	FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL		Código	
			PS-DC-029	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 1 de 5

1. OBJETIVO

Inseminación de los óvulos obtenidos a través de la punción folicular, con espermatozoides capacitados.

2. ALCANCE

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo está orientado para el personal profesional del laboratorio de Embriología.

4. RESPONSABLE

- Embriólogo

5. REFERENCIAS

- IT Preparación de Medios y Reactivos
- POE Capacitación Seminal
- POE Punción Folicular

6. DEFINICIÓN

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.

7. SIGLAS

FIV - Fertilización In vitro


CCO – Complejo Cumulus Óvulo (Corona)

IA – Inseminación Artificial

8. INDICACIONES CLÍNICAS

La FIV se desarrolla inicialmente para el tratamiento de la esterilidad tubárica grave, pero actualmente se emplea en otras muchas indicaciones y debe aplicarse. En este orden, este tratamiento está indicado para las siguientes condiciones:

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

	FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL		Código PS-DC-029	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 2 de 5

- 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.

9. TIPO DE MUESTRA

- Óvulos obtenidos por punción folicular
- Espermatozoides capacitados, procedentes de semen fresco o congelado.

10. INFORMACIÓN GENERAL

10.1 Manipulación de la Muestra

- Confirmar e identificar los medios a utilizar en los tubos y placas pertinentes.
- Identificar la identidad de los pacientes en el formato "FIV/ICSI" con la información de las placas de mantenimiento de óvulos y FIV.
- Los procedimientos efectuados como los indica este POE solo serán realizados después de ser leídos y firmados por los pacientes los consentimientos informados.
- Siempre que se realice manipulación de óvulos debe ser en superficies con temperaturas controladas (37°C).

11. MATERIAL NECESARIO


Material descartable	Equipos	Medios y reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl • Placas de Petri 35mm • Placas de Petri 60mm • Tubo Falcon 14ml • Microtubo 1.5ml • Jeringa de 1ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de Flujo Laminar • Incubadora 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂ • Incubadora 37°C y 6.5% CO₂ • Micropipeta 0,2-20 µl • Micropipeta 20-200 µl • Microscopio Óptico Invertido • Estereomicroscopio • Lápiz de Punta de Diamante 	<ul style="list-style-type: none"> • Global Total for Fertilization • Lite Oil

Tabla 1. Materiales necesarios para la realización de este procedimiento.

12. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Tapabocas
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo estériles

13. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO


	FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL		Código PS-DC-029	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 3 de 5

13.1. Día anterior

1. Preparación de las placas de FIV y una placa especial para test de dilución del semen, los medios de capacitación seminal y manejo de estructuras durante y después de la aspiración folicular, están descritos en la TI "Preparación de Medios y Reactivos"; todo debe prepararse de acuerdo con la cantidad de óvulos esperados.

13.2. Día de la FIV

1. Preparar el semen de acuerdo con el POP "Capacitación Seminal" realizando sólo el método de gradientes de densidades. Retirar el pellet y colocar en un tubo de 14ml y calcular la concentración de móviles progresivos del semen capacitado.
2. Realizar los cálculos para saber cuál es el volumen de semen que se va a retirar del capacitado, de acuerdo con los cálculos de referencia, en el punto 13 de este procedimiento. Preparar un microtubo con la nueva dilución del capacitado, cuyo volumen final sea de 300 µl; dejar la muestra 30 minutos en incubadoras a 37°C sin entrada de gases, estos 30 minutos deben ser antes de ser inseminados en las gotas.
3. Confirmar en el protocolo de FIV la hora en que van a ser inseminados los óvulos de la paciente (4-6 horas después de la punción).
4. De la dilución anteriormente preparada y separada en el tubo Eppendorf es que vamos a retirar el volumen a colocar en las gotas de prueba de la placa de dilución, previamente incubado 30 minutos y evaluar en el Microscopio Óptico Invertido si se ve de buena calidad la muestra y si es suficiente el volumen o requiere más.
5. Identificar las placas de fertilización con el nombre de la paciente y el número de óvulos a inseminar.
6. Preparar las gotas de fertilización, colocando de 1 a 5 µl de la dilución de semen en la posición 3 de cada gota y dejar reposar otros 30 minutos en la incubadora a 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂.
7. Comprobar en el microscopio invertido que las gotas de fertilización contienen espermatozoides con buena movilidad y concentración, y que coincida con lo evaluado previamente en la placa de dilución.
8. Si el tratamiento es FIV / ICSI, no inseminar los óvulos destinados para FIV antes de desnudar los óvulos destinados a ICSI.
9. Transcurridos los 30 minutos de estar la muestra de semen en las gotas, se pasan los óvulos de la placa de equilibrio con la ayuda de la micropipeta (ver POE "Punción

	FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL		Código	
			PS-DC-029	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 4 de 5

Folicular") para la posición 9 de las gotas de fertilización. Colocar como máximo hasta 2 óvulos por gota, preferiblemente solo 1.

10. Con la ayuda de una jeringa de 1ml (insulínica) se fijará las células del cumulus de cada óvulo en el fondo de la placa de cada gota de fertilización.
11. Registrar en el formulario la hora e iniciales del embriólogo que hace la inseminación. El día de la inseminación de los óvulos se denomina Día cero (DO).
12. Vuelva a colocar las placas de fertilización con óvulos D0 y espermatozoides en la incubadora designada y esperar hasta la evaluación de la fecundación de (16 – 18h después), (ver POE "Evaluación de Fecundación").
13. Colocar el formulario en el cajón designado para planillas en proceso.

14. CÁLCULOS DE REFERENCIA

Después de preparar el capacitado y determinada la concentración de móviles progresivos, realizamos una dilución para ajustar la concentración, de modo a obtener un concentrado final de 100.000 a 200.000 espermatozoides móviles progresivos por ml, en un volumen de 300 µl

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

C_i = Concentración de espermatozoides móviles progresivos del capacitado.

V_i = Volumen de capacitado que vamos a retirar


C_f = 200.000 espermatozoides / ml

V_f = 300 µl = 0,3 ml

Después de determinado el V_i , añadimos ese volumen al volumen de medio Global Total for Fertilization, calculado a partir de: $V_{\text{Fertilization}} = 300 \mu\text{l} - V_i$

15. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

- 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.

	FECUNDACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL		Código	
			PS-DC-029	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 5 de 5

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

16. CONTROL DE CALIDAD

- Para obtener mayor producción es indispensable disponer de un número adecuado de óvulos para inseminar.
- Si una pareja está indicada para el ciclo de FIV/ICSI debemos desnudar al menos la mitad de los óvulos, en preferencia aquellos con peor clase morfológica.
- Todos los medios utilizados deberán someterse a un análisis de endotoxinas, que en este laboratorio los medios ya deben reportar este análisis cuando son comprados.
- Todos los equipos utilizados (incubadoras, filtros de cámaras de flujo laminar, estereoscopio, microscopios, etc.) deberán someterse a una revisión / calibración anual por representantes acreditados.