	PUNCIÓN FOLICULAR		Código	
			PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 1 de 7

1. OBJETIVO

Recuperación de los óvulos existentes en el líquido folicular obtenido por punción eco guiado de los folículos ováricos.

2. ALCANCE

Desde la entrada de la paciente a sala de procedimientos menores hasta su salida a recuperación luego de

3. CAMPO DE APLICACIÓN

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

4. RESPONSABLE

- Embriólogo
- Técnico de laboratorio

5. DEFINICIÓN

Los resultados de un tratamiento con estimulación ovárica es el desarrollo de múltiples folículos aptos para ser aspirados.

La aspiración folicular consiste en la obtención de líquido que se encuentra en el interior de cada folículo y en el cual se encuentra los óvulos; este líquido folicular después es evaluado y es donde son identificados los óvulos y su estado de maduración. Todo este procedimiento es realizado de modo a minimizar el tiempo de exposición a condiciones no fisiológicas de temperatura, osmolaridad y pH.

6. SIGLAS

FIV - Fertilización In vitro

CCO – Complejo Cumulus Óvulo (Corona)


ICSI – Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoide

7. INDICACIONES CLÍNICAS

Está indicado para pacientes que se encuentre en curso de tratamientos de reproducción (donación de óvulos, acumulación o preservación de los mismos por vitrificación, FIV o ICSI) después de estimulación ovárica.

8. TIPO DE MUESTRA

- Líquido folicular obtenido por aspiración folicular.

	PUNCIÓN FOLICULAR	Código PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia 11/03/2022	Versión 1	Página 2 de 7

9. INFORMACIÓN GENERAL

9.1 Recepción de la Muestra


- Hacer llamada a la paciente 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.
- Todos los tubos en donde se realice la colecta de la punción deben estar debidamente etiquetados con el nombre y número del proceso de la paciente. Si el mismo día se tiene más de una punción utilizar colores de marcador diferentes.
- La muestra es recogida en la sala de procedimientos y entregada por la ventana de comunicación al laboratorio de embriología por la enfermera o auxiliar, o de ser preciso será buscada por el propio técnico de laboratorio cuando sea necesario.
- Verificar la identidad de la paciente que se encuentra en la sala de procedimientos y conformar con el formulario de tratamiento, el cual tiene que ser diligenciado desde el día anterior; se constatará el nombre en todo el material descartable y se le pedirá a la paciente que diga su nombre.
- Para que se lleve a cabo la punción folicular, la paciente con anterioridad tiene que leer y firmar los consentimientos informados relacionados con todas las etapas del tratamiento que lleva en curso.
- Siempre que se realice manipulación de óvulos debe ser en superficies con temperaturas controladas (37°C) y dentro de la cabina de flujo laminar.

9.2. Fases del Procedimiento

- Obtención de los óvulos.
- Lavado de los óvulos.
- Clasificación morfológica de los óvulos.

10. MATERIAL NECESARIO

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos
<ul style="list-style-type: none"> Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl Puntas de Stripper 275 µm Placas de Petri 35mm Placas de Petri 60mm 	<ul style="list-style-type: none"> Cámara de Flujo Laminar con Superficie Térmica Incubadora 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂ Incubadora 37°C y 6.5% CO₂ Micropipeta Stripper 	<ul style="list-style-type: none"> Global Collect Global Protein Supplement Paraffin Oil Global Total for Fertilization

	PUNCIÓN FOLICULAR		Código	
			PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 3 de 7

- Placas de Petri 90mm
- Tubo Falcon 14ml
- Jeringa de 1ml
- Frasco de Colecta 120 ml
- Gasas Estériles
- Frasco de Cuello Inclinado
- Micropipeta 20-200 µl
- Microscopio Óptico Invertido
- Estereomicroscopio con Superficie Térmica
- Lápiz de Punta de Diamante
- Marcado Permanente
- Sistema de Aspiración Folicular
- Bloque Térmico para Tubo
- Lite Oil

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

11. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL


- Tapabocas
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo estériles

12. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

12.1. Día anterior

Preparar para cada punción:

- 2 tubos Falcon con 6 ml de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10%, de acuerdo con IT " Preparación de Medios y Reactivos " 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 mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10%, de acuerdo con IT " Preparación de Medios y Reactivos " 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.
- En un frasco de cuello inclinado hacer una alícuota de Paraffin Oil de acuerdo con IT " Preparación de Medios y Reactivos " y según la cantidad de placas de lavado o placas ICSI que se utilizarían.
- Analizada la historia clínica de la paciente, se debe diligenciar el protocolo de aspiración folicular para vitrificación, FIV o 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.
- 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, 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


	PUNCIÓN FOLICULAR		Código	
			PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 4 de 7

el nombre de la paciente, procedimiento, fecha de realización y de cultivos; dejar la cámara separada hasta el siguiente día que sería utilizada.

12.2. 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 90 mm ya que se aprovecha tanto la tapa como la base y distribuirlas 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.
4. Verificar que la placa de equilibrio de óvulos que contiene Global Total for Fertilization + Lite Oil 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 6.5% CO₂.
5. Identificar a la paciente que entra en la sala de procedimientos para la punción folicular y comprobar que el Formulario "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 2 tubos de 14 ml con 6 ml de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10%, 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 del 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 6 ml de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10% y se cubre con suficiente Paraffin Oil, estos dos medios debidamente 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 90 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 1). Revisar con atención a los bordes de la placa.

	PUNCIÓN FOLICULAR		Código	
			PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión	Página
			1	5 de 7

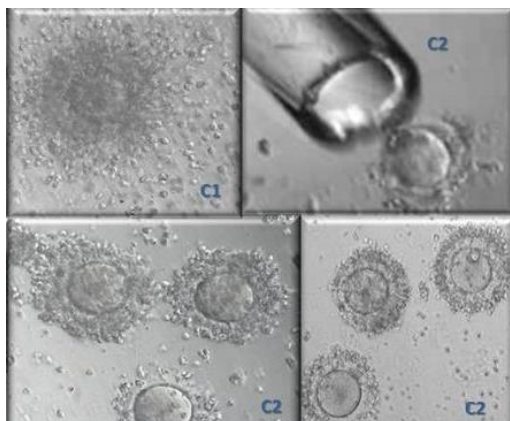


Figura 1. Imagen C1 un óvulo rodeada de las células del *cúmmulus oophorus* y maduro, imágenes C2, óvulos con pocas células del *cúmmulus oophorus* circundantes. Observación realizada en Estereomicroscopio.


10. Cuando se encuentra el primer CCO, con la ayuda de una micropipeta 0.2 - 200µl, aspirar el CCO con la menor cantidad de sangre y líquido folicular posible y pasarlo inmediatamente a la primera placa de lavado que contiene mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10%. Hay otros dos modos igualmente correctos para manipular el líquido folicular, con un sistema de aspiración o con pipeta Pasteur de vidrio y goma de silicona acoplada; de este modo se procederá con la recuperación de todas las estructuras del líquido folicular contenido ya en las placas de Petri de 90 mm.
11. Una vez terminada la punción y la obtención de los óvulos de un ovario, se procede al segundo.

Atención: 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 ó 2 de mezcla Global Collect + Global Protein Supplement al 10%. (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 de la micropipeta a la otra placa de lavado (2da ó 3ra si existiera), y con la ayuda de las agujas de las jeringas de 1 ml cortar los CCCO, separándolos del material oscuro del cúmulo y los restos de sangre que el líquido folicular pueda contener.

	PUNCIÓN FOLICULAR		Código	
			PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 6 de 7

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

15. Una vez terminado el punto anterior, cambiar la punta de la pipeta y sacar de la incubadora la placa de equilibrio, pasar los óvulos limpios poco a poco a los pozos y pipetear suavemente hasta que queden libres de restos de medio tamponado. En cada pozo solo se deben contener máximo 10 óvulos.

16. Confirmar el nombre del paciente escrito en la placa con el nombre del formulario.

Fase 3. Clasificación morfológica de los óvulos.

17. Evaluar morfológicamente los óvulos y clasificarlos de acuerdo con la información de la tabla 2. Registrar todos los datos en el formulario “FIV/ICSI” o Vitricificación.

18. Dejar los óvulos contenidos en la placa de equilibrio en la incubadora de 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂, verificar si el compartimiento asignado es el correcto. En este espacio permanecerán hasta la realización de la inseminación o la ICSI o el procedimiento que proceda.

13. REFERENCIAS PARA CLASIFICACIÓN DE LOS ÓVULOS


Clasificación	Descripción
Grado 1	Cumulus disperso, corona expandida e 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.

Tabla 2. La clasificación más utilizada se compone de tres grados.

Es preciso tener en cuenta que esta evaluación morfológica es difícil, debido a las células de la granulosa que rodean el óvulo, siendo entonces bastante subjetiva.

14. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

- Si, después de analizar los primeros tubos de la punción folicular, no se encuentran óvulos:
 - Avisar inmediatamente al equipo médico.
 - Realizar la prueba de la B-hCG de la orina para verificar si la paciente hizo la aplicación del medicamento correctamente.
- Obtención de un alto porcentaje de óvulos con zonas rotas:
 - Avisar al equipo médico y verificar la presión del aspirador folicular.

	PUNCIÓN FOLICULAR		Código	
			PS-DC-028	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 7 de 7

3. 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.

15. CONTROL DE CALIDAD

- Todas las superficies en las que se trabaja con los óvulos deben estar a temperaturas cercanas a los 37°C, pero no superior a esta.
- Todos los medios utilizados deberán haber sido sometidos a análisis de las endotoxinas, que en este laboratorio los medios ya deben reportar este análisis cuando son comprados.
- Todas las incubadoras deben haber sido monitorizadas para los parámetros CO₂, O₂ y Temperatura.
- Todos los equipos utilizados (incubadoras, filtros de cámaras de flujo laminar, estereoscopio, microscopios, etc.) deberán someterse a una revisión / calibración anual por representantes acreditados.
- Debe existir una perfecta coordinación entre el equipo médico y el laboratorio de embriología. El médico y anestesiólogo deben estar disponibles para atender la solicitud del embriólogo en relación con el ritmo de la aspiración; el embriólogo no debe permitir que se acumulen más de tres tubos para procesar y en ocasiones, hay que esperar hasta haber recuperado los óvulos para que puedan proseguir.
- Aunque se encuentra un solo óvulo en el líquido folicular de un tubo, la búsqueda debe continuar. La presencia de un óvulo no excluye la posibilidad de haber más.
- No se deben utilizar equipos que sean manipulados con la boca durante el tiempo de procesamiento del líquido folicular.