulos a las gotas de Global Total con Hepes con Stripper con punta de 155 μ m, posteriormente ir pasando los óvulos a las gotas restantes de la placa, aspirando y liberando repetidamente en cada uno, hasta quedarse sin la mayoría de las células de la corona.
- Luego de deanudados los óvulos de evalúa el estado de maduración nuclear (**Tabla 5**) con la ayuda del estereomicroscopio y se pasan los óvulos en metafase II, con la pipeta Stripper de 155 μ m, a una caja de Global for Fertilización (**figura 6**) y luego se llevan a la incubadora nuevamente donde quedan en recuperación por 2 horas más hasta la realización de la ICSI.
- Si se encuentran óvulos inmaduros (MI) o en estado de Vesícula Germinal (VG) estos deben colocarse en gotas separados de los óvulos maduros MII.

Tabla 5. Evaluación de la maduración nuclear de los óvulos

GRADO DE MADURACIÓN	ASPECTO MORFOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
		Ovocito maduro o preovulatorio. Haploide. Presenta corpúsculo polar, lo que indica la reanudación de la meiosis. El corpúsculo polar permanece conectado con el huso meiótico mediante un puente citoplasmático un tiempo después de su

 Fertility Care <small>CLÍNICA DE FERTILIDAD</small>	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 26 de 12

Metafase II - MII		extrusión. Tiene aspecto redondeado, ooplasma claro y granulación homogénea. Las células del cúmulo están expandidas y filantes y la corona es radial.
Metafase I - MI		Ovocito inmaduro, haploide, No tiene corpúsculo polar, el huso y los cromosomas están alineados en los polos. Su aspecto es redondeado, con citoplasma claro y granulación homogénea. La metafase I tempranos pueden presentar granulación central. Las células del cúmulo y la corona están menos expandidas y no son filantes. La metafase I tardíos pueden presentar células del cúmulo luteinizadas.
		Es un ovocito inmaduro, diploide. No tiene corpúsculo polar. Presenta vesícula germinal con nucleolos refráctiles. Tiene aspecto irregular oscuro en su zona central y ooplasma

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 27 de 12

Profase I - Vesícula
Germinal (VG)



granular. Las células del
cúmulo y corona están
compactadas.

Microinyección

- Teniendo los óvulos denudados y el semen previamente capacitado como se explica en el BR-M-002 - MANUAL DE ANDROLOGÍA preparar una placa de ICSI, sin olvidar escribir el nombre de la paciente en la cubierta de la placa, esta placa se prepara así: En una placa de 60mm, colocar 2 gotas de 30 μ l de PVP en la parte superior y en el centro de la placa, 6 gotas de 30 μ l de global total con hepes equilibrado a 37°C alrededor del PVP para mantener los óvulos en medio del procedimiento y 1 gota de 30 μ l de global total con hepes equilibrada a 37°C en la parte inferior de la placa; cubrir con 7 ml de aceite mineral equilibrado a 37°C. **figura 8**

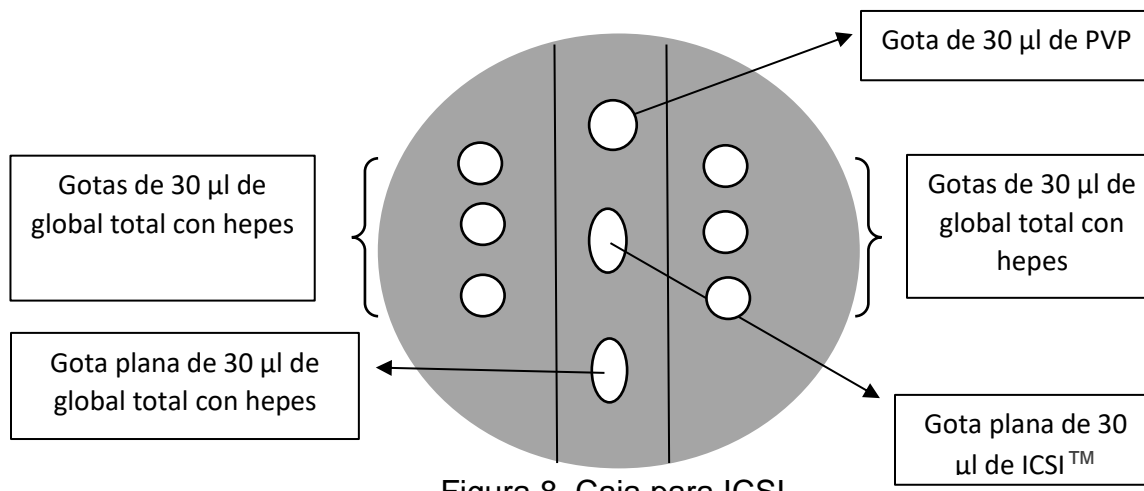





Figura 8. Caja para ICSI

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 28 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		

- Dejar la placa ICSI en la platina caliente de la cabina de flujo laminar durante 15 minutos.
- Tomar la muestra de espermatozoides capacitados con que se hará la ICSI y comprobar que todos los datos están correctos y esa la muestra corresponde con el nombre de la paciente y procedimiento.
- Colocar aproximadamente 3 µm (dependiendo de la concentración) de la muestra de semen capacitada
- Preparar el sistema de Micromanipulación de la siguiente manera:
 - Compruebe que la placa térmica, los oculares y los objetivos del microscopio invertido están limpios y que el sistema de microinyección no tiene nudos o suciedad interna en las mangueras (lo que provoca retraso y descontrol en la transmisión de la presión).
 - Ajustar los joysticks manuales a la posición central que se tenga marcada.
 - Antes de colocar las pipetas de ICSI y Holding en el lápiz correspondiente, verificar que no tenga restos de pipetas anteriores en su interior y luego si, introducir las cuidadosamente hasta la mitad de estas.
 - Enroscar la cabeza del lápiz y liberar presión pinchando el botón central de joysticks.
 - Colocar el Microinyector con la pipeta Holding en el sistema de Micromanipulación situado a la izquierda del microscopio invertido.
 - Colocar el Microinyector que soporta la pipeta de Microinyección a la derecha; Colocar ambas pipetas frente una de la otra, de forma que queden perfectamente horizontales y en el centro del campo visual del microscopio.
 - Con el objetivo de menor amplitud, las puntas de las pipetas se deben ir bajando progresivamente, de modo que queden alineadas en el mismo plano, y luego, se debe ir cambiando progresivamente a los demás objetivos hasta llegar al de 40X. (Verificar que con este objetivo tenemos la máxima libertad de movimientos en las cuatro direcciones de espacio).
 - Transferir los óvulos a la placa de ICSI, distribuyéndolos por las 6 gotas de global total con hepes.
 - Ya en el microscopio invertido, enfocar el borde de la gota de lavado con medio PVP sin espermatozoides. Descender y enfocar la pipeta de inyección permitiendo que, por capilaridad, entre medio en el interior de la pipeta y así se cree un soporte, aspirar medio y sacarlos en repetidas ocasiones.
 - Después de purgar y estabilizar las pipetas, ir a la gota de medio PVP con los espermatozoides y enfocar el borde superior de la gota, elegir, siempre que sea posible, un espermatozoide con buena morfología y movilidad.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 29 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		

- Localizado el espermatozoide, colocar la punta de la pipeta sobre el tercio proximal del flagelo del espermatozoide y, con un movimiento perpendicular al espermatozoide, alcanzar el flagelo hasta que este quede angulado e inmóvil.
- Aspirar el espermatozoide por la cola y elevar con el joystick manual la micropipeta de inyectar e ir hasta la primera gota que contiene el óvulo.
- Después de enfocar el óvulo, descender la pipeta holding y la de inyección hasta que se encuentren en el mismo plano.
- Con la ayuda de la pipeta de inyección, girar el óvulo hasta que el cuerpo polar (CP) se torne visible.
- Aspirar con la pipeta holding de forma que el óvulo esté inmovilizado con el CP en las posiciones de las 12 o 6 horas. Este paso es importante pues la posición del CP indica la posible posición de la placa meiótica.
- Llevar el espermatozoide hasta la punta de la pipeta.
- Con la pipeta de inyección presione suavemente y gradualmente sobre la zona pelúcida, manteniendo siempre en la punta el espermatozoide.
- Una vez traspasada la zona pelúcida, continuar presionando la membrana del óvulo procurando que se forme un cono alrededor de la pipeta, moviendo ligeramente hacia arriba y hacia abajo.
- Introduzca la pipeta de inyección muy lentamente dentro del óvulo, intentando que se rompa sin aspirar. Si esto no ocurre, proceder a la ruptura del óvulo a través de la aspiración
- Después de romper la membrana del citoplasma, aspirar un poco de ooplasma para certificarse que la membrana se rompió y está en contacto con el espermatozoide.
- Introduzca suavemente el espermatozoide, evitando introducir medio PVP en el interior del óvulo
- Guardar los óvulos en placas de cultivo Global for Fertilization, previamente marcada con el nombre de la paciente en la parte debajo de la misma con el lápiz de punta de diamante y equilibrado por lo menos 4 horas antes en la incubadora 37°C y 7.2% CO₂.
- Numerar los óvulos recién procesados, conforme está en el formulario y colocar la placa en la incubadora designada para la paciente a 37°C, 5,0% O₂ y 7.2% CO₂.
- Todos los datos de la hora de inyección, medios de cultivo usados con lote y fecha de vencimiento son registrados FERT-BR-F-052 SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI que está previamente diligenciado con los datos de la paciente y su pareja.

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 30 de 12

Casos de Semen Difícil


- En los casos de muestras de semen con elevada concentración de espermatozoides inmóvil, no depositar el esperma en la gota de PVP, sino en una o varias gotas de medio Global total con Hepes con pentoxifilina este medio reactivará los canales de calcio en la pieza media del espermatozoide y estimulará su movilidad.
- Capturar los espermatozoides que respondan a la pentoxifilina y colocarlos en una gota limpia de PVP en posiciones donde sea fácil encontrarlos, alcanzándoles el flagelo para inmovilizar. Cuando se tenga el número suficiente de espermatozoides para que los óvulos a inseminar, retirar los óvulos de la incubadora, para proceder a su microinyección.

Clasificación morfológica de los óvulos

Un óvulo normal es aquel con estructura esférica, ooplasma translúcido libre de cuerpos extraños (vacuolas, REL, otros), y un cuerpo polar de tamaño apropiado. Los parámetros para tener en cuenta en la evaluación del óvulo son:

Tabla 7. Parámetros de referencia para descripción morfológica de óvulos

Estructura del Óvulo	Observaciones
Cuerpo Polar - CP	Intacto (OK)
	Fragmentado (Frag)
	Irregular (Irreg)
Citoplasma	Granuloso (Gran)
	Vacuolas (Vac)
	Retículo Endoplasmático Liso (REL)
Espacio Perivitelino - EPV	Aumentado (EPV↑)
	Con material o Debris (Debris)
	Tabicado
Zona Pelúcida - ZP	Gruesa
	Fina
	Oscura

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 31 de 12

6.4 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO ENBRIONARIO

Posterior a los procedimientos de fertilización In vitro, ya sea por el método convencional (FIV) o por microinyección de espermatozoides (ICSI), se debe hacer la evaluación del desarrollo embrionario que va desde el día 1 al día 5 o 6.


Para aumentar las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción, es necesario aislar y mantener los embriones en las mejores condiciones de cultivo; esto incluye todo el control de calidad en los medios, concentración de los gases y temperatura e ir evaluando poco a poco el potencial de estos, para que más tarde puedan ser transferidos o vitrificados uno o dos embriones considerados óptimos. La evaluación es realizada con base a la morfología que presenten.

Los embriones son muy sensibles a variaciones de temperatura y pH, es muy necesario que todas las actividades que se desarrollen fuera de la incubadora sean realizadas con máximo cuidado y rapidez, se debe trabajar siempre en superficies térmicas y todos los procedimientos en que se tenga que llevarse a cabo cambios de medios o placas, deben ser realizados con máxima atención, teniendo muy en cuenta la numeración de los embriones y la identificación de la paciente. Antes de iniciar las observaciones, se debe tener listo el formulario de FIV/ICSI de la paciente en la zona de trabajo; escribir la fecha, hora y nombre de la persona que está evaluando el caso esto se registra en el **SEGUIIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI**

6.4.1 DÍA 1 DE DESARROLLO (FECUNDACIÓN)

Esta observación se realiza de 15 a 20 horas posteriores a la inseminación o 16 a 18 posterior a la microinyección de los óvulos.

Una vez cumplido ese tiempo los óvulos a los cuales se les evaluará la fecundación se deben cambiar de placa de cultivo, se pasan a cajas con microgotas del medio Global Total previamente incubadas desde el día anterior a 37°C a 7.2% de CO₂ **(Figura 9)** en donde se dejarán hasta día 5 o 6 de desarrollo, los óvulos se deben ir pasando 1 a 1 e ir respetando el orden y la numeración que se les dio el día anterior, primero se lavan en las gotas superiores y luego se coloca cada embrión en las gotas inferiores, los embriones se pasan con el stripper con punta de 175mm.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 32 de 12

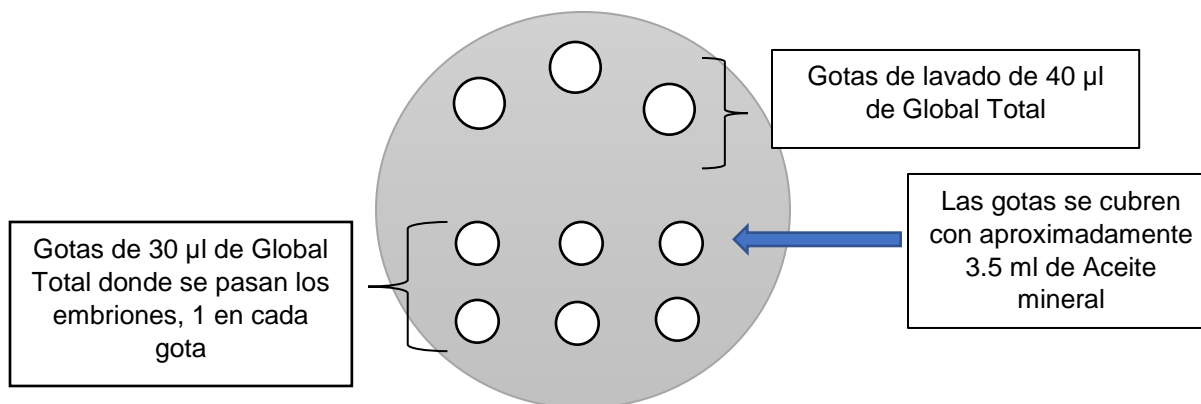


Figura 9 caja de crecimiento de día 1 a día 6

Una vez estén en la nueva caja se procede a observarlos en el microscopio invertido, y determinar si hubo o no fecundación. Habitualmente se ha considerado la visualización del estadio de cigoto (Día 1) como una herramienta útil sólo para discernir fallos o alteraciones de la fecundación.

6.4.1.1 Parámetros evaluados en el Día 1

- **Corpúsculos polares (CP) (número y apariencia)**

Numero Normal de CP




Imagen 1. Variaciones en el número de CP en el cigoto (Día 1)

Número: su valoración es esencial a la hora de evaluar la ploidía en conjunto con el número de pronúcleos en una fecundación Normal se observan 2 Corpúsculos polares. La apariencia de los corpúsculos polares suele hacer referencia a las alteraciones en el tamaño o en la fragmentación de los mismos.

- **Número pronuclear**

El número normal de pronúcleos (PN) de un cigoto es de 2 (**Imagen 2**), La valoración conjunta del número de pronúcleos, el número de corpúsculos polares y la técnica de inseminación utilizada (convencional o microinyección

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 33 de 12

espermática) nos ayudará a decidir qué hacer cuando en D+1 tenemos zigotos que presenten alteraciones de estas características. **(Imagen 3)**




Imagen 2. Fecundación Normal (Día 1)



Imagen 3. Alteraciones en el número de CP y PN (Día 1)

- **Apariencia de los pronúcleos**

La apariencia de los pronúcleos y de los precursores nucleolares, se evalúan utilizando el Score Z propuesto por Tesarik and Greco, 1999. **(Figura 10)**

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 34 de 12

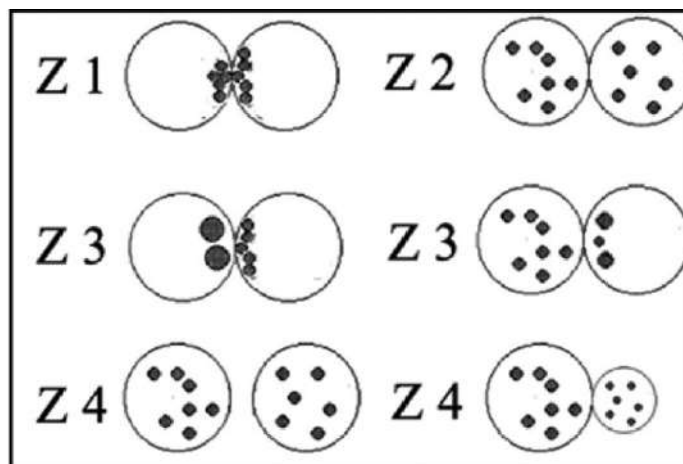


Figura 10. Esquema de gradación pronuclear propuesto por Tesarik and Greco (1999).

- **Halo citoplasmático**

Es la presencia de un área cortical más clara en parte o todo el citoplasma. es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva. Los cigotos con halo evolucionan hacia embriones de mejor calidad (60,9%) que los cigotos sin halo (52,2%). (Balaban and Urman, 2006; Payne et al., 1997; Salumets et al., 2001; Zollner et al., 2002). **(Imagen 4)**

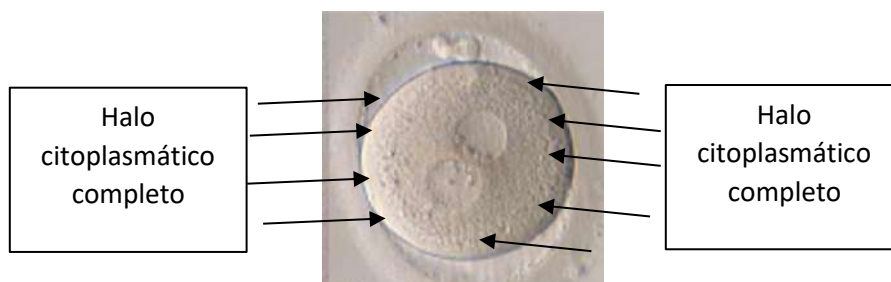



Imagen 4. Halo citoplasmático (Día 1)

- **División temprana**

La división temprana es la que se observa entre las 25 y las 27 horas post inseminación. Se evidencia la presencia de blastómeras **(Imagen 5)** y lo recomendable es compararlo con la morfología del cigoto, la mononucleación en Día 2 o la morfología en Día 3 y el desarrollo hasta blastocisto. Las conclusiones obtenidas resultan contradictorias como para establecer la utilidad de su observación se aconseja utilizar la división temprana como “parámetro secundario”, para decidir entre embriones de calidad similar.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 35 de 12

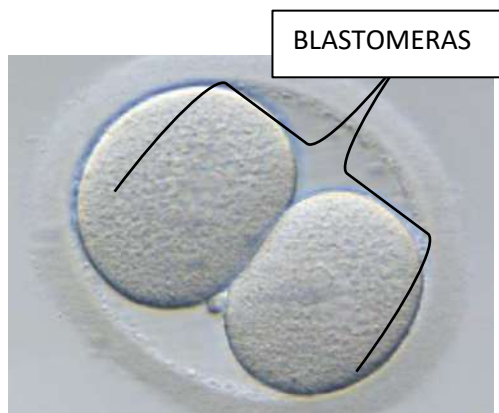


Imagen 5. Preembrión con división temprana 26 horas post-inseminación

- **Recomendaciones generales**


Se recomienda seguir las indicaciones plasmadas en la tabla 9 relacionadas con el cultivo y el número de Corpúsculos Polares (CP) y Pronúcleos (PN).

Tabla 9 Recomendaciones de cultivo en función del número de corpúsculos y pronúcleos

Relación N° PN - CP	FIV	ICSI
2 PN+1 CP	Descartar*	
1 PN + 2CP**	Si evoluciona 80% diploidía	Si evoluciona 20% diploidía
1 PN + 1 CP	Descartar	
>2 PN	Descartar	
2 PN + 2 CP	Continuar	
2CP Sin PN	Dejar en observación hasta Día 2	

*En caso de encontrar 2 PN + 1 CP es preciso descartar el cigoto dado que si no es partenogénesis existe riesgo de diginia con las implicaciones de riesgo fetal existente (Carceller et al., 2004)

** Continuar a decisión del laboratorio.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 36 de 12

6.4.2 DÍA 2 DE DESARROLLO (CLIVAJE)


El intervalo de observación recomendado de embriones en clivaje (Día 2) es de 44-47 horas post inseminación para observarlos de debe:

- Comprobar cuál es la incubadora y compartimiento de la paciente y retirar las placas a evaluar.
- Retirar la primera placa de embriones de la paciente y colocarla en el microscopio invertido (Objetivo 40X) para proceder a la evaluación de los parámetros listados en la Tabla 10 y clasificar los embriones de acuerdo con la Tabla 11. Importante toda esta información colectada registrarla en el SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI
- En cada observación es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso; al finalizar volver a colocar en la incubadora designada las cajas de cultivo.
- En caso que se vaya a transferir en Día 3, se debe dejar todo el material y medios necesarios para el procedimiento. ver numeral **6.4** del presente manual).
- Teniendo en cuenta que los cambios bruscos en las condiciones de incubación de los embriones, afectan directamente su desarrollo, actualmente se recomienda no observarlos en Día 2, sin embargo, la observación en día 2 queda sujeta al criterio del embriólogo; se recomienda evaluar fecundación en Día 1 y no volverlos a sacar de la incubadora hasta día 3 para verificar clivaje y día 5 para observar blastulación.

6.4.3 DÍA 3 DE DESARROLLO (CLIVAJE)

El intervalo de observación recomendado de embriones en clivaje (Día 3) es de 67-71 horas post inseminación para observarlos de debe:

- Comprobar cuál es la incubadora y compartimiento de la paciente y retirar las placas a evaluar.
- Evaluar los embriones en el microscopio invertido (Objetivo 40X) y decidir cuáles serán transferidos, realizar la evaluación de los parámetros listados en la Tabla 10 y clasificar los embriones de acuerdo con la Tabla 11.
- Los embriones que no se transfieren, y que tengan buena calidad, se procederá a dejarlos a cultivo prolongado o vitrificar (ver MANUAL DE CRIOPRESERVACIÓN) no se hacen cambio de placas ya que los medios que se utilizan son de cultivo único.
- Es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
			Versión 1	Página 37 de 12
	Fecha Vigente	25/05/2022		


- Se le debe informar al médico tratante y a la paciente como ha sido el progreso de sus embriones, para ello se hace uso del registro de video el cual se envía por correo electrónico.
- Según el destino que tendrán los embriones, se pueden organizar dentro de las mismas gotas del medio de cultivo y se vuelven a colocar las placas en la misma incubadora hasta el momento que se utilizarán de nuevo.

Tabla 10 Parámetros para observar clasificación de los embriones en D2 y D3 de desarrollo. (Istanbul consensus 2011).

Parámetros	Descripción
Número de Células	D2: 2 – 4. D3: 7 – 8.
Fragmentación	Leve: $\leq 10\%$ Moderada: 10 – 25% Severa: $\geq 25\%$ (Equivale, en un embrión de 4 células a un blastómero)
Multinucleación	Visualización de núcleos y grado de Multinucleación, más en D2.
Tamaño Celular	Tamaño de los blastómeros estadio-específico; deben ser preferiblemente simétricas.
Otros	Anillo citoplasmático. Presencia de vacuolas. Pitting o moteado. Zona pelúcida. Grado de compactación/adhesión temprana.

Tabla 11 Sistema de categorización y clasificación de los embriones de día 2-3 (en clivaje). Estos parámetros son para ser observados en conjunto con el número de células. (Istanbul consensus 2011).

Categoría	Calidad	Descripción
1	Excelente	<ul style="list-style-type: none"> • 0% fragmentación • Simetría Regular • Mononucleares • D3 (4 – 8 células) • Ausencia de inclusiones en el citoplasma

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 38 de 12

2	Bueno	<ul style="list-style-type: none"> • > 10% de fragmentación • Simetría mayor 50% • Sin Multinucleación aparente • D3 (3 – 6 células)
3	Regular	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 10- 20% de fragmentación • simetría entre 20 y 50% • Multinucleación • D3 (3 células o más de 9 células)
4	Mala	<ul style="list-style-type: none"> • > 30% fragmentación • Asimétrico • Multinucleación • Presencia inclusiones citoplasmáticas • D3 (menos de 3 células – Compactación temprana)

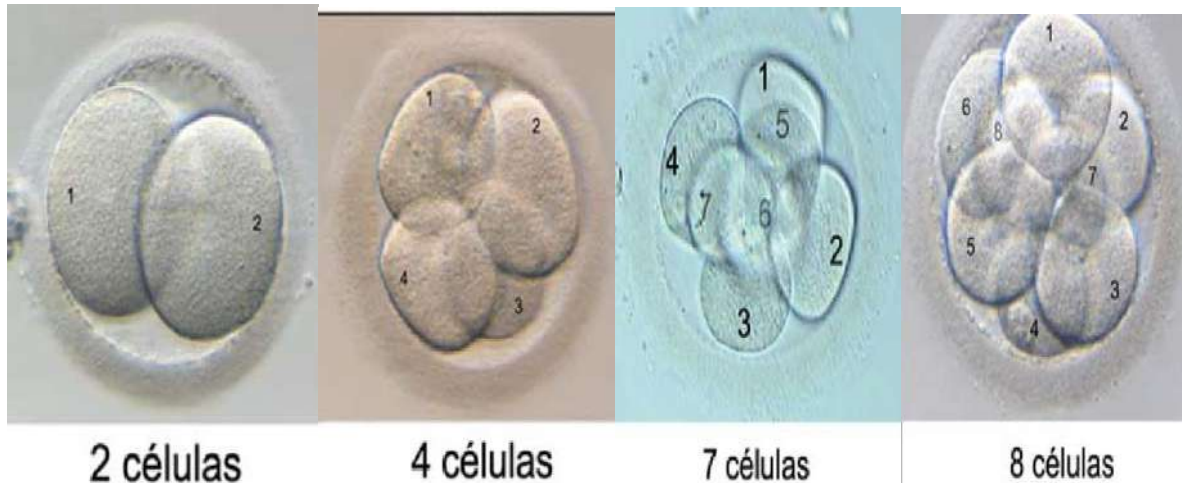


Imagen 6 división celular en Día 2 de 2 a 4 células y Día 3 de 7 a 8 células


	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 39 de 12



Imagen 7. Grados de fragmentación A. Leve: $\leq 10\%$ B. Moderada: 10 – 25%
C. Severa: $\geq 25\%$



Imagen 8. A. micro nucleación; B. binucleación. Las flechas indican la posición de los núcleos.


 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 40 de 12



Imagen 9. Tamaño de las blastómeras

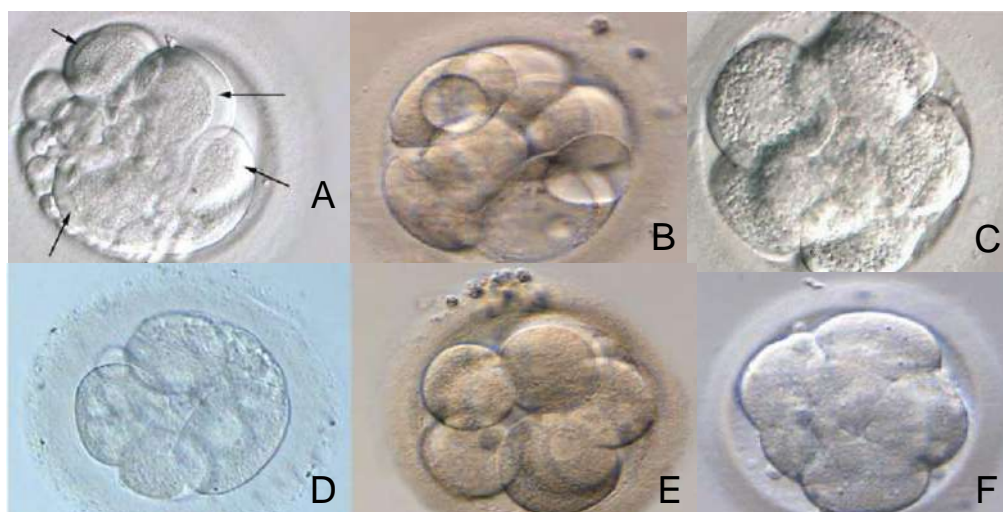


Imagen 10. A. Anillo citoplasmático. B. Presencia de vacuolas. C. Pitting o moteado. D. Zona pelúcida gruesa E. Zona pelúcida oscura F. Compactación

6.4.4 DÍA 4 DE DESARROLLO (MÓRULA)

Teniendo en cuenta que los cambios bruscos en las condiciones de incubación de los embriones, afectan directamente su desarrollo, No se observan en Día 4. El estadio de Mórula (Día 4) se presenta 94-98 horas post-inseminación.


	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 41 de 12



Imagen 11. Mórula - Día 4


6.4.5 DÍA 5 - DÍA 6 DE DESARROLLO (BLASTOCISTO)

El intervalo de observación recomendado para Día 5: 112-120 horas post-inseminación y Día 6: 136-140 horas post-inseminación.

Se considera que un preembrión cultivado in vitro adquiere el estadio de blastocisto en D+5 o D+6. Este rango varía dependiendo del sistema de cultivo utilizado. Los embriones con un ritmo de desarrollo más lento pueden llegar a este estadio en D+7 o incluso D+8, situación que conlleva a un peor pronóstico.

En el blastocisto es preciso diferenciar (Imagen 12):

- Blastocelo.
- Zona pelúcida.
- Masa celular interna (MCI).
- Trofoectodermo polar y mural.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente 25/05/2022	Versión 1	Página 42 de 12

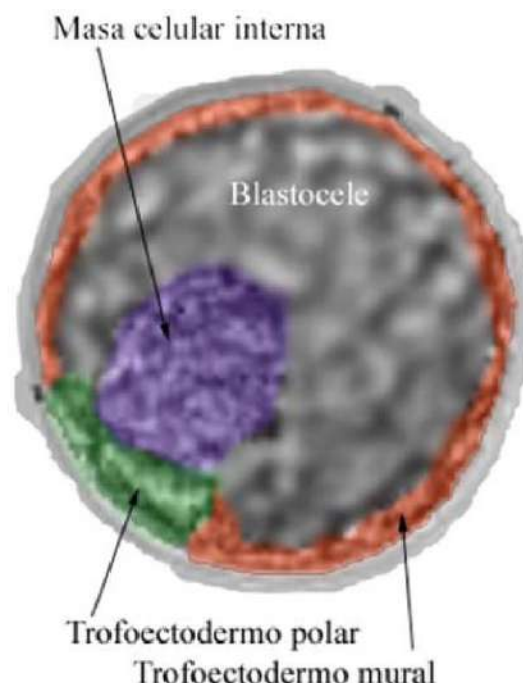


Imagen 12 . Estructura del blastocisto

- Comprobar cuál es la incubadora y compartimiento de la paciente y retirar las placas a evaluar.
- Evaluar los embriones en el microscopio invertido (Objetivo 40X) y decidir cuáles serán transferidos, realizar la evaluación de los parámetros listados en la Tabla 12
- Los embriones que no se transfieren, y que tengan buena calidad, se procederá a vitrificarlos (ver MANUAL DE CRIOPRESERVACIÓN).
- Es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso.
- Se le debe informar al médico tratante y a la paciente como ha sido el progreso de sus embriones, para ello se hace uso del registro de video el cual se envía por correo electrónico.
- Según el destino que tendrán los embriones, se pueden organizar dentro de las mismas gotas del medio de cultivo y se vuelven a colocar las placas en la misma incubadora hasta el momento que se utilizarán de nuevo.






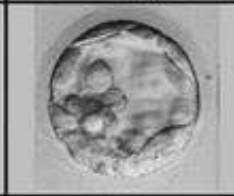






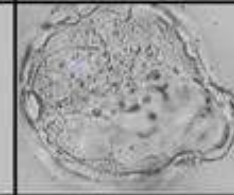
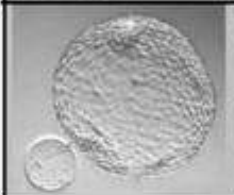
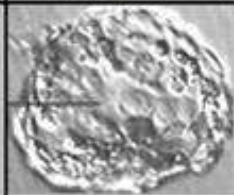
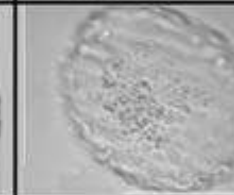

 Fertility Care <small>CLÍNICA DE FERTILIDAD</small>	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 43 de 12

Tabla 12 clasificación del Blastocisto

Calidad MCI	A	B	C
Calidad TE	A	B	C
Grado de expansión 1: blastocisto temprano			
Grado de expansión 2: blastocisto			
Grado de expansión 3 y 4: blastocisto completo/expandido			
Grado de expansión 5: b. iniciando eclosión			
Grado de expansión 6: b. eclosionado			

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 44 de 12

CALIDAD	Organización en blastocisto	Zona pelúcida	MCI	Tamaño MCI *	trofoectodermo	Grado de expansión **
Blastocisto A	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 μm^2 - 1900 μm^2	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocito ocupa todo el volumen del preembrión
Blastocisto B	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 μm^2 - 1900 μm^2	Epitelio irregular	
Blastocisto C	En D+6			< 1900 μm^2	Epitelio homogéneo Células elípticas	
Blastocisto D	En D+6			< 1900 μm^2	Epitelio irregular Células escasas	

* 3.800 μm^2 es comparable al tamaño de un blastómero de un preembrión en estadio de 4 células.

** Blastocisto colapsado: es un mecanismo natural que tiene lugar en el estadio de blastocisto y que, si ocurre, habrá que observarlo de nuevo. No hará cambiar la categoría asignada al preembrión.

Tabla VI. Tabla de asignación de la calidad del blastocisto en función de las variables consideradas.

6.5 TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria intrauterina es el proceso mediante el cual, los embriones obtenidos por técnicas de reproducción asistida son depositados en el útero de la paciente a través del canal cervical.

A través de la vagina, se canaliza el cérvix hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial y depositar los embriones de forma no traumática en la cavidad uterina, para evitar el daño endometrial y la inducción de las contracciones uterinas asociadas con la liberación de prostaglandinas y oxitocina.

El éxito en una técnica de reproducción está en los nacimientos de los bebés, para aumentar las tasas de éxito de estos tratamientos, es necesario seleccionar los embriones con mejor morfología y desarrollo para luego ser transferidos.



	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 45 de 12

Tabla 13 Material para transferencia embrionaria

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos	Elementos de protección personal
<ul style="list-style-type: none"> Puntas de Stripper 175 o 270 μm 	<ul style="list-style-type: none"> Cámara de Flujo Laminar con Superficie Térmica 	Global total con Hepes	<ul style="list-style-type: none"> Tapabocas
<ul style="list-style-type: none"> Placas de Transferencia 	<ul style="list-style-type: none"> Incubadora 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂ 		
<ul style="list-style-type: none"> Catéter de Transferencia 	<ul style="list-style-type: none"> Micropipeta Stripper 		
<ul style="list-style-type: none"> Gasas Estériles 	<ul style="list-style-type: none"> Microscopio Óptico Invertido 	<ul style="list-style-type: none"> Global total 	<ul style="list-style-type: none"> Guantes de nitrilo estériles sin talco
<ul style="list-style-type: none"> Jeringas de 1ml 	<ul style="list-style-type: none"> Estereomicroscopio con Superficie Térmica 		<ul style="list-style-type: none"> Gorro desechable
	<ul style="list-style-type: none"> Lápiz de Punta de Diamante 		

6.5.1 Día previo a la transferencia


- El médico tratante debe confirmar al laboratorio la hora de la transferencia y el tipo de catéter que se utilizará
- El día antes de la transferencia se debe dejar todo el material necesario, el material plástico como la caja pozo central, el cateter y la jeringa se dejan dentro de la cabina.
- Se debe dejar incubando 1 ml de Global total con hepes en el bloque calefactado a 37°C
- Se debe dejar incubando 1 ml de medio para la Transferencia (Global total) a 37°C en atmósfera de 7.2% de CO₂.
- Si los embriones a transferir serán desvitrificados, diligenciar el formato de la paciente y preparar la placa de cultivo como se muestra en la **figura 9** (caja de crecimiento de día 1 a día 6)

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 46 de 12

- Si los embriones a transferir serán desvitrificados, se debe dejar el kit de desvitrificación preparado y dispuesto según lo diga el inserto del producto.

6.5.2 Día de la transferencia


- Cuando la paciente llegue a la sala de transferencia embrionaria comprobar la identidad de esta con el personal auxiliar y con la propia paciente; cuando la enfermera o auxiliar reporten que la paciente y el medico están listos para la transferencia, estaremos listos para preparar los embriones.
- Preparar una micropipeta o una punta de stripper de 175 o 270 μm , retirar de la incubadora de temperatura el catéter de transferencia y la jeringa de 1ml y dejarla en la superficie térmica de la cámara de flujo laminar y los guantes estériles sin talco.
- Desembalar el catéter seleccionado y la jeringa de 1ml y hacer prueba si acopla bien al catéter.
- Hacer el lavado del catéter de transferencia con el medio Global total con hepes que se había dejado atemperando la forma recomendable para hacer este lavado es tomar todo el volumen que pueda contener la jeringa de 1ml y luego retirar todas las burbujas de aire que puedan formarse dándole suaves golpes con el dedo y luego acoplar al catéter y dispensar el medio en el anillo exterior de la placa de transferencia.
- Del tubo que contiene Global total incubado a 37° en atmósfera de 7.2% de CO₂, dispensar los 1000 μm en el pozo central de la placa de transferencia donde se recibirán los embriones para transferir. Marcar la tapa de la placa de transferencia con el nombre de la paciente y el número de embriones a transferir.
- Retirar la placa de cultivo de la incubadora y colocarla en la superficie térmica de la cámara de flujo laminar. Colocar los embriones seleccionados en el pozo central de la placa de transferencia, y comprobar en el estereoscopio que allí se encuentran. Los embriones que continúen en cultivo o sean destinados a vitrificación deben volver a la incubadora.
- Sostener el catéter utilizando los guantes estériles durante toda su manipulación.
- Trabajando bajo el estereoscopio y con el catéter lleno de medio, proceder a la carga de embriones de la siguiente forma:
- Después de haber aspirado una pequeña porción de medio del pozo central, aspirar una fase de aire, seguida de una de medio que contiene los embriones.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 47 de 12

- A continuación, aspirar otra fase de aire seguida de una final de medio. Entrar en la sala de transferencia con el catéter en posición horizontal y volver a confirmar el nombre de la paciente.
- Entregar el catéter al médico responsable de la transferencia.
- Tan pronto como el médico termine la transferencia, vuelva al laboratorio con el catéter y, bajo el estereoscopio comprobar que los embriones no se han retenido en su interior, aspirando y expulsando medio a través del catéter.
- Informar al médico en el caso de que no hayan quedado ningún embrión en el catéter de transferencia y dar la misma por finalizada.
- En el caso de que haya quedado embriones en el catéter, informar al médico y volver a cargar los embriones con el medio.
- Descartar todo el material utilizado en la transferencia en las canecas rojas.
- Anotar todas las observaciones relacionadas con la transferencia en el formulario, entre ellas la hora del procedimiento y hacer el informe de transferencia que será entregado a la paciente en el SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI.
- Los embriones de Día 3 que no se transfieran y que se regresaron a la incubadora, se debe tener claro si serán vitrificados o continuarán en cultivo.
- Si son embriones de D3 o D5 restantes, son de buena calidad, serán vitrificados de acuerdo con el ver MANUAL DE CRIOPRESERVACIÓN, si la pareja ha firmado el consentimiento informado de Vitrificación de embriones.
- Dejar el SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI en el laboratorio si quedarán embriones en observación de esta paciente.
- Si el procedimiento ha culminado con la transferencia embrionaria y la vitrificación de embriones toda la información diligenciada en SEGUIMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI se deben registrar en el Software clínico de la Institución ia- Ililtia.

6.6 SCREENING GENETICO PGS NO INVASIVO


El Screening Genético Preimplantacional (PGS) se usa ampliamente para seleccionar embriones fertilizados in vitro en busca de anomalías cromosómicas y mejorar la tasa de embarazo y bebé sano en casa. La principal desventaja del PGS como se hace hoy en día (Biopsias embrionarias), es que requiere una biopsia del embrión humano. El análisis no invasivo mediante el estudio del ADN presente en el medio de cultivo ofrece una opción para la detección de alteraciones cromosómicas, evitando el riesgo de la biopsia.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 48 de 12

Actualmente en nuestra clínica contratamos este servicio con el Centro de diagnóstico en genética humana y reproductiva GENETIX.


6.6.1 PROTOCOLO DE RECOLECCION DE MUESTRAS PARA ESTUDIO DE PGS NO INVASIVO

1. Se debe verificar que los pacientes solicitantes hayan diligenciado el CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TAMIZAJE GENÉTICO EMBRIONARIO NO INVASIVO PARA ANEUPLOIDÍAS que solicita el centro de diagnóstico genético contratado y se encuentra en la página web del Centro de diagnóstico en genética humana y reproductiva GENETIX.
2. La técnica de fertilización ICSI es la utilizada para obtener embriones a los que se les realizara estudios de PGS NO INVASIVO (Figura 11), esto para evitar contaminación con espermatozoides (contaminación paterna con resultados falsos negativos).
3. Se preparan las cajas de crecimiento embrionario con gotas de 30 ul de Medio de cultivo un día antes de la fertilización y se guardan en incubadoras con atmosfera de 7.2% CO₂/5.0 % O₂ /37°C.
4. Se debe realizar denudación completa de los ovocitos, esto para evitar contaminación con las células del cúmulus (contaminación materna con resultados falsos negativos), por lo tanto, hay que darle la insistencia necesaria a esta etapa de la técnica sin dañar el ovocito, para lograr una decumulación lo más cercana al 100%.
5. Evaluar la eliminación completa de las células de la granulosa en el microscopio invertido bajo objetivo 20X (es aceptable hasta máximo 3 células de la granulosa en el ovocito).
6. La recolección de la muestra en embriones frescos: se realiza en día 5 o 6 de cultivo embrionario, se espera hasta expansión grado 4 o superior y la clasificación de MCI o trofoblasto nivel B o superior.
7. Una vez se tiene el número de embriones adecuados para estudio, se le informa al Médico tratante y/o a la dirección administrativa para que se les comuniquen por correo electrónico a la (los) paciente (s) y se decida a que cantidad de embriones se les realizara el PGS no invasivo; esta decisión debe quedar evidenciada por medio de la respuesta de la paciente al correo enviado.
8. La vitrificación de los embriones se realiza individual en cada cryotop para poder identificar el embrión que corresponde al número de vial recolectado;

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 49 de 12

Inmediatamente se transfiere el embrión al primer pozo del medio de vitrificación embrionaria, se procede a tomar la muestra del medio para PGS.

9. Se toman 20 - 25 ul de la gota de medio de cultivo donde se cultivó el embrión y se deposita en un vial de el kit de recolección que provee Genetix, marcando con las iniciales de la paciente y enumerando el vial iniciando con el numero 1 y así secuencialmente hasta tomar todas las muestras a analizar.
10. Una vez recolectadas todas las muestras que van para estudio, se toma un vial y se marca con la letra "C" y se deposita 25 ul de medio de cultivo de la caja del crecimiento embrionario que no haya tenido embrión (este vial será muestra CONTROL), y se marca un segundo vial con la letra "B" en el cual se deposita 25 ul del medio de cultivo madre que esta guardado en la nevera de medios (este vial será la muestra BLANCO).
11. Al terminar de marcar todas las muestras para el envío, se guardan a temperatura de congelación hasta ser recogidas por la empresa que se encargara de transportarlas hasta el centro de diagnóstico que se ubica en Calle 77 No 11 – 19 oficina 605 Bogotá, Colombia. Se diligencia el FORMULARIO DE INGRESO – DIAGNOSTICO GENETICO PREIMPLANTATORIO que solicita el centro de diagnóstico genético contratado y se encuentra en la página web del Centro de diagnóstico en genética humana y reproductiva GENETIX, con todos los datos del paciente, los datos del centro remitente, datos de la muestra enviada y el o los exámenes solicitados.
12. Se avisa a la dirección administrativa para que proceda a ordenar todo el procedimiento para el transporte de las muestras para su envío hasta la empresa tercerizada.
13. En el momento en que pasan a recoger las muestras se prepara el empaquetamiento de estas en una nevera mediana de icopor: se envuelve el kit que contiene los viales con vinipel; de depositan 2 o 3 cubetas de hielo gel congeladas al fondo de la nevera de icopor y se coloca el kit encima de estas y sobre el kit se colocan 2 o 3 cubetas de hielo gel congeladas más; de tapa la nevera y se sella con cinta adhesiva. Se rotula con datos de remitente, destino y la observación de que es material DELICADO.
14. Se envía al correo electrónico del centro de diagnóstico correspondiente el consentimiento informado diligenciado por los pacientes y el formulario de ingreso de muestras diligenciado por el embriólogo encargado del

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 50 de 12

procedimiento; se verifica que esta información haya sido recibida por medio del correo de respuesta de parte del centro de diagnóstico genético.

15. EL área de dirección administrativa y/o enfermería tienen el manejo de usuario y contraseña de acceso entregada por el centro de diagnóstico genético contratado para la descarga de resultados en los días estipulados (Figura 12).
16. Una vez enfermería descargue los resultados, los envían vía correo electrónico al médico tratante para que le informe y explique a la paciente sobre estos; y se los envían al correo electrónica del embriólogo para que sea registrado en el SEGUMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI para su archivo, y posteriormente diligenciado en la historia clínica electrónica de la paciente.

Figura 11. Flujograma de recolección de muestra para PGS

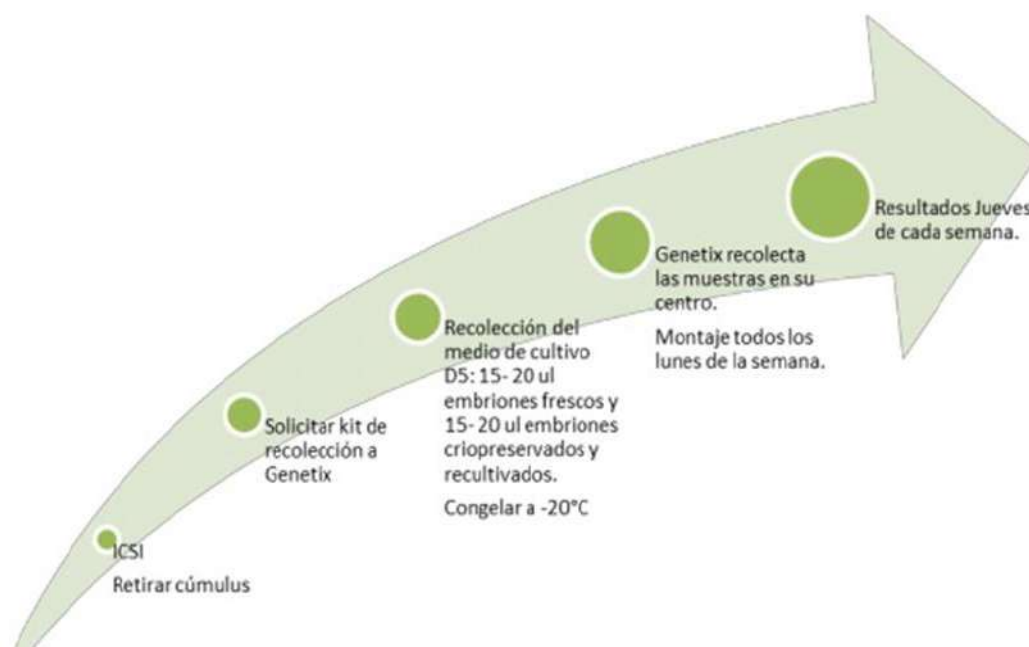

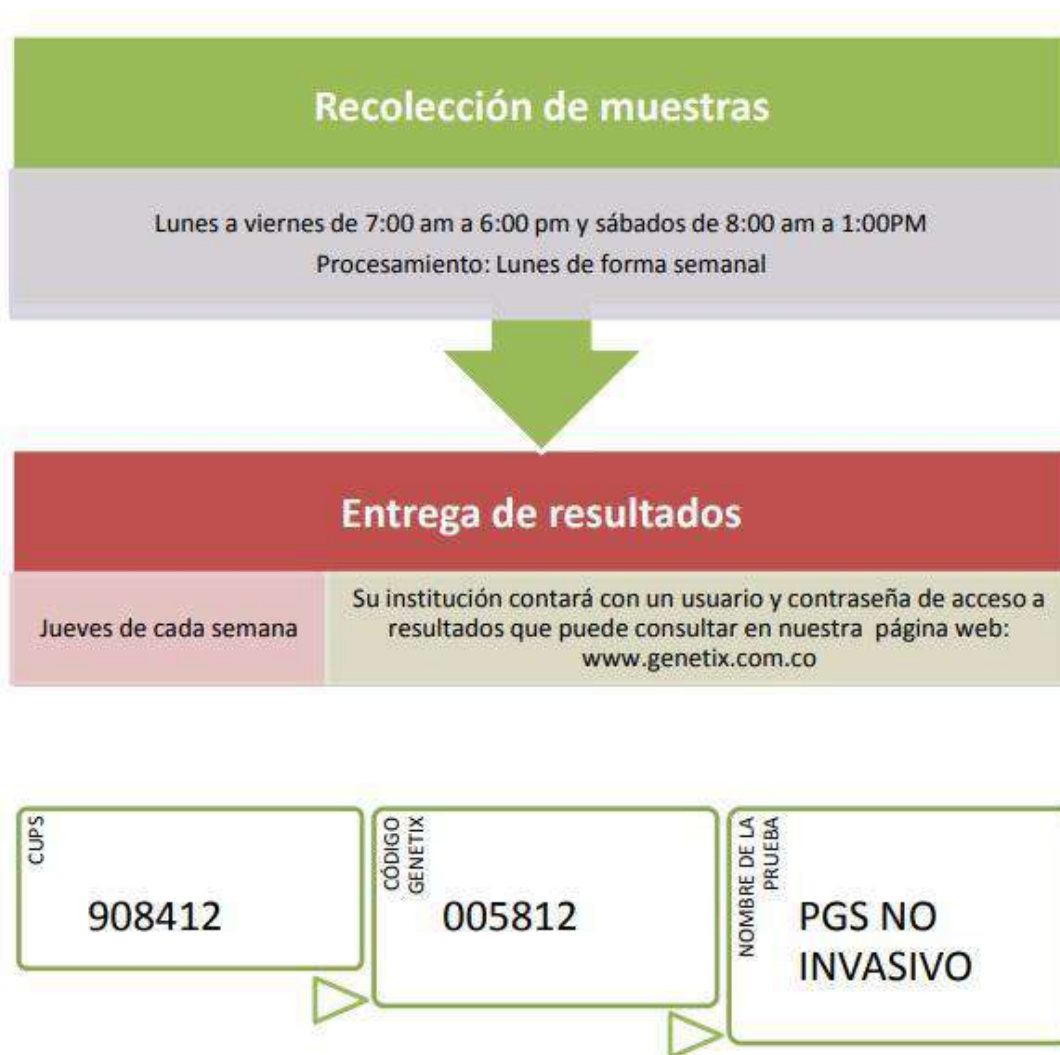


Figura 12. Flujograma para descargue de resultados de PGS


 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 51 de 12



6.7 ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

6.7.1 MEDIOS DE CULTIVO

- Medios de cultivos contaminados o que presenten una posible contaminación en las placas de cultivo, preparar inmediatamente otra con las mismas características con otro medio y si está en el frasco original debe ser descartado.

 CLÍNICA DE FERTILIDAD	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 52 de 12


- En caso de contaminación enviar a analizar los medios de cultivo para identificar el tipo de microorganismo implicado en la contaminación; comunicar el incidente al director del laboratorio.
- Placa que deben ser utilizadas y no sean preparadas, comunicar en la mayor brevedad a los técnicos del laboratorio para que sean preparadas lo más pronto posible.

6.7.1 CAPTACIÓN OVOCITARIA

- Si, después de analizar los primeros tubos de la punción folicular, no se encuentran óvulos:
Avisar inmediatamente al equipo médico.
- Obtención de un alto porcentaje de óvulos con zonas rotas:
Avisar al equipo médico y verificar la presión del aspirador folicular.
- En el caso de verter líquido folicular no evaluado en la superficie de la cámara de flujo laminar, intentar aspirarlo con la pipeta y agregarlo en una placa de Petri limpia y luego buscar los óvulos (sólo en situaciones en las que el número de óvulos que falta recuperar ponga el éxito del ciclo).
- Si se encuentra algún óvulo con características poco normal al finalizar la aspiración, se puede llevar una placa de lavado diferente y luego a un pozo con medio Global for Fertilization limpio. Después colocar en una placa con medio de cultivo aparte, identificada con el número de paciente y un código de posible contaminación.

6.7.2 FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL

- En el caso de que se encuentren gotas de fertilización con concentración menor que la deseada, éstas serán descartadas.
- Si después de la capacitación de semen se presenta un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles, proponer a la pareja y al médico la realización de ICSI en lugar de FIV convencional.
- Si después de la aspiración folicular se presenta una baja recuperación de óvulos, proponer a la pareja y al médico la realización de ICSI en lugar de FIV convencional.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 53 de 12


- Si el nombre de la placa de fertilización no coincide con el de la paciente, nunca inseminar y avisar al director del laboratorio.

6.7.3 INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE ESPERMATOZOIDES


- Si un espermatozoide o un óvulo se pega a la punta de la pipeta, mover la placa de ICSI para que la tensión del medio / aceite ayude a separarlos.
- Si la pipeta de inyección llega a estar muy sucia, descender hasta el fondo de la placa y mover suavemente la platina, hasta que la pipeta salga por la posición de tres en punto. Repetir varias veces.
- Si el óvulo se suelta de la pipeta Holding antes de sacar la pipeta de inyección de su interior, mover suavemente la platina, de modo que la pipeta quede situada en la dirección de las tres en punto, desplazándola hasta el final de la gota. Llegando aquí, el óvulo permanece en la gota (no puede acompañar la pipeta) mientras que la pipeta de inyección sale en su totalidad.
- Al descender las pipetas más de lo normal y desenfocarlas, es posible que los ángulos de estas quedan por debajo de las puntas. Volver a subir las pipetas y ajustar la posición (ángulos por encima de las puntas).

6.7.4 EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

- Fallo de fecundación en FIV convencional: si, después de 17 a 20 horas de la inseminación, no se observan los PN, podremos considerar que el óvulo no ha sido fecundado. Para determinar las posibles causas en casos de ausencia total de fecundación después de FIV convencional:
- Examinar la supervivencia de los espermatozoides en las gotas de inseminación.
- Verificar la existencia de espermatozoides agarrados a ZP, aunque no sea un parámetro altamente correlacionado con fallas de fecundación totales.


 Fertility Care <small>CLÍNICA DE FERTILIDAD</small>	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 54 de 12

- Evaluar la morfología de los óvulos, el estado de maduración de estos (VG, MI y MII), así como las características del CP y la existencia de óvulos atrésicos, degenerados, etc.
- Registrar la posible contaminación en las gotas de inseminación, por levaduras o bacterias que pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides y los óvulos y, por consiguiente, la fecundación.
- Falla de fecundación después de ICSI: aunque los casos de fallos totales de fecundación después de ICSI son menos frecuentes, también pueden ocurrir y son en su mayoría debidos a una falla de la activación del óvulo como consecuencia de una calidad ovocitaria comprometida. Como, por ejemplo, en el caso de los óvulos obtenidos a partir de mujeres con baja respuesta a la estimulación ovárica, lo que puede ocurrir en cerca del 7% de los casos.
- Sin embargo, problemas de naturaleza técnica relacionados con la microinyección o la inyección de espermatozoides de viabilidad dudosa, también pueden dar lugar a fallas de fecundación después de ICSI. Si el índice de fallos de fecundación después de ICSI es superior al 1.5% la eficacia de la técnica debería ser cuestionada.
- Medios de cultivos contaminados o que presenten una posible contaminación en las placas de cultivo, preparar inmediatamente otra con las mismas características con otro medio y si está en el frasco original debe ser descartado.
- En caso de contaminación enviar a analizar los medios de cultivo para identificar el tipo de microorganismo implicado en la contaminación; comunicar el incidente al director del laboratorio.
- Placa que deben ser utilizadas y no sean preparadas, comunicar en la mayor brevedad a los técnicos del laboratorio para que sean preparadas lo más pronto posible. Si no es posible, las placas serán preparadas por el embriólogo y el medio se deberá equilibrar en la incubadora por un periodo mínimo de 1 hora.

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 55 de 12

6.7.5 TRASNFERENCIA EMBRIONARIA

- Evitar hacer burbujas de aire en el catéter durante la aspiración de las distintas fases de aire y medio. En caso de aparecer burbujas de aire dentro de una de las fases de medio, expulsar de nuevo los embriones y reiniciar la aspiración.
- Si algún embrión queda retenido en el catéter, avisar de inmediato al médico y proceder a la repetición de la transferencia. Este procedimiento debe repetirse hasta comprobar que no hay ningún embrión en el catéter.
- Si los embriones están muy dispersos uno de otro en la placa, dificultando la realización del montaje de estos, con la ayuda de una micropipeta o la stripper y colocarlos juntos en la zona central.
- Si al comprobar la transferencia, el catéter y el medio se ha quedado sucio con restos de moco vaginal y/o sangre, al repetir la transferencia es preferible, siempre que sea posible, utilizar una nueva placa con nuevo medio.
- Si la transferencia es difícil, es posible que el médico utilice catéter con una guía para que este sea capaz de atravesar el cérvix, dejando el denominado catéter camisa en el punto del útero deseado. En este caso, cargar normalmente los embriones y, al llegar con ellos donde está el médico, ir sacando la guía despacio hasta que salga totalmente. El médico debe tomar el catéter propiamente con los embriones y introducirla en el "catéter camisa" localizado previamente en el cérvix de la paciente.
- suceder que, aunque la prueba de transferencia haya sido satisfactoria, al introducir el catéter con los embriones, el recorrido hasta la cavidad uterina sea complicado. En este caso, se debe volver al laboratorio, pasar los embriones a la placa de transferencia y dejarla no más de 2 minutos en la superficie térmica de la cabina de flujo laminar; en caso de que se prolongue la localización del catéter en el cérvix, llevar los embriones al medio de cultivo y dejarlos en la incubadora hasta que la prueba de transferencia vuelva a ser satisfactoria.
- Medios de cultivos contaminados o que presenten una posible contaminación en las placas de cultivo, preparar inmediatamente otra con las mismas

	PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO		Código	
			PS-DC-048	
	Fecha Vigente	25/05/2022	Versión 1	Página 56 de 12

características con otro medio y si está en el frasco original debe ser descartado.

- En caso de contaminación enviar a analizar los medios de cultivo para identificar el tipo de microorganismo implicado en la contaminación; comunicar el incidente al director del laboratorio.
- Placa que deben ser utilizadas y no sean preparadas, comunicar en la mayor brevedad a los técnicos del laboratorio para que sean preparadas lo más pronto posible. Si no es posible, las placas serán preparadas por el embriólogo y el medio se deberá equilibrar en la incubadora por un periodo mínimo de 1 hora.