	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 1 de 9

1. OBJETIVO

Preparación y manutención de los medios de cultivo y reactivos necesarios para el correcto trabajo en el laboratorio.

2. ALCANCE

Desde el momento de apertura de historia hasta la preparación de insumos y medios previos a las distintas fases de los procedimientos de fertilización in vitro convencional e ICSI

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este Instructivo está orientado para el personal profesional del laboratorio de Embriología y Andrología.

4. RESPONSABLE

- Embriólogo
- Técnico de laboratorio

5. DEFINICIÓN


Medios de cultivo: Líquidos con formulación específica para permitir el desarrollo de células o microorganismos.

6. MATERIAL NECESARIO

a. Materiales y Equipos

Material Descartable	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Puntas de Pipetas 0.2-200µl • Puntas de Pipetas 100-1000µl • Pipetas serológicas de 10ml y 25ml • Placas de Petri 35mm • Placas de Petri 60mm • Placas de 4 Pozos • Placas de Pozo Central • Tubo Falcon 14ml y 15ml • Microtubo 1.5ml • Jeringa de 1ml • Micro filtro 	<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 20-200 µl • Micropipeta 100-1000 µl • Nevera con Refrigerador • Marcador Permanente • Lápiz de Punta de Diamante • Pipeteador Eléctrico • Gradillas de Tubos de 15ml

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

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 2 de 9

b. Medios de Cultivos


Medios de Cultivo	Fabricante	Descripción
Andrología		
PureSperm Wash	Nidacon	Medios para lavado de semen
PureSperm 100	Nidacon	Suspensión de sílica para preparar gradiente de densidades
PureSperm Buffer	Nidacon	Medios para dilución de semen viscoso y dilución de PureSperm 100
PureSperm Cryoprotec II	Nidacon	Crio protector para congelación de semen
Embriología		
Global Collect	Life Global	Medio que requiere suplementación y sirve para manipulación y lavado de óvulos y embriones fuera de la incubadora.
Global Protein Supplement	Life Global	Medio de suplementación para Global Collect.
Global Total for Fertilization	Life Global	Medio de manipulación y preparación de gametos y para fertilización In Vitro.
Global Total	Life Global	Medio para cultivo de embriones de estadio pronúcleo hasta D3 o D5.
Lite Oil	Life Global	Oleo para cubrir los medios de cultivo en la incubadora y evitar evaporación
Paraffin Oil	Life Global	Oleo para cubrir los medios durante la manipulación fuera de la incubadora y evitar evaporación
PVP	Life Global	Medio de inmovilización y aislamiento de espermatozoides durante la ICSI
ICSI	Vitrolife	Medio de inmovilización y aislamiento de espermatozoides durante la ICSI
Hyase -10X	Vitrolife	Tampón salino fisiológico con hialuronidasa que sirve para remoción de células del cúmulo y corona radiata que rodea los óvulos

Tabla 2. Descripción de los medios de cultivo necesarios en el laboratorio

c. Reactivos

Reactivo	Fabricante	Descripción
Pentoxifilina	-	Estimulante de la movilidad de los espermatozoides
Sperm VitalStain	Nidacon	Para evaluar la vitalidad de los espermatozoides
Fijador rápido	Bred	Para coloración de los espermatozoides

Tabla 3. Descripción de los reactivos necesarios en el laboratorio

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 3 de 9

Todos los Reactivos que no se encuentren en utilización, deben ser guardados en un lugar fresco, sin humedad, no expuesto a luz directa y en buenas condiciones de almacenamiento.

7. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Tapabocas
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo estériles


8. INSTRUCTIVOS GENERALES PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS

- Antes de comenzar la preparación de medios se debe rellenar el formulario "Preparación de medios de cultivo". La preparación debe efectuarse el día anterior a los procedimientos laboratoriales y teniendo en cuenta el número programado de los mismos.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

9. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

a. Global Collect – Global Protein Supplement al 10%


- Estos dos medios son distribuidos en frascos independientes uno del otro y deben permanecer bien cerrados y conservados en un lugar oscuro y con temperaturas de +2 a +8 °C. (Refrigeración).
- Verificar cuántos procedimientos que implican utilización de este medio se producirán al día siguiente.

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 4 de 9

- Para la preparación de esta concentración de 10%, se necesita 1ml de Global Protein Supplement por cada 9ml de Global Collect; Homogeneizar bien el preparado.
- Esta mezcla debe llevarse un día antes de su utilización a ser equilibrada a 37°C sin entrada de gases (CO₂ y O₂). Es preferible prepararla en frascos cuello inclinado o frascos tapa rosca y guardar bien sellado con Parafilm.
- Siempre marcar los frascos en que se contenga la mezcla, con la fecha de preparación de esta, concentración, el lote y fecha de vencimiento de los dos medios utilizados.
- Es preferible preparar el día antes la cantidad de mezcla que se utilizaría y así no guardamos en la nevera.

b. Hyase -10X (Enzima de Decumulación de Óvulos)

- Los tubos de Hyase -10X, deben permanecer bien cerrados y conservados en un lugar oscuro de +2 a +8 °C. (Refrigeración).
- Hyase -10X es estable hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta del envase y el certificado de análisis del lote correspondiente.
- Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desechar el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.
- Esta enzima no se encuentra en la concentración de uso; cada frasco contiene un volumen de 1 ml a concentración de 800 UI/ml, lo cual debe diluirse en porción 1:10 con medio Global Collect + Global Protein Supplement al 10% y bien mezclado.
- En dicha dilución 1:10, quiere decir que en el frasco de 1 ml o 1000 µl de Hyase -10X, debemos adicionar 900 µl Global Collect + Global Protein Supplement al 10%, previamente estabilizado a 37°C sin entrada de gases (CO₂ y O₂).
- 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.

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 5 de 9

c. Pentoxifilina


- Preparar una solución de 2 mg/ml.
- Pesar 2 mg de pentoxifilina en un microtubo de 1,5ml y añadir 1ml de Global for Fertilization.
- Filtrar la solución utilizando un filtro de 0,22 y una jeringa.
- 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.
- Las alícuotas se almacenan después en el congelador con temperaturas de -15 a -30°C y cubierto de la luz.
- Este reactivo se prepara según las necesidades y la caducidad.

10. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE ANDROLOGÍA

Los medios de Andrología se preparan el día anterior, teniendo en cuenta el número de capacitaciones que se van a realizar, y guardados en la incubadora de temperatura del Laboratorio de Andrología.

a. Gradiente de Densidades

- Verificar cuántos procedimientos que implican capacitación de semen se producirán al día siguiente.
- Para la preparación del gradiente del 90%: el día anterior, un tubo Falcon de 15 ml poner 1 ml de PureSperm Buffer y 9 ml de PureSperm 100. Homogeneizar.
- Para la preparación del gradiente del 45%: El día anterior al procedimiento, en un tubo Falcon de 15 ml colocar 5,5 ml de PureSperm Buffer y 4,5 ml de PureSperm 100. Homogeneizar.
- Hacer alícuotas de 1 ml de cada uno de los gradientes, cerrar bien las tapas y etiquetar adecuadamente con la fecha de preparación, concentración, así como el lote y fecha de vencimiento de los dos medios utilizados. Guardar en la nevera refrigeradora bien sellado con Parafilm.
- El día del procedimiento tomar las alícuotas necesarias cuando el paciente esté en la sala de recolección y dejarla a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos dentro de la cabina de flujo laminar de andrología hasta el momento en que se hará el montaje de estas.

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 6 de 9

b. PureSperm Wash

- El día anterior preparar un tubo Falcon de 15 ml, con 6 ml de medio PureSperm Wash, por cada capacitación prevista para el día siguiente; Colocar en la incubadora de temperatura (37°C) del laboratorio de Andrología, con la tapa bien cerrada y debidamente etiquetada con nombre del medio, lote, fecha de vencimiento y fecha de preparación.


c. Medio de Capacitación y Dilución de Semen

- Preparar un tubo Falcon de 5 ml con 1,5 ml de medio Global for Fertilization para cada capacitación y posterior dilución que se vaya a realizar al día siguiente.
- Colocar en la incubadora de temperatura (37°C) del laboratorio de Andrología con la tapa bien cerrada, debidamente etiquetada con nombre del medio, lote, fecha de vencimiento y fecha de preparación.

11. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE EMBRIOLOGÍA

- Se debe trabajar siempre en el interior de la Cámara de Flujo Laminar, tanto para la preparación de los medios como para la apertura de los frascos.
- Todos los medios de Life Global que sólo tienen HEPES (con excepción de Hyase, PVP y mezcla de Global Collect + Global Protein Supplement al 10%), deben equilibrarse previamente a su utilización a 6.5% de CO₂.
- Todos los tubos y placas preparadas deberán estar debidamente marcados con marcados permanente o lápiz de punta diamante.

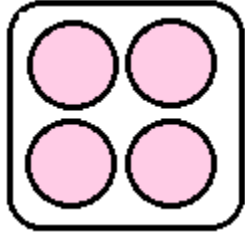
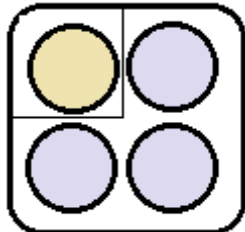
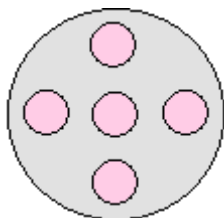
Procedimientos	Material Descartable	Medios de Cultivo
Punción Folicular	4 tubos Falcon 14ml	6 ml Global Collect + Global Protein Supplement al 10% - Sin equilibrar con CO ₂ .
	1 frasco cuello inclinado	10 ml de Paraffin Oil - Sin equilibrar con CO ₂ .
	1 placa de 4 pozos	700 µl Global for Fertilization + 400 µl Lite Oil - Equilibrar con 6.5% CO ₂ . (Lavado y Equilibrio de óvulos)
Semen	1 tubo Falcon de 5ml	1 ml de PureSperme 100 al 90%.
	1 tubo Falcon de 5ml	1 ml de PureSperme 100 al 45%.
	1 tubo Falcon de 15ml	6 ml de PureSperme Wash.
	1 tubo Falcon de 5ml	1,5 ml medio Global for Fertilization - Sin equilibrar con CO ₂ .
ICSI	1 placa de 4 pozos	1 pozo con Hyase 1:10 y 3 pozos con 700µl Global Collect + Global Protein Supplement al 10% – Sin equilibrar con CO ₂ . (Placa de denudación).


	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 7 de 9

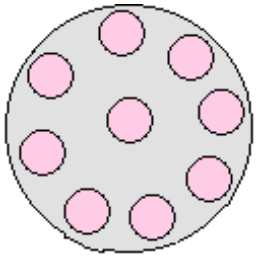
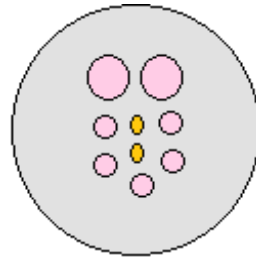
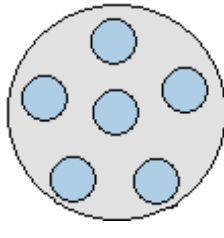
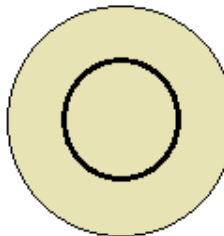
	1 tubo de 5ml	1 ml Global Collect + Global Protein Supplement al 10% - Sin equilibrar con CO ₂ . (Placa ICSI).
	1 frasco cuello inclinado	8 ml de Paraffin Oil - Sin equilibrar con CO ₂ . (placa ICSI).
	1 placa de 35mm / 5 Gametos	300 µl Global Total + 6ml Lite Oil - Equilibrar con 6.5% CO ₂ . (Placa de cultivo).
FIV	1 placa 60mm / 8 Óvulos	700 µl Global for Fertilization + 10ml Lite Oil - Equilibrar con 6.5% CO ₂ . (Placa de fecundación).
	1 placa 35mm	500 µl Global for Fertilization + 6ml Lite Oil - Equilibrar con 6.5% CO ₂ . (Placa de prueba de dilución de semen).
Cultivo (D1-D3 o D5)	1 placa de 35mm / 5 Gametos	300 µl Global Total + 6ml Lite Oil - Equilibrar con 6.5% CO ₂ . (Placa de cultivo).
Transferencia	1 placa de pozo central	6 ml Global Collect + Global Protein Supplement al 10% - Sin equilibrar con CO ₂ .

Tabla 4. Resumen de materiales y medios necesarios para los procedimientos realizados en el laboratorio de embriología. Ver el modo de preparación de las placas en el punto siguiente.

12. PREPARACIÓN DE PLACAS DE CULTIVO


Placa	Descripción
	Placa de Lavado y Equilibrio de óvulos En una placa de 4 pozos, colocar 700 µl de medio Global for Fertilization + 400 µl Lite Oil. Esta placa es preparada el día anterior de la punción y colocada en la incubadora a 37°C - 6.5% CO ₂ . Rotular la placa como Equilibrio, Nombre de la paciente y Núm. De procedimiento con marcador permanente.
	Placa de Denudación de óvulos En una placa de 4 pozos, colocar de izquierda a derecha en la posición 1, los 1000 µl de Hyase diluida 1:10 y en los 3 pozos restantes 1000 µl de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10%. Esta placa es preparada 15 minutos antes de ser utilizada y no requiere equilibrar con CO ₂ . Rotular la placa como Denudación, Nombre de la paciente y Núm. De procedimiento con marcador permanente.
	Placa de Prueba de Dilución de Semen En una placa de 35mm, colocar 4 gotas de 75 µl de medio Global for Fertilization en las posiciones horarias 12, 3, 6, 9 y una gota central para lavado; cubrir con 6ml Lite Oil. Esta placa es preparada el día anterior de la punción y colocada en la incubadora a 37°C - 6.5% CO ₂ . Rotular la placa como Dilución y el nombre de la paciente; marcar con lápiz de punta diamante en la parte inferior externa de la placa.

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 8 de 9

	Placa de FIV En una placa de 60mm, colocar 8 gotas periféricas de 75 µl de medio Global for Fertilization y una gota central para lavado; cubrir con 10ml Lite Oil. Esta placa es preparada el día anterior de la punción y colocada en la incubadora a 37°C - 6.5% CO ₂ . No numerar las gotas. Rotular la placa como FIV y el nombre de la paciente; marcar con lápiz de punta diamante en la parte inferior externa de la placa.
	Placa de ICSI En una placa de 60mm, colocar 2 gotas de 10 µl de PVP en el centro de la placa, 5 gotas de 10 µl de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10% equilibrada a 37°C alrededor del PVP para mantener los óvulos en medio del procedimiento y 2 gotas de 20 µl de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10% equilibrada a 37°C en la parte superior de la placa; cubrir con 8 ml de Paraffin Oil equilibrada a 37°C.
	Placa de Cultivo En una placa de 35mm, colocar 5 gotas periféricas de 50 µl de medio Global Total y una gota central para lavado; cubrir con 6ml Lite Oil. Esta placa es preparada solo el día anterior de la punción si es para ICSI. Equilibrar en la incubadora a 37°C - 6.5% CO ₂ . No numerar las gotas. Rotular la placa como CIV y el nombre de la paciente; marcar con lápiz de punta diamante en la parte inferior externa de la placa.
	Placa de Transferencia En una placa de pozo central colocar 1 ml de medio Global Collect + Global Protein Supplement al 10% y en la parte periférica 2 ml del mismo medio.

13. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

- 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.

	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS		Código	
			PS-DC-025	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

14. CONTROL DE CALIDAD

- 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.
- Todas las incubadoras deben tener todos los controles de medición que precisen, Temperatura, CO₂ y O₂.
- Todos los equipos utilizados (incubadoras, filtros de cámaras de flujo laminar, estereoscopio, microscopios, etc.) deberán someterse a una revisión / calibración anual por representantes acreditados.