

# **EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ORGANIZACIÓN, EQUIPAMIENTO Y PARÁMETROS DE CALIDAD.**

ASSISTED REPRODUCTION LABORATORY: ORGANIZATION, EQUIPMENT AND  
QUALITY PARAMETERS.

O LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ORGANIZACIÓN,  
EQUIPOS E PARÁMETROS DE CALIDADE.

MAGALI MURIEL CUADROS VARGAS

JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ GARCÍA

AUTORA

TUTOR

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER BIOLOGÍA CELULAR, MOLECULAR Y GENÉTICA

CURSO 2015/2016



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Pág.4
DEPARTAMENTOS DE UNA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (URHA)	Pág.5
TRATAMIENTOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	Pág.9
ESTRUCTURA Y PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	Pág.11
LABORATORIO DE ANDROLOGÍA	Pág.11
LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA	Pág.14
ÁREA DE CRIOCONSERVACIÓN	Pág.14
SOPORTE Y MANTENIMIENTO	Pág.17
RECURSOS HUMANOS	Pág.18
RECURSOS FÍSICOS	Pág.20
EQUIPAMIENTO	Pág.23
MATERIAL FUNGIBLE	Pág.25
MEDIOS SELECCIONADOS	Pág.26
PRODUCTOS DE LIMPIEZA	Pág.27
CALIDAD EN EL ENTORNO DE UNA URHA	Pág.28
GESTIÓN DE DATOS	Pág.32
ÉTICA E INVESTIGACIÓN	Pág.33
SEGURIDAD Y RIESGOS LABORALES	Pág.33

LEGISLACIÓN	Pág.34
DOCUMENTOS DE LEGISLACIÓN	
ESPAÑOLA	Pág.35
DOCUMENTOS DE LEGISLACIÓN	
EUROPEA	Pág.36
COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	Pág.37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág.39

## **ANEXOS**

ANEXO I. PROTOCOLOS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA.

ANEXO II. PROTOCOLOS DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA.

ANEXO III. PLANTILLAS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA.

ANEXO IV. PLANTILLAS DE LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA.

ANEXO V. HOJAS DE REGISTRO DE ACTIVIDAD.

ANEXO VI. HOJAS DE REGISTRO DE MANTENIMIENTO.

ANEXO VII. INDICADORES DE CALIDAD.

## INTRODUCCIÓN

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), surgen en los años 70 cambiando por completo las opciones de tratamiento para las parejas que sufren trastornos reproductivos.

La infertilidad es la incapacidad para generar gestaciones capaces de evolucionar hasta la viabilidad fetal. Por tanto, este concepto engloba situaciones como el aborto de repetición, la muerte fetal intrauterina, el parto prematuro, etc. (SEF, 2012).

La esterilidad, definida como la incapacidad para lograr una gestación tras un año de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos y con una frecuencia normal, afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva (SEF, 2012). Las causas de esterilidad son diversas (Tabla 1), y pueden afectar al gameto masculino, al gameto femenino, al embrión, a la implantación del embrión en el útero, o al desarrollo del feto.

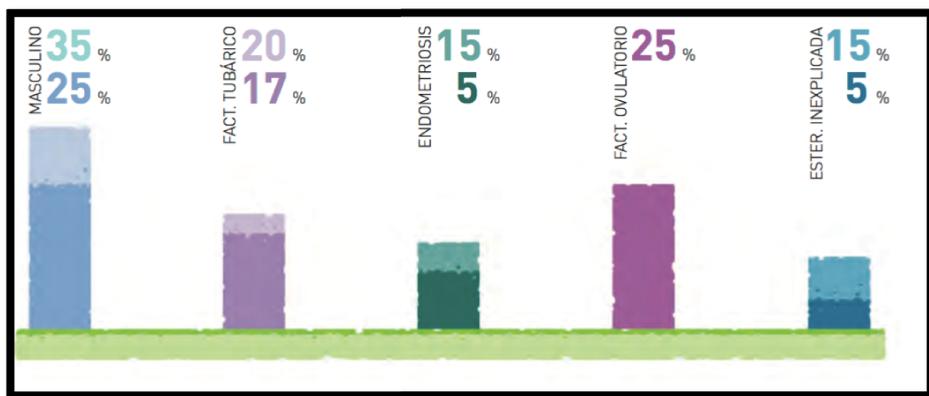


Tabla 1. Principales causas de esterilidad en países desarrollados (Tomado de SEF, 2012).

El laboratorio de reproducción asistida se encuentra dentro de una Unidad de Reproducción Humana Asistida (URHA), como parte de una clínica de reproducción asistida o bien como parte de un complejo hospitalario.

El objetivo de este trabajo es integrar la bibliografía disponible para el montaje de un laboratorio de reproducción asistida, pero adaptada a una clínica de tamaño pequeño (unos 100 ciclos al año), intentando alcanzar los máximos estándares de calidad. Este proyecto surge como resultado del montaje de un laboratorio dentro de una clínica ginecológica, que en la actualidad está en funcionamiento en la ciudad de A Coruña.

## **DEPARTAMENTOS DE UNA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (URHA)**

Las distintas áreas que forman parte de una URHA pueden, en muchos casos, coincidir en el mismo espacio físico. En esos casos, es importante que sean delimitadas en su organización, para facilitar la gestión de sus funciones.

En este proyecto el laboratorio fue integrado dentro de una clínica ginecológica que ya se encontraba en funcionamiento. Debido a esto, excepto las áreas propias del laboratorio, todos los departamentos se integraron en los preexistentes. Únicamente fue necesario reorganizar las funciones e integrar el nuevo personal dedicado en exclusiva a la URHA.

### **ÁREA DE RECEPCIÓN**

El área de recepción es el primer contacto de un paciente con la unidad, es conveniente que sea un lugar confortable y lo suficientemente amplio para otorgar a los pacientes la intimidad adecuada. Además incluye, una o varias áreas de espera y los aseos.

### **ADMINISTRACIÓN**

El área de administración se encarga de todos los trámites relacionados con la unidad tanto internamente como externamente.

Las funciones del personal de administración son: gestión de personal y recursos humanos, gestión administrativa y económica relacionada con los pacientes, los proveedores, la administración pública y supervisión de la ley de protección oficial de datos.

### **MANTENIMIENTO**

En este proyecto, muchas de las funciones de mantenimiento se encuentran externalizadas. Todo el mantenimiento ha de realizarse siguiendo los protocolos y guías realizadas por el laboratorio de forma que se ejerza un control constante de la calidad del servicio y que estos no influyan negativamente en el funcionamiento de la unidad.

El mantenimiento de una URHA incluye:

- Limpieza.
- Mantenimiento de las instalaciones y reparaciones generales.
- Mantenimiento de equipos por personal especializado:
  - o Equipos de laboratorio
  - o Equipos de consulta y quirófano
  - o Instalaciones eléctricas
  - o Climatización.
- Soporte informático.

## **ALMACÉN**

La zona reservada a almacén puede ser una zona común para toda la unidad o varias zonas para cada unidad. En ambos casos estas zonas deben tener las características necesarias tanto ambientales como de limpieza, para mantener todo el material almacenado en perfectas condiciones.

Es recomendable que las zonas reservadas a almacén sean de fácil acceso y con un tamaño suficiente para que sean cómodas y todo el material esté fácilmente localizable.

## **ÁREAS DE GESTIÓN**

Las áreas de gestión, o despachos, pueden corresponder con las áreas administrativas tanto del laboratorio como de las consultas.

Dentro del área administrativa se encuentran las áreas reservadas para la custodia de las historias clínicas y toda la documentación relacionada con los pacientes. Esta área permanece siempre bajo clave o cerradura para impedir el acceso de personal no autorizado.

## **CONSULTAS**

Las consultas deben tener un espacio reservado para dar una correcta información a los pacientes en un entorno tranquilo y de absoluta intimidad.

Además, las consultas pueden tener un área adyacente dedicada a realizar las revisiones necesarias, equipadas con un ecógrafo y una camilla de exploración ginecológica.

En el caso de la unidad proyectada, las consultas utilizadas son las preexistentes en la clínica de ginecología ya que el equipamiento necesario es exactamente el mismo.

## **QUIRÓFANO**

El área de quirófano debe cumplir todos los requisitos que se especifican en la legislación de cada comunidad autónoma.

Es preferible que el quirófano sea de uso exclusivo para la URHA aunque en muchos casos, los quirófanos son de disposición del centro médico por lo que se realizan diversas intervenciones.

Debido a la disponibilidad de quirófanos en el centro, se decidió que el quirófano adyacente al laboratorio, fuera de uso exclusivo para la URHA (Figura 2). De esta forma se aseguran las condiciones de utilización y se limita la circulación de personal.



**Figura 2. Quirófano de la URHA.**

## **ÁREA DE ESTERILIZACIÓN**

El área de esterilización es un área específica dedicada al tratamiento de todo el material reutilizable, empleado durante las intervenciones realizadas en el quirófano.

En el caso del laboratorio se hace uso de esta área para esterilizar todo el material previo a su uso, en los casos en los que no viene esterilizado de fábrica.

## **DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA**

El departamento de enfermería resulta un área fundamental para el funcionamiento de una URHA, engloban gran cantidad de funciones que son básicas para la coordinación de todos los departamentos. Está formado por personal de enfermería y auxiliares cuyas funciones principales son: mantenimiento del quirófano y las salas de recuperación, soporte durante las intervenciones, atención al paciente, control de la medicación, tareas administrativas, selección y seguimiento de donantes.

Un departamento de enfermería con personal suficiente y bien formado facilita las funciones de los demás departamentos e incrementa la calidad en la atención al paciente ya que mantienen un contacto directo desde que comienza el tratamiento hasta que finaliza.

## **DEPARTAMENTO MÉDICO**

El departamento médico debería estar formado por al menos dos profesionales con una formación específica en Reproducción Humana Asistida.

Los profesionales médicos realizan tanto el seguimiento de los tratamientos como las intervenciones que tienen que realizarse en el quirófano.

Las áreas de trabajo del departamento médico incluyen las consultas y los quirófanos.

## **LABORATORIO**

El personal de laboratorio incluye embriólogos clínicos y técnicos de Laboratorio.

El laboratorio de una URHA comprende el Laboratorio de Andrología, el Laboratorio de Embriología y el Área de Crioconservación. Estas áreas pueden estar físicamente separadas o compartir el mismo espacio.

En este proyecto se disponen de dos laboratorios separados, el laboratorio de andrología y el laboratorio de embriología. El área de crioconservación se sitúa dentro del laboratorio de embriología y el área de gestión está repartida en dos despachos y se dispone, además, de un aseo exclusivo para la obtención de muestras.

## TRATAMIENTOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Los tratamientos en los que está implicado el laboratorio de reproducción asistida son:

- **Inseminación Artificial (IA):** La IA consiste en la capacitación de una muestra de semen que después será depositada en el interior del útero de la paciente por medio de una fina cánula. Es un procedimiento sencillo que no requiere anestesia (Anexo I. Protocolos de Andrología). Dependiendo de la procedencia de la muestra se distinguen dos tipos:
  - Inseminación Artificial de Cónyuge (IAC): cuando la muestra proviene de la pareja de la paciente.
  - Inseminación Artificial de Donante (IAD): cuando la muestra proviene de un donante de semen. Los donantes pueden proceder de un banco propio o externo.
- **Fecundación In Vitro convencional (FIV):** En la FIV se produce la obtención de los oocitos y de una muestra de semen capacitada. Una vez se han obtenido los gametos, se pondrán en contacto en una placa de cultivo para que se produzca la fecundación sin más intervención. Posteriormente se realiza el cultivo de embriones, la selección, la transferencia y la congelación en el caso de que fuera necesario (Anexo II. Protocolos de Embriología).
- **Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *Intracytoplasmatic Sperm Injection*):** La ICSI es un tipo de fecundación *in vitro* en el que se produce la obtención de los gametos de la misma forma que en la FIV. En este caso además, se produce una denudación de los oocitos retirando todas las células de la granulosa para después ser microinyectados uno a uno. Durante la microinyección se selecciona un espermatozoide y se introduce en el interior de cada óvulo. Después se sigue el mismo proceso con el cultivo de embriones, selección, transferencia y congelación de embriones si fuera necesario (Anexo II. Protocolos de Embriología).
- **Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP):** El objetivo del DGP es conocer las características genéticas de los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* en los casos en los que esté indicado. Mediante el DGP

se consiguen seleccionar embriones sanos para la transferencia embrionaria. El DGP se realiza mediante biopsia embrionaria en estadio celular (Día 3 de desarrollo) o en estadio de blastocisto (Día 5-6 de desarrollo). Este análisis puede realizarse en el mismo laboratorio de reproducción asistida pero es bastante común que sea realizado por un laboratorio externo debido a la distinta formación y equipamiento necesario. Actualmente, las técnicas principales para realizar el DGP son la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) y los microarrays de DNA (Elder, K., Ribes, J., & Baker, D., 2004).

- **Preservación de la fertilidad:** Los tratamientos de preservación de la fertilidad tienen como objetivo mantener la posibilidad de conseguir una gestación mediante reproducción asistida pero no en el momento del tratamiento si no en el futuro. Se realizan cuando la calidad de los gametos puede verse afectada debido a algún tratamiento médico o cuando por causas personales la maternidad se ve aplazada con la posible pérdida de calidad oocitaria debido a la edad. Por ello nos encontramos con dos tipos de tratamientos muy distintos:
  - **Congelación de semen:** en el caso de la congelación de semen el procedimiento es sencillo. La muestra obtenida mediante masturbación será congelada siguiendo los protocolos actuales (Anexo I. Protocolos de Andrología). La cantidad de muestra congelada dependerá de la valoración del facultativo.
  - **Congelación de oocitos:** consiste en un tratamiento de estimulación hormonal ovárica con la posterior obtención de oocitos mediante punción ovárica. Los oocitos recuperados serán vitrificados y conservados hasta que la paciente desee utilizarlos.

## ESTRUCTURA Y PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Dentro de la URHA, el laboratorio constituye uno de los pilares en los que se apoya el éxito de los tratamientos y debe ser un elemento principal a la hora de diseñar una unidad. La atención meticulosa en cada uno de los pasos de un ciclo de reproducción asistida, es fundamental para conseguir el resultado esperado, el nacimiento de un niño sano.

La gestión y coordinación del laboratorio, depende de diversos factores: el espacio físico disponible, el equipamiento, el sistema de gestión de calidad, el personal y la interrelación tanto con los distintos departamentos como dentro del laboratorio.

El laboratorio de reproducción asistida se subdivide en tres áreas que pueden o no, compartir el mismo espacio físico: el laboratorio de andrología, el laboratorio de embriología y el área de crioconservación.

Además, existen numerosas tareas de soporte y mantenimiento necesarias para que cada una de las áreas del laboratorio funcione correctamente (ESHRE, 2016).

### LABORATORIO DE ANDROLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define que la andrología es la rama de la ciencia que trata la salud reproductiva masculina.

El laboratorio de andrología es el área del laboratorio donde se procesan las muestras de semen procedentes de los pacientes o donantes. Todos los procedimientos realizados, tiene que seguir unos protocolos con la finalidad de obtener la máxima calidad del proceso y asegurar la trazabilidad de las muestras (Björndahl, L., 2010). Los protocolos elaborados durante la realización de este trabajo se encuentran en el Anexo I.

Los procedimientos básicos que se realizan en el laboratorio de andrología son:

- **Análisis de la muestra:** Un análisis seminal o seminograma, es el análisis de una muestra de semen procedente de un paciente o donante. Para ello se siguen las directrices de la OMS en su manual editado en 2010 (WHO, 2010), donde se describen los procedimientos (Tabla 2) y los límites inferiores de

referencia para cada parámetro (Tabla 3). Los seminogramas realizados en la unidad son seminogramas básicos por lo cual se denominan análisis seminales. Los parámetros utilizados en el análisis seminal (Tabla 3), se describen con detalle en los protocolos del Anexo I (Protocolos de Andrología).

ANÁLISIS BÁSICO
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recolección y preparación del espécimen seminal.</li> <li>- Examen de las características macroscópicas.</li> <li>- Movilidad espermática.</li> <li>- Vitalidad espermática.</li> <li>- Concentración de espermatozoides.</li> <li>- Recuento de otras células presentes en el eyaculado.</li> <li>- Anticuerpos antiespermatozoides.</li> <li>- Tinción leucocitaria.</li> <li>- Morfología espermática.</li> </ul>
MÉTODOS OPCIONALES
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Índices de anomalías espermáticas.</li> <li>- Tinción inmunocitoquímica de leucocitos.</li> <li>- Interacción entre espermatozoide y moco cervical.</li> <li>- Marcadores bioquímicos del plasma seminal.</li> <li>- Análisis espermático mediante aplicaciones informáticas (CASA).</li> </ul>
PRUEBAS DE INVESTIGACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Generación de oxígeno reactivo.</li> <li>- Pruebas de interacción espermatozoide-ovocito.</li> <li>- Pruebas de unión a la zona pelúcida humana.</li> <li>- Reacción acrosómica.</li> <li>- Prueba de penetración en ovocitos de hámster denudados.</li> <li>- Estudio de la cromatina espermática.</li> </ul>

**Tabla 2. Resumen de los procedimientos para el examen procesado de las muestras de semen (WHO, 2010).**

Con este análisis se realiza un diagnóstico que servirá para hacer la valoración necesaria por parte del equipo médico. En el momento de realizar el diagnóstico, es importante tener en cuenta que un solo seminograma tiene una eficiencia diagnóstica limitada (sensibilidad y especificidad bajas). Por ello, en determinados casos será recomendable obtener más de uno y, si fuera posible, espaciado en el tiempo (Brassesco, M., 2011).

Los seminogramas pueden realizarse de forma manual o utilizando aplicaciones informáticas como el sistema CASA. En nuestro centro serán realizados de forma manual en todos los casos.

PRINCIPALES PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS DEL ANÁLISIS SEMINAL	
Parámetro	Límites inferiores de referencia OMS 2010
Volumen (ml)	1.5
Concentración (mill/ml)	15
Número spz (mill/eyaculado)	39
Motilidad (% spz móviles)	40 (a+b+c)
Movilidad progresiva	32 (a+b)
Morfología (% spz normales)	4
Vitalidad (% spz vivos)	58
Leucocitos (mill/ml)	<1.0

Tabla 3. Límites inferiores de referencia para los principales parámetros utilizados para un análisis seminal. (WHO, 2010).

- **Capacitación de las muestras:** La capacitación espermática es la preparación del semen para ser utilizado en las distintas TRA o para la obtención del REM (Recuento de espermatozoides móviles), este valor será utilizado para la valoración clínica del tratamiento a seguir.  
La capacitación tiene como objetivo seleccionar los espermatozoides de mejor movilidad en un medio de cultivo. Puede realizarse mediante *Swim Up* (Anexo I. Protocolos de Andrología) o por gradientes de concentración (WHO, 2012).
- **Crioconservación de muestras de semen:** El objetivo de la crioconservación de muestras es el mantenimiento de la función y viabilidad de los espermatozoides. Se realiza por diversas razones: cuando la muestra no puede ser utilizada en fresco o cuando el paciente va a someterse a algún tratamiento que puede afectar a su función reproductiva.  
Las muestras de semen son tratadas con un medio crioprotector y conservadas a -196°C en nitrógeno líquido o vapores de nitrógeno. Todas las muestras serán procesadas según el protocolo que se encuentra en el Anexo I (Plantillas de Andrología).
- **Procedimientos adicionales:** Se pueden realizar diversos procedimientos adicionales descritos por la OMS (Tabla 2). Además, en los últimos años se han generalizado otros procedimientos diagnósticos, como la fragmentación de DNA y otros que se realizan dentro de los ciclos de reproducción asistida como las columnas de anexina (MACS, *Magnetic Activated Cell Sorting*). Los protocolos para ambos procedimientos se encuentran en el Anexo I (Plantillas de Andrología). Otras de las pruebas adicionales que se pueden realizar son:

integridad de membranas, cultivo de semen, marcadores bioquímicos en plasma seminal y análisis cinético.

La realización de unos u otros procedimientos dependerá del equipamiento y de los procedimientos de trabajo de cada unidad.

- **Preparación de muestras procedentes de testículo:** en algunas ocasiones no es posible recuperar espermatozoides del eyaculado y es necesario obtenerlos por medio de aspiración de epidídimo o biopsia testicular (Anexo I. Protocolos de Andrología).
- **Preparación de muestras en pacientes con eyaculación retrógrada:** La eyaculación retrógrada es una alteración de la eyaculación en la que parte se redirecciona hacia la vejiga, de manera que se encuentran espermatozoides en la orina posterior al eyaculado. El procedimiento para la preparación de estas muestras incluye una preparación previa del paciente para la alcalinización de la orina (Anexo I. Protocolos de Andrología).

## LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

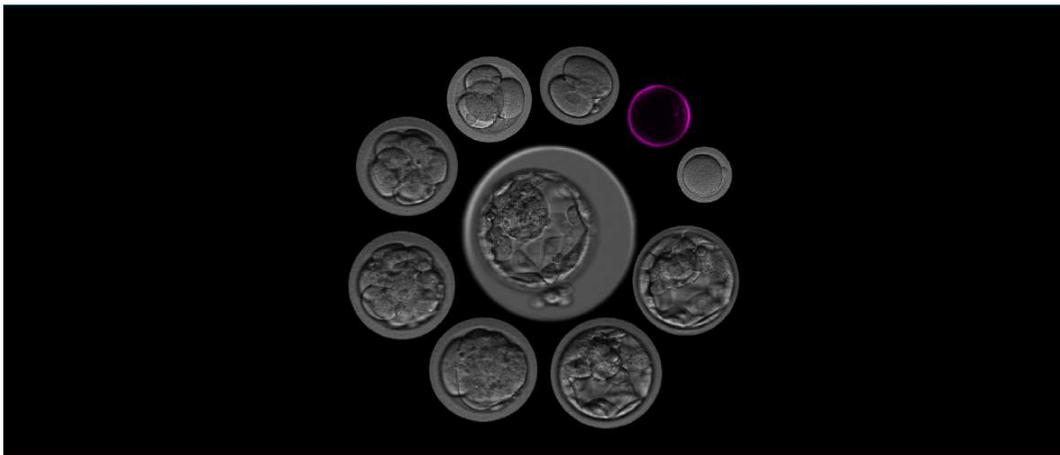
En el laboratorio de embriología (Fig. 3) se realizan los procesos relacionados con la obtención de oocitos, la fecundación, el cultivo de embriones y la transferencia de embriones (Gardner, D. K., 2004).

Además, se realizan todas las tareas relacionadas con la preparación del laboratorio para los distintos procedimientos:

- **Preparación del laboratorio:** Esta labor puede ser realizada tanto por embriólogos como por técnicos de laboratorio. Consiste en realizar una serie de protocolos de preparación específicos para cada uno de los procedimientos a realizar tanto en el laboratorio de andrología como en el laboratorio de embriología (Anexo II. Protocolos de Embriología).
- **Obtención de oocitos:** La obtención de oocitos se realiza mediante punción ovárica, en una intervención ecoguiada y bajo anestesia.  
Para la obtención de oocitos, se ha realizado previamente una estimulación hormonal ovárica. Aproximadamente 36 horas antes de la punción se administra una dosis de hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) para la

maduración de los oocitos. Si se va a realizar una ICSI es necesario realizar la denudación de los oocitos (Anexo II. Protocolos de Embriología).

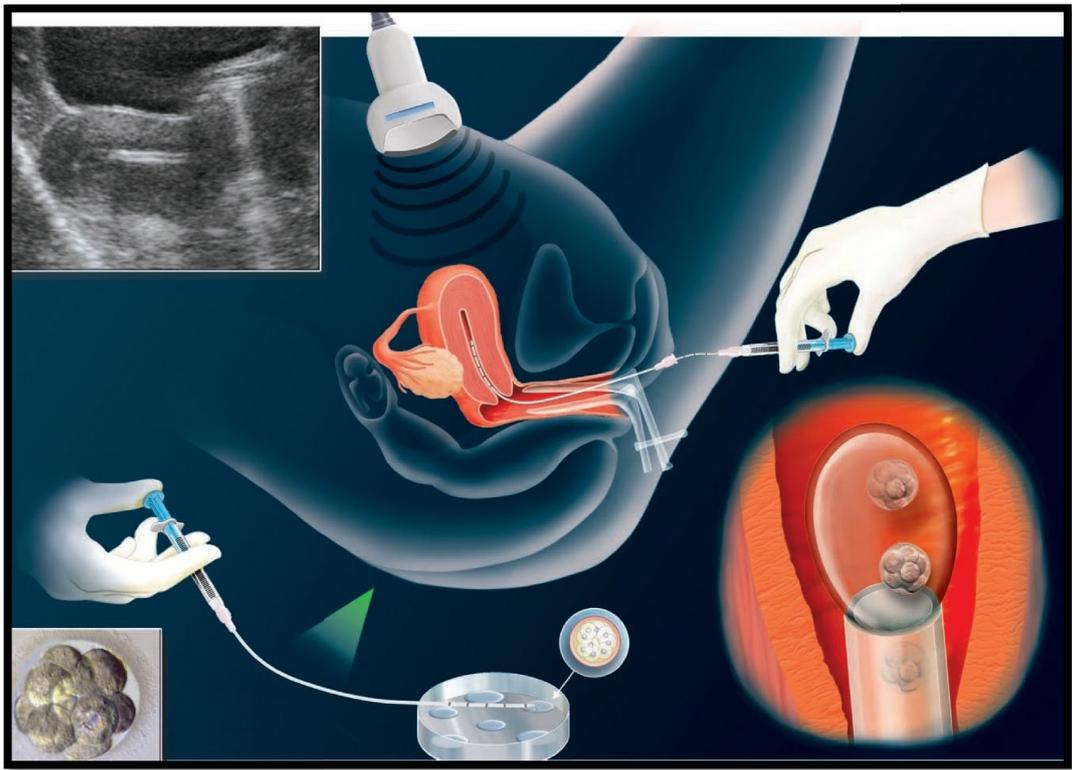
- **Fecundación:** En el caso de una FIV convencional la fecundación se realiza en la placa de cultivo donde se han situado los oocitos y los espermatozoides. En una ICSI, los espermatozoides son introducidos uno a uno en cada oocito. Tras 16-22 horas se visualiza la fecundación. La presencia de 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares nos indican una correcta fecundación.
- **Cultivo de embriones:** Los cigotos con una fecundación correcta van a ser cultivados hasta el día de la transferencia. Durante esos días se van a visualizar los embriones uno a uno (Figura 3) para anotar todas las características morfológicas relevantes (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011; ASEBIR, 2015).



**Figura 3. Evolución embrionaria desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto (Tomado de ASEBIR (2015). Cuadernos de embriología clínica 3ª edición).**

- **Selección de embriones:** Una vez se han obtenido todos los datos de cada embrión se procede a la clasificación mediante los criterios de ASEBIR más recientes, publicados en la tercera edición de los Cuadernos de Embriología Clínica (ASEBIR, 2015). Los embriones viables serán seleccionados para su transferencia o para su congelación. La ley española permite un máximo de 3 embriones por transferencia, además, no se permite la destrucción de embriones viables por lo que los embriones sobrantes serán siempre crioconservados (Ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida).

- **Transferencia de embriones:** la transferencia de embriones es un proceso sencillo y en la mayoría de los casos indoloro donde se depositan los embriones dentro del útero de la paciente mediante un catéter guiado por ecografía (Figura 4). Este procedimiento se puede realizar en el día 2, 3 o 5 de desarrollo.



**Figura 4. Transferencia de embriones ecoguiada en día 3 de desarrollo. (Tomado de Merck-Serono)**

## ÁREA DE CRIOCONSERVACIÓN

Como en el caso de nuestro proyecto, el área de crioconservación puede estar integrada dentro del laboratorio de embriología. La crioconservación tanto de gametos como de embriones, son procedimientos fundamentales para las TRA y por ello se engloban dentro de un área propia.

Actualmente, se impone la vitrificación como método de congelación debido a su alta tasa de supervivencia posdescongelación. Los protocolos de vitrificación y desvitrificación se describen en el Anexo II (Protocolos de Embriología).

La crioconservación de embriones se realiza cuando existen embriones sobrantes procedentes de un ciclo de fecundación in vitro o cuando por alguna razón médica no se ha podido realizar la transferencia y se tienen que congelar todos los embriones.

En el caso de los oocitos se realiza como parte de un tratamiento de preservación de la fertilidad, o en el caso de obtener oocitos de donante que no van a ser utilizados en fresco.

La crioconservación de semen es un proceso mucho más sencillo, se realiza cuando por alguna causa la muestra no puede usarse en fresco o para preservar la fertilidad cuando el paciente va a realizarse algún tratamiento médico que pudiera afectar a su fertilidad.

## **SOPORTE Y MANTENIMIENTO**

Existen numerosas tareas a realizar, además de las propias de laboratorio, que son vitales para su funcionamiento correcto.

Las tareas de mantenimiento externalizadas corresponden con: limpieza, mantenimiento general, mantenimiento específico de equipos, transporte y mantenimiento informático.

Como parte del trabajo diario hay muchas tareas de soporte que pueden ser realizadas por distintos miembros del equipo como son: atención al paciente, actualización de historias clínicas, registros de mantenimiento, actualización informatizada de registros, realización periódica de estadísticas, gestión de proveedores, solicitudes a proveedores externos y, especialmente importante, los controles de calidad.

## RECURSOS HUMANOS

### PERSONAL

El personal mínimo para el funcionamiento del laboratorio es de dos licenciados en Biología, Medicina, Farmacia, Química, Bioquímica, Veterinaria o graduado en ciencias biomédicas, especializados en Reproducción Humana Asistida (ASEBIR, 2008).

Uno de estos profesionales ocupará la posición de Responsable de Laboratorio y su formación incluirá un máster o doctorado y al menos 6 años de experiencia en laboratorios de reproducción asistida. En caso de no poseer un máster o doctorado, es necesario que el responsable de laboratorio acredite 10 años de experiencia. Se debe, además, mantener un registro completo de la formación y experiencia de todo el personal del laboratorio (UNE 179007:2013).

Cuando se realiza la documentación pertinente para la solicitud de puesta en funcionamiento de la URHA, es necesaria además una descripción detallada del personal que se va a hacer cargo de cada procedimiento y designar a un responsable del mismo.

El personal del laboratorio puede estar formado por: administrativos, técnicos de laboratorio, *trainees*, embriólogos clínicos y embriólogos senior. Por encima del embriólogo senior estarían los puestos de dirección. La jerarquía de un laboratorio depende del tamaño, del número de ciclos y del personal contratado, pudiendo existir varios responsables de área o responsables de labores concretas como controles de calidad o mantenimiento. A medida que el tamaño del laboratorio aumenta es importante organizar las tareas de forma que los embriólogos encargados de llevar a cabo el trabajo propiamente de laboratorio, manipulando gametos y embriones, sean liberados de otras tareas para conseguir un nivel de concentración máximo (Elder, K., & Dale, B., 2000).

También es necesario tener en cuenta que los *trainees* y cualquier personal en prácticas en el laboratorio, requiere de una atención constante por parte de un personal experimentado. Los periodos de prácticas para *trainees* oscilan entre 10 y 18 meses, por esta razón hay que considerar la necesidad de tener personal

suficiente cuando se requiere entrenar a un nuevo miembro del equipo de forma correcta.

Además, como parte de los programas de gestión de calidad es recomendable disponer de un plan de formación para nuevas incorporaciones (UNE 179007:2013).

En el caso del laboratorio de embriología, se debería ampliar los recursos humanos cuando sobrepase los 300 ciclos anuales, de forma que haya un embriólogo por cada 150 ciclos de fecundación in vitro. En el caso del laboratorio de andrología, es recomendable aumentar el personal cuando el número de muestras procesadas supera las 800 anuales (UNE 179007:2013).

La formación de los embriólogos clínicos tiene la particularidad de incluir una formación específica en el trato al paciente. Esta formación en la mayoría de los casos, consiste en observar a los profesionales con mayor experiencia, pero es muy recomendable apoyarse en los documentos elaborados por los grupos de estudio de psicología (SEF, 2008; SEF, 2009) que tiene la sociedad española de fertilidad (SEF). Estos conocimientos son, cada vez más, imprescindibles para poder proporcionar un trato de mayor calidad a los pacientes.

## RECURSOS FÍSICOS

El espacio físico disponible y su calidad, suele estar delimitado por las exigencias de cada situación, especialmente si la unidad va a integrarse dentro de un complejo preexistente. Además, es necesario diseñar el espacio en base a la cantidad de ciclos máxima que se espera realizar.

El centro requiere elaborar una documentación detallada de la infraestructura disponible en función de los servicios que van a ser prestados. Esta documentación incluye:

- El espacio de trabajo y a qué servicios van a ser destinados.
- Los equipos e instrumentos.
- Los servicios de apoyo.
- El material fungible con sus requisitos específicos.
- Los sistemas ambientales.
- Los sistemas de bioseguridad.

El espacio de trabajo fue diseñado en base al espacio disponible, cumpliendo en todo lo posible las normas descritas en la UNE 179007:2013.

Debido a la distribución preexistente, todas las áreas relacionadas con el laboratorio son áreas de acceso restringido.

Cuando el personal de laboratorio necesita dar información a los pacientes se utilizan siempre las consultas para garantizar la comodidad y confidencialidad necesarias.

Las muestras de semen se obtienen en un aseo exclusivo para este fin y así poder ofrecer, dentro de lo posible, un espacio íntimo para los pacientes.

El área de crioconservación está situada dentro del laboratorio de embriología por no existir espacio físico suficiente para tener un área propia. En cualquier caso, las condiciones de seguridad están garantizadas debido a que se sitúa en una zona de acceso restringido y los contenedores se encuentran bajo llave.

Las paredes, techos y suelos, tanto del laboratorio como del quirófano, cumplen los requisitos establecidos en la UNE 179007:2013.

## **Materiales de construcción**

Las pinturas utilizadas son de tipo acrílico con baja composición de elementos volátiles. Además, posteriormente a su aplicación se procede a ventilar el espacio durante varios días. La superficie resultante es lisa para facilitar su limpieza.

El material del suelo es de tipo linóleo, sin compuestos orgánicos volátiles (COVs). Además, los adhesivos utilizados para su montaje, contienen baja concentración de COVs. Además, las uniones de las paredes con el suelo son contornos redondeados para facilitar su limpieza.

Las superficies de los mesados donde van a situarse los equipos son de acero inoxidable.

## **Iluminación**

La iluminación la aportan tubos fluorescentes de intensidad regulable. Adicionalmente se coloca una mampara sellada para minimizar las longitudes de onda infrarroja y ultravioleta.

## **Energía eléctrica**

Es necesario que los equipos críticos como los incubadores donde se cultivan los embriones y los sistemas de micromanipulación, tengan un flujo constante de energía eléctrica incluso en caso de corte del suministro. Esto se consigue por medio de sistemas de generadores tipo SAI (Sistema de Alimentación Ininterrumpida) que proporcionan energía eléctrica durante al menos 24 horas a todo el centro en caso de corte de luz.

Un detalle importante durante la construcción del espacio es la situación de los enchufes. Debido a la gran cantidad de elementos que necesitan estar conectados a la red, es muy recomendable diseñar correctamente la disponibilidad de enchufes suficientes.

Por el mismo motivo, es necesario comprobar que el suministro de electricidad tiene una potencia adecuada a los equipos necesarios para el laboratorio.

## Calidad del aire

El aire de un laboratorio de reproducción asistida debe tener unos estándares de calidad muy elevados, equivalentes a grado A. El medio externo puede tener una calidad equivalente a grado D (directivas europeas 2004/23/EC y 2006/86/EC). Estos procesos pueden verse afectados por numerosos contaminantes y sustancias embriotóxicas.

Los compuestos volátiles orgánicos (COVs) son moléculas orgánicas embriotóxicas (aldehídos, formaldehidos, compuestos aromáticos...) que están presentes en el medio ambiente y especialmente en plásticos y gases. Estos tienden a acumularse en el interior del laboratorio produciendo un efecto embriotóxico (Morbeck D.E., 2015).

Para cumplir con estas directivas y con las indicaciones de la UNE 179007:2013, se incluyen los siguientes filtros en la línea de aire impulsado:

- Prefiltros (partículas  $\geq 10$  micras).
- Filtros finos (1-10 micras).
- Filtros HEPA que retienen al menos el 99,97% de las partículas  $\geq 0.3$  micras.
- Filtro de carbón activo y permanganato potásico

Estos filtros nos proporcionan una calidad de aire correspondiente con la clasificación ISO 5 para la zona del laboratorio de embriología.

La renovación del filtro de carbón activo y permanganato potásico es semestral, mientras que el del resto de los filtros es anual. Este mantenimiento se realiza por parte de la empresa encargada de la instalación y la climatización.

La impulsión de aire se produce con una presión positiva respecto a áreas circundantes produciendo una renovación del aire de al menos 15 veces/hora siguiendo las recomendaciones de la UNE 179007:2013.

La climatización del aire está controlada para que se mantenga una temperatura constante de entre 23-25°C para el funcionamiento correcto tanto de los procesos como de los equipos. El sistema de climatización es independiente de otras salas y recoge sólo aire proveniente del laboratorio para evitar contaminaciones cruzadas.

## EQUIPAMIENTO

- Incubador trigas G210 Invicell para cultivo de embriones. Este incubador trigas proporciona una presión controlada de oxígeno al 5% que nos permite un cultivo óptimo de los embriones (Figura 5).

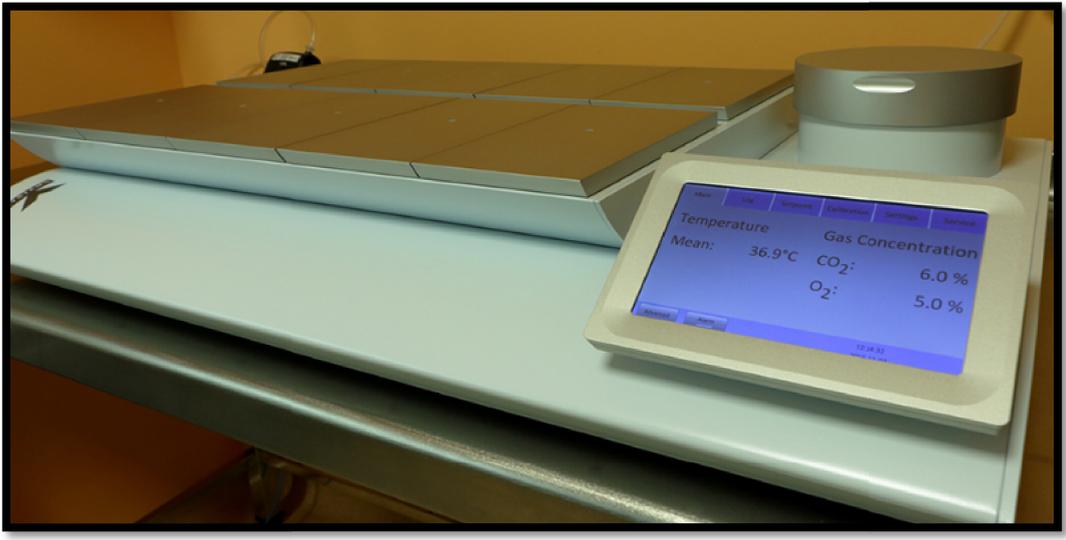


Figura 5. Incubador trigas G210 Invicell

- Incubador de trabajo de CO2 Labotech C-60 para la preparación del material necesario.
- Microscopio invertido Eclipse TiS con cámara de video y monitor (Figura 6).



Figura 6. Microscopio invertido Eclipse TiS y elementos de micromanipulación.

- Elementos de micromanipulación integrados en el microscopio (Figura 6).
- Estación de trabajo L-126DUAL con campana de flujo laminar que incluye dos esteromicroscopios y superficie calefactada (Figura 7).



**Figura 7. Estación de trabajo L-126DUAL.**

- Tres recipientes criogénicos para el almacén de embriones, oocitos y muestras de semen.
- Dos recipientes criobiológicos para nitrógeno líquido con toda la infraestructura necesaria para su disponibilidad diaria.
- Microscopio de contraste de fases Leica DM750.
- 3 Bloques de aluminio.
- Centrifuga Eppendorf 5702, 230V/50-60hz.
- Cámara Makler para recuento de espermatozoides.
- Contador de células hematopoyéticas.
- Pipetas automáticas 0.5-10 $\mu$ l (x2), 20-200 $\mu$ l (x2), 100-1000 $\mu$ l (x2).
- Baño térmico con control de temperatura.

- Sellador térmico de pajuelas para la congelación de semen.
- Frigorífico con congelador para el uso exclusivo del laboratorio.
- Equipos de monitorización y control de parámetros ambientales.
- Sistema generador de energía eléctrica SAI.
- Sonda de control de temperatura para medición de equipos críticos.
- Estación de gases situada fuera del laboratorio de embriología para suministro de los incubadores. Esta estación contiene:
  - 2 botellas de CO<sub>2</sub> para mantener el suministro de CO<sub>2</sub> ininterrumpido.
  - 1 botella de N<sub>2</sub> que proporciona suministro al incubador trigas.

## **MATERIAL FUNGIBLE**

El material fungible seleccionado cumple todos los requisitos necesarios para su utilización en TRA. Siempre que hay disponibilidad es conveniente seleccionar material que sea no sólo adecuado para el cultivo celular sino que además haya sido testado para embriones (embriotestado).

El material fungible puede ir modificándose a lo largo del tiempo debido al amplio número de casas comerciales que proporcionan estos productos.

Los seleccionados inicialmente se mencionan a continuación:

- Agujas para punción ovárica Labotech ref. 14119.
- Catéter rígido 23 cm ref. 1816NST.
- Catéter de ensayo 23 cm ref. TT1816N.
- Catéter ecogénico 23 cm ref. CE123.
- Catéteres de inseminación artificial ref. 4219.
- Tubos falcon 15 mL ref. 2095.

- Tubos falcon 50 mL ref. 2070.
- Placa Petri 100 mm ref. 1029.
- Placa Petri 35 mm NUNC embriotestada.
- Placas de doble pocillo ref. 3653.
- Placas de 4 pocillos NUNC ref. 144444.
- Pajuelas de congelación de muestras de semen ref. 014650.
- Pipeta Pasteur vidrio 9" ref. PP-9-90.
- Pipeta Pasteur vidrio 5,75" ref. PP-5.75.
- Envase estéril para la recogida de semen: presentado en bolsas individuales.
- Pipetas Pasteur de plástico en envase individual.
- Tiras medidores de pH de rango 6.0-10.0.
- Láminas portaobjetos.
- Láminas cubreobjetos 22x22mm.
- Capilares Stripper de 135 uM ref. 7-72-2135/5.
- Capilares Stripper de 200 uM ref. 7-72-2200/5.
- Pipeta de Microinyección ref. LISR (TIP-30).
- Pipeta de Holding ref. LHS.
- Pajuelas de vitrificación KITAZATO.

## MEDIOS

Los medios de cultivo tienden a modificarse menos a pesar de que también existen diversas opciones. La utilización de unos u otros medios de cultivo depende de distintos aspectos, principalmente influenciados por la experiencia previa o por las experiencias de compañeros consultados.

Los factores a tener en cuenta cuando se selecciona un medio de cultivo son: el marcado CE, el procedimiento a seguir de los proveedores, la fiabilidad de los plazos de entrega, los plazos respecto a la fecha de caducidad con los que los proveedores nos entregan los medios, las condiciones controladas del transporte, la disponibilidad de envíos durante los periodos vacacionales, los ensayos a los que han sido sometidos, la información disponible sobre su composición, el control de calidad al que ha sido sometido y los test de endotoxinas.

Dentro de que todos los medios disponibles tienen una alta calidad, la valoración de la eficacia de unos frente a otros, resulta muy complicada cuando no se dispone de un número elevado de ciclos por lo que es conveniente estar actualizados en lo publicado en la literatura y las experiencias de otros compañeros.

Los medios utilizados inicialmente fueron los siguientes:

- OVOIL. Vitrolife ref.10029.
- GAMETE. Vitrolife.
- IVF – PLUS. Vitrolife ref. 10136.
- PVP ICSI. Vitrolife ref. 10111.
- HYASE 10x. Vitrolife ref. 10017.
- ASP Vitrolife ref. 10100.
- CONTINUOUS SINGLE CULTURE. Irvine Scientific ref.90164.
- Halosperm DNA fragmentation kit ref. HT-HS10.
- MACS GMP Annexin V kit ref. 170-076-126.
- Medio de vitrificación cooling ref. 12284001<sup>a</sup>.

- Medio de vitrificación warming ref. 12295002<sup>a</sup>.
- Medio de congelación de muestras de semen ref. ET-H155 Sperm Cryoprotec II Nidacon.

## **PRODUCTOS DE LIMPIEZA**

Los productos de limpieza utilizados deberán ser productos exclusivamente fabricados para laboratorios de reproducción asistida para así poder tener la seguridad de que ninguno de ellos está afectando negativamente a los procesos realizados en el laboratorio. Los productos seleccionados fueron:

- Oosafe Laboratory Surface Disinfectant 2lt.
- Oosafe CO<sub>2</sub> Incubators and Laminar Flow Hoods Disinfectant 1lt.
- Oosafe Hands Disinfectant with pump. 500ml.

## CALIDAD EN EL ENTORNO DE UNA URHA

La OMS define la calidad en la atención sanitaria como la ejecución apropiada de intervenciones de probada seguridad, que son económicamente accesibles a la población en cuestión y que pueden producir un impacto positivo.

Debido a que los sistemas de calidad provienen del entorno industrial se identifica al paciente como usuario o cliente de las TRA.

Dentro de un sistema de gestión de calidad, es de gran importancia el desarrollo de los procesos. Un proceso es el conjunto de actividades mutuamente relacionadas que transforman elementos de entrada en resultados. Lo que para un proceso es su producto o resultado, otro proceso lo toma como recurso propio para convertirlo en un nuevo resultado. Transforma elementos de entrada en elementos de salida. En una URHA un proceso se incluye dentro de una de estas áreas:

- **Análisis:** evaluación de parámetros seminales, calidad oocitaria y calidad de los embriones.
- **Procesamiento de células y tejidos:** manipulación y procesamiento de gametos y embriones para su utilización en las diferentes técnicas de RHA.
- **Crioconservación:** Congelación de semen, oocitos y embriones para su futura utilización en técnicas de RHA.

Cada proceso está compuesto por procedimientos operativos que pueden corresponder con actividades técnicas con 3 fases (técnica, pretécnica y posttécnica), actividades de soporte (estructura) y de resultados (ASEBIR, 2016).

El conjunto de todos los procesos se denomina sistema, y dentro de un laboratorio de reproducción asistida el sistema sería un ciclo de TRA.

Un procedimiento es una forma específica de llevar a cabo un proceso, es decir, define la secuencia de pasos para ejecutar una tarea.

La elaboración de la norma UNE 179007: "Sistemas de gestión de calidad para Laboratorios de Reproducción Asistida" surge para describir los requisitos específicos necesarios en un laboratorio de reproducción asistida ampliando los requisitos de la Norma ISO 9001.

Hay dos aspectos importantes de la calidad que es conveniente definir:

- Gestión de calidad: Cooperación sistemática de toda la organización en interés de la calidad del servicio para beneficio de todos los involucrados. Es una cuestión interna de cada organización.
- Garantía de calidad: Evaluación externa basada en acuerdos. Conjunto de actividades que se llevan a cabo para fijar normas, vigilar y mejorar el desempeño de tal manera que la atención prestada sea lo más eficaz y segura posible, repercutiendo al igual que la Gestión de Calidad en el servicio prestado (ASEBIR 2016).

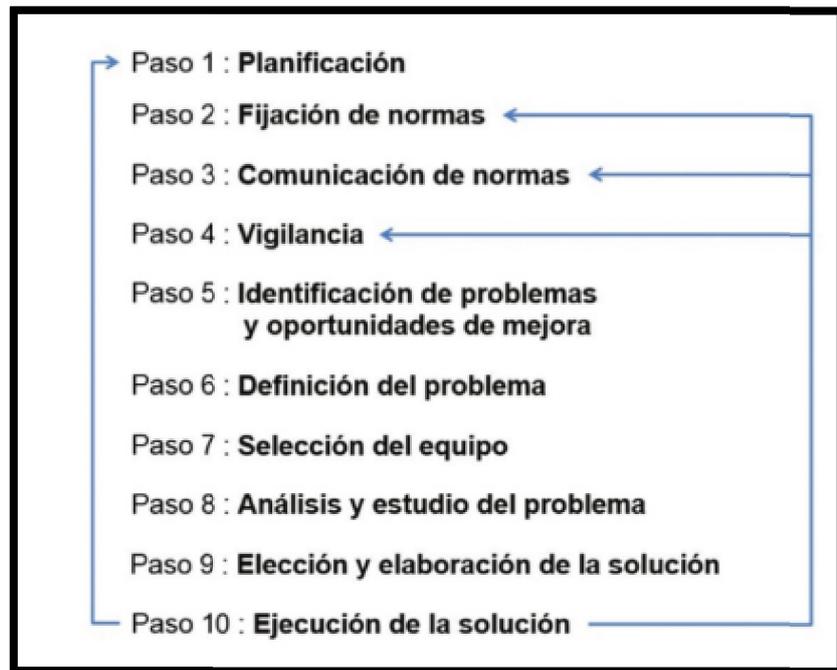
La garantía de la calidad tiene tres componentes básicos:

- Diseño de calidad: planear y desarrollar el proceso.
- Control de calidad: Seguimiento, supervisión y evaluación para asegurar que todo el personal y unidades implicadas alcancen los estándares necesarios para ofrecer una buena calidad.
- Mejora de la calidad: Incremento de la calidad, resolución continua de problemas y mejora de procesos.

Dentro de una URHA es fundamental tanto la gestión de la calidad como la garantía de calidad porque nos va a permitir alcanzar la máxima calidad posible en los tratamientos realizados y en la satisfacción tanto de los pacientes, como del personal de la unidad. Además, debido a la mejora continua podemos garantizar que en cada etapa de la unidad se mantiene el nivel de calidad adecuado.

La elaboración de protocolos en términos de procedimientos es fundamental para que la coordinación de la unidad sea óptima. Para ello, primero es necesario planificar todo un sistema de garantía de calidad (Figura 8), fijar las normas y los objetivos, comunicar esas normas y comprobar que todo el personal esté de acuerdo con ellas.

Una vez elaborado e implantado es necesario realizar un seguimiento o vigilancia en forma de recolección de datos que nos permita comprobar que se están cumpliendo las normas establecidas. Esto se consigue definiendo indicadores de calidad que sean medibles para cada proceso.



**Figura 8. Pasos a seguir para elaborar un sistema de Garantía de Calidad.**

Un indicador de calidad es un instrumento de medida, cuantitativo o cualitativo, que refleja la cantidad de calidad que posee un proceso cualquiera. Los indicadores deben ser: relevantes, concretos, objetivos, válidos, sensibles, específicos y eficientes. (ASEBIR, 2016).

Las especificaciones de calidad corresponden con los estándares de calidad u objetivos de calidad, y reflejan el nivel deseado de cumplimiento para cada indicador. El objetivo de las especificaciones de calidad es asegurar que todos los métodos, equipos y servicios funcionan adecuadamente. Así, seleccionando los indicadores correctos podremos valorar con exactitud el nivel de calidad en el que se encuentra nuestro laboratorio.

Los indicadores de calidad se pueden evaluar de distintas maneras, en el caso de las TRA pueden evaluarse en base al estado del arte o en base a las recomendaciones publicadas por grupos de profesionales.

Los indicadores seleccionados en nuestro caso son los marcados por las directrices recientemente publicadas por ASEBIR en el cuaderno de Indicadores de calidad del laboratorio de embriología: definición y especificaciones (Anexo VII).

## GESTIÓN DE DATOS

La gestión de los datos conlleva unas normas de obligado cumplimiento por parte de todo el personal de la unidad:

- Garantía de confidencialidad cumpliendo la normativa vigente: la confidencialidad de los datos debe ser una prioridad máxima en todo momento y debe ser tenida en cuenta en el momento de diseñar todos los documentos de registro y toma de datos.
- Trazabilidad de los datos: Los protocolos de trabajo facilitan enormemente la trazabilidad de los datos. En los protocolos se determina claramente quién debe recoger la información, dónde debe recogerla y de qué forma realizarlo.
- La identificación y validación de los datos es uno de los puntos principales de todo procedimiento. Está descrito con detalle en los protocolos de trabajo con la finalidad de que en ningún momento quede una muestra sin identificar y que no se produzcan errores en la identificación, actualmente el método para evitar los errores son los puntos de control continuos a lo largo de todo el sistema. En el caso de los donantes se utiliza un sistema de codificación único descrito en los protocolos clínicos.
- Los datos referentes al mantenimiento (medios de cultivo, mediciones ambientales y de equipos, control de calidad...etc. Deben ser almacenados durante al menos dos años. En nuestro caso además del registro manual existe un registro informático de forma que se mantiene en el tiempo y no son destruidos.
- Los datos referentes a donantes deben ser almacenados durante un mínimo de 30 años para cubrir todas las posibles complicaciones que pudieran aparecer a lo largo del tiempo.
- Los datos de la unidad desde la apertura, así como los resultados serán compartidos para el registro nacional realizado por la Sociedad Española de Fertilidad cuando sean requeridos.

## ÉTICA E INVESTIGACIÓN

El aspecto ético de la práctica clínica es importante tanto en la práctica diaria como en los casos en los que se realicen proyectos de investigación. Existen guías de consulta disponibles como el Código Ético de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF, 2012) o el Manual de buena práctica clínica en reproducción asistida (SEF, 2016)

La unidad tiene un comité ético compuesto por parte de los profesionales que trabajan en la unidad así como un comité científico formado por profesionales externos para el asesoramiento en caso de que fuera necesario.

La función del comité ético es asegurar que se cumplen los códigos deontológicos de las sociedades científicas y colegios profesionales.

## SEGURIDAD Y RIESGOS LABORALES

Todos los procesos del laboratorio son realizados en condiciones asépticas para garantizar tanto la seguridad de los pacientes como del personal que realiza los procedimientos (Mortimer, D., & Mortimer, S. T., 2005).

Existe un manual de normas de seguridad en el laboratorio, estas normas son de obligado cumplimiento y contiene los siguientes puntos fundamentales:

- Uso de ropa y calzado específico para el trabajo en el interior del laboratorio que incluye pijama, zuecos, mascarilla y gorro. Además, para acceder al laboratorio de embriología es necesario realizar un cambio adicional de zuecos. Fuera del laboratorio es necesario llevar bata.
- Hay que realizar un lavado exhaustivo de manos al entrar y salir del laboratorio como mínimo. Además, se realizarán los lavados de manos pertinentes especificados en los protocolos de trabajo.
- Todas las limpiezas han de realizarse con guantes estériles quirúrgicos para asegurar la máxima asepsia.
- No se permite el uso de cosméticos, ni perfumes. Tampoco se pueden usar productos de higiene personal que contengan olores fuertes.

- No se permite almacenar ningún tipo de comida, bebida o medicamentos en el interior del laboratorio.
- Todo el material biológico se manipula como si se tratara de material infeccioso aunque los pacientes tengan las serologías actualizadas. Además es conveniente que el personal sea vacunado de la Hepatitis B.
- Todo el material utilizado debe ser estéril, ya haya sido esterilizado de fábrica o en el centro. Inmediatamente después de su uso el material será desechado utilizando los contenedores correspondientes.
- El uso de jeringuillas debe realizarse con extrema precaución, y nunca volver a colocar la tapa de la aguja. Las jeringas y agujas utilizadas se desechan inmediatamente en los contenedores correspondientes.
- Las muestras se manejan de forma individual. Nunca se tiene sobre la mesa de trabajo más de un paciente. De esta forma minimizamos la posibilidad de errores.
- Extremar la precaución en la manipulación de nitrógeno líquido utilizando todos los elementos disponibles para ello. En caso de un derrame de nitrógeno abandonar la sala inmediatamente ya que el nitrógeno puede desplazar el oxígeno y provocar un desmayo.
- En caso de cualquier emergencia mantener la calma, seguir las instrucciones recibidas y avisar lo antes posible al responsable de laboratorio.

## LEGISLACIÓN

La legislación española se fundamenta en la Ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida.

Esta ley, enmarcada en el ámbito europeo, tiene unas características particulares que facilitan el trabajo de las clínicas de reproducción asistida españolas:

- Se define por primera vez el concepto de preembrión, entendido por tal al embrión in vitro constituido por el grupo de células resultantes de la división progresiva del ovocito desde que es fecundado hasta 14 días más tarde.

- Se crea el Registro de donantes de gametos y preembriones con fines de reproducción humana, y el Registro de actividad de los centros de reproducción asistida. Ambos todavía sin implantar.
- Se autoriza la transferencia de un máximo de 3 embriones.
- Garantiza la confidencialidad en la donación de gametos y embriones.
- Se limita el número de hijos nacidos por donante a 6.
- Toda mujer mayor de 18 años puede someterse a un tratamiento de reproducción asistida independientemente de su estado civil y orientación sexual.
- Los preembriones sobrantes deben ser congelados, pero se les asigna cuatro destinos.
  - a) Su utilización por la propia mujer o su cónyuge.
  - b) La donación con fines reproductivos.
  - c) La donación con fines de investigación.
  - d) El cese de su conservación sin otra utilización. En el caso de los preembriones y los ovocitos crioconservados, esta última opción sólo será aplicable una vez finalizado el plazo máximo de conservación establecido en esta Ley sin que se haya optado por alguno de los destinos mencionados en los apartados anteriores.
- Se permite la investigación con gametos y embriones humanos en condiciones muy específicas.

Como parte de sociedades científicas como ASEBIR, disponemos de una consultoría legal para casos que puedan presentar alguna duda o complejidad

Además, existen trabajos como el elaborado por SEF y ASEBIR (Recomendaciones para la aplicación del RD 1301/2006, 2012), que pueden servir como documentos de consulta para la aplicación correcta de la legislación.

## **DOCUMENTOS DE LA LEGISLACIÓN ESPAÑOLA**

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida.

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, Básica Reguladora de la Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones en Materia de Información y Documentación Clínica.

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

Real Decreto 906/2007, de 6 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 415/1997, de 21 de marzo, por el que se crea la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. BOE.

Real Decreto 2132/2004, de 29 de octubre, por el que se establecen los requisitos y procedimientos para solicitar el desarrollo de proyectos de investigación con células troncales obtenidas de preembriones sobrantes.

Real Decreto 1277/2003, de 10 de octubre, por el que se establecen las bases generales sobre autorización de centros, servicios y establecimientos sanitarios.

Real Decreto 412/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen los Protocolos de Estudio Donantes de Gametos y Usuarios de Técnicas de Reproducción Asistida.

## **DOCUMENTOS DE LA LEGISLACIÓN EUROPEA**

DIRECTIVE 2004/23/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells

COMMISSION DIRECTIVE 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells.

COMMISSION DIRECTIVE 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells

## COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

El montaje de un laboratorio de reproducción asistida resulta una tarea compleja que abarca a la vez muchos aspectos interconectados.

Existen diversos manuales en los que apoyarse para lograr el buen desarrollo de un proyecto pero cuando es necesario adaptar todos los requerimientos a un espacio concreto, con un presupuesto concreto y en un tiempo determinado el desarrollo del proyecto se complica.

El tiempo nunca debería ser un factor limitante ya que cualquier error cometido durante la planificación por falta de tiempo, puede llevarnos finalmente a tener que detener el proyecto para subsanar ese error gastando más tiempo y más recursos de los necesarios.

Las limitaciones de espacio sí pueden llegar a ser determinantes pero es conveniente fijar los puntos del proyecto que no pueden ser alterados, ya que modificarían la calidad de la asistencia, de los que podemos quizá modificar sin que el resultado se vea alterado, como por ejemplo la comodidad en el almacén o en los despachos.

Uno de esos puntos fundamentales son las condiciones ambientales, un buen diseño de partida nos evita tener que realizar modificaciones y obras posteriores que paralizan por completo la actividad.

Otro de los puntos fundamentales es la selección del equipamiento. La fiabilidad de los equipos con los que trabajamos a diario es una parte muy importante del desarrollo de los procesos. Además, es necesario seleccionar los equipos en base al número de ciclos que se prevé realizar.

La aplicación de normas como la UNE 179007:2013, específica para los laboratorios de reproducción asistida, aumentan la calidad asistencial de forma exponencial y son una referencia fundamental a la hora de realizar un nuevo proyecto.

La realización de un proyecto dentro de un sistema de mejora continua, es la única forma de asegurar la mejor calidad asistencial para nuestros pacientes y el mejor entorno de trabajo para el personal.

Como proyectos futuros se encuentran la implementación del equipamiento con un incubador con cámara y sistema de Time-Lapse, que nos proporcione una mayor información sobre la evolución de los embriones, y la realización de proyectos de investigación.

Es reseñable el trabajo de las sociedades científicas tanto españolas como SEF (Sociedad Española de Fertilidad) y ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción), como europeas: ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) y ALPHA Scientist in Reproductive Medicine. Estas sociedades realizan un amplísimo trabajo de estudio y publicaciones que repercuten en beneficio de todos los profesionales dedicados a la reproducción asistida.

Este trabajo ha sido realizado utilizando como base las referencias bibliográficas presentadas y la experiencia profesional, pero sin duda las recomendaciones y consejos prestados por los embriólogos pertenecientes a otros centros, ha sido fundamental para el éxito del proyecto y de los resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. HumReprod 2011; 26: 1270-1283.

ASEBIR (2016) Indicadores de calidad del laboratorio de embriología: definición y especificaciones. Madrid: Góballo.

ASEBIR (2015). Cuadernos de embriología clínica III. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 3ª ed. Madrid: Góballo.

ASEBIR (2008). Cuaderno de Embriología Clínica: Recomendaciones sobre Recursos Humanos y Físicos para el Laboratorio de Reproducción. Madrid: Góballo.

Björndahl, L. (2010). A practical guide to basic laboratory andrology. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Brassesco, M. (2011). Manual de andrología. Barcelona: EdikaMed.Sociedad Española de Fertilidad (SEF)

Elder, K., & Dale, B. (2000). In vitro fertilization. Cambridge: Cambridge University Press.

Elder, K., Ribes, J., & Baker, D. (2004). Infections, infertility, and assisted reproduction. New York: Cambridge.

Gardner, D. K. (2004). Textbook of assisted reproductive techniques laboratory and clinical perspectives. London: Taylor & Francis.

Grupo de Ética y Buena Práctica Clínica. Sociedad Española de Fertilidad (2012). Código ético de la SEF. Madrid: Imago Concept & Image Development, S.L.

Grupo de Interés de Ética y Buena Práctica de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (2016). Manual de buena práctica clínica en reproducción asistida.

Grupo de Interés de Psicología. Sociedad Española de Fertilidad (2008). Importancia de los aspectos emocionales en los tratamientos de reproducción asistida. Madrid: Imago Concept & Image Development, S.L.

Grupo de Interés de Psicología. Sociedad Española de Fertilidad (2009). Habilidades de comunicación en reproducción asistida. Sociedad Española de Fertilidad (SEF) <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/libros/habilidadesRA.pdf>

Morbeck, D. E. (2015). Air quality in the assisted reproduction laboratory: A mini-review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics J Assist Reprod Genet*, 32(7), 1019-1024. doi:10.1007/s10815-015-0535-x

Mortimer, D., & Mortimer, S. T. (2005). *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Cambridge: Cambridge University Press.

ESHRE (2016). Revised guidelines for good practice in IVF laboratories 2015. *Human Reproduction Hum. Reprod.*, 31(4), 685-686.

SEF; ASEBIR (2012). *Recomendaciones para la aplicación del RD 1301/2006*. Madrid: Góballo.

SEF (2012). *Saber más sobre fertilidad y reproducción asistida*. Madrid: MSH Impresores.

UNE 179007:2013. *Servicios sanitarios. Sistemas de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción asistida*.

ISO 9001:2015. *Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos (ISO 9001:2015)*.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (2010). Geneva: World Health Organization.

## **ANEXOS TRABAJO FIN DE MÁSTER**

EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ORGANIZACIÓN, EQUIPAMIENTO Y PARÁMETROS DE CALIDAD.

ASSISTED REPRODUCTION LABORATORY: ORGANIZATION, EQUIPMENT AND QUALITY PARAMETERS.

O LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ORGANIZACIÓN, EQUIPOS E PARÁMETROS DE CALIDADE.

- ANEXO I.** PROTOCOLOS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA.
- ANEXO II.** PROTOCOLOS DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA.
- ANEXO III.** PLANTILLAS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA.
- ANEXO IV.** PLANTILLAS DE LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA.
- ANEXO V.** HOJAS DE REGISTRO DE ACTIVIDAD.
- ANEXO VI.** HOJAS DE REGISTRO DE MANTENIMIENTO.
- ANEXO VII.** INDICADORES DE CALIDAD.

ANEXO I

## PROTOSCOLOS DE ANDROLOGÍA

Protocolos del Laboratorio de Andrología.

Actualizado Enero  
de 2016

### ÍNDICE

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| 1. SEMINOGRAMA Y CAPACITACIÓN | PÁG.2  |
| 2. CONGELACIÓN DE SEMEN       | PÁG.9  |
| 3. BIOPSIA TESTICULAR         | PÁG.11 |
| 4. EYACULACIÓN RETRÓGRADA     | PÁG.13 |
| 5. FRAGMENTACIÓN DE ADN       | PÁG.14 |
| 6. MACS                       | PÁG.17 |

## SEMINOGRAMA

La realización de un seminograma puede ir asociado o no a la utilización de la muestra para una técnica de reproducción asistida (TRA). Tanto para diagnóstico, como para su utilización en otras técnicas se realizará un análisis de los parámetros principales de un seminograma por lo que el estudio realizado pasará a denominarse: Análisis seminal para TRA.

### 1. Preparación previa:

Las muestras necesitan ser procesadas en un medio de cultivo atemperado, por lo que en el protocolo de preparación de laboratorio se incluye un tubo de medio IVF que se pondrá en el incubador de trabajo el día anterior a la preparación del seminograma.

### 2. Recogida:

Antes de proceder a la obtención de la muestra el paciente debe leer y rellenar la hoja de recogida que se incluye en el Anexo III (Plantillas del Laboratorio de Andrología). Después de obtener la muestra debe completar todas las preguntas del cuestionario.

El bote de recogida de muestra será entregado junto con una pegatina en la que el paciente debe anotar su nombre completo y la fecha.

Posteriormente deberá comprobarse que el nombre es claramente legible, que ha contestado el cuestionario por completo y que está firmado.

Cuando el paciente obtiene la muestra fuera del centro es necesario que previamente haya recibido tanto la hoja de recogida donde están las instrucciones de recogida, como el bote con la pegatina. La hoja debe ser revisada para comprobar que esté perfectamente cumplimentada una vez se recibe la muestra.

La muestra seminal se obtiene por masturbación y será siempre recogida en un bote estéril de dimensiones adecuadas para facilitar la obtención.

Una vez obtenida la muestra el personal encargado de recogerla hará las comprobaciones necesarias y dejará la muestra en el baño térmico del laboratorio de andrología junto con la hoja de recogida.

### 3. Evaluación de la muestra:

El envase está situado sobre un baño térmico que se encuentra a una temperatura de 37° hasta la preparación. Una vez anotados los datos necesarios, la hoja de recogida será archivada en el registro correspondiente.

La muestra se prepara lo antes posible una vez se ha producido la licuefacción, un mínimo de 15 minutos después de la recogida y nunca por encima de una hora.

Se pasa la muestra completa a un tubo Falcon de 15ml previamente rotulado con el nombre completo, fecha y procedimiento a realizar y se realiza primero la evaluación inicial macroscópica y posteriormente la evaluación inicial microscópica anotando todos los valores en la hoja correspondiente:

Evaluación inicial macroscópica:

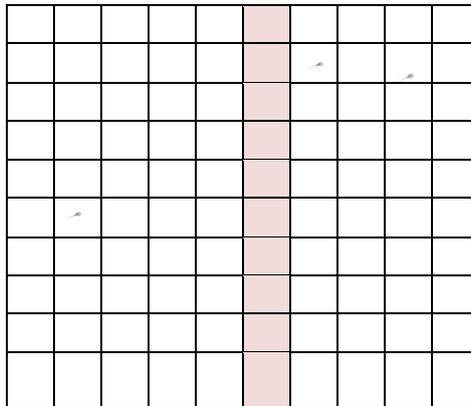
- Licuefacción: el grado de licuefacción se analiza mediante observación visual y se anota como completa o incompleta. Pueden encontrarse grumos, hilos de moco y masas gelatinosas que pueden dificultar el análisis. Se considera anormal una muestra que no se ha licuado pasados 60 minutos, en ese caso se puede intentar diluir la muestra o pasarla por una aguja con un calibre 18-19.
- Viscosidad: Determinación visual. Se considera una viscosidad anormal cuando al dejar caer la muestra gota a gota con una pipeta pasteur aparece un filamento de más de 2cm. La viscosidad elevada puede afectar la determinación de todos los factores a estudiar en la muestra por lo que las muestras serán tratadas de la misma forma que en el caso de las muestras no licuadas.
- pH: para determinar el pH se utilizan tiras reactivas de pH 6.0-10. Hay que comprobar la tira antes de 30 segundos.

### **El límite inferior de referencia es 7,2**

- Apariencia: Se observa visualmente. La apariencia de una muestra normal es: homogénea y gris opalescente. Se pueden encontrar distintos colores que podrían ser sintomáticos de alguna patología y por tanto deben ser anotados:
  - o Traslúcido: podría indicar una baja concentración de espermatozoides.
  - o Marrón pardo: presencia de sangrado en el tracto genital en las horas o días previos.
  - o Rojizo: presencia de hematíes que indican un sangrado en el momento de la obtención de la muestra.
  - o Amarillento: puede ser indicativo de ictericia, presencia de ciertas vitaminas o una elevada abstinencia (altos niveles de flavonoides oxidados procedentes de las vesículas seminales).
- Volumen: Se mide con una pipeta pasteur de plástico.

Evaluación inicial microscópica:

- La evaluación microscópica se realiza en un microscopio de contraste de fases anotando todos los datos en la hoja correspondiente.
- Antes de empezar es necesario homogeneizar bien la muestra para su correcta visualización.
- Primero se realiza una observación a 100x para evaluar la presencia de:
  - Agregaciones: adherencia de espermatozoides móviles o inmóviles a células no espermáticas o detritos sin significancia clínica. No son específicas.
  - Aglutinaciones: espermatozoides móviles unidos a otros espermatozoides móviles. Sí son específicas por lo que podrían tener significancia clínica. Se anotará en caso de que sea elevada (>50 spz unidos) o muy elevada (todos los spz aglutinados).
  - Células no espermáticas: su identificación puede tener relevancia clínica por lo que es necesario anotar la presencia de estas células



cuando resulta significativa. Se dividen en:

- Células epiteliales
  - Células redondas: células germinales inmaduras y leucocitos.
- VITALIDAD: Se determina mediante tinción con eosina en una preparación seminal en un portaobjetos con 5µl de eosina preparada para la tinción y 5µl de muestra, mezclando y tapando con el cubreobjetos.  
**El límite inferior de referencia para la vitalidad es del 58%.**
- CONCENTRACIÓN: Posteriormente se pone una gota de 10µl muestra en una cámara Makler para medir la concentración mediante el conteo de al menos dos filas de la cuadrícula situada en el centro de la cámara. El número de espermatozoides de una fila corresponde con los millones de espermatozoides de la muestra por mililitro:

**El límite inferior de referencia para la concentración es de 15 mill/ml**

- MOVILIDAD: En primer lugar se hace una preparación de la muestra de semen en un portaobjetos colocando una gota de 10µl y un cubreobjetos de 22x22 a 400 aumentos (objetivo de 40x).

La movilidad se determina con un contador de células hematopoyéticas contando entre 100 y 200 espermatozoides en varios campos de la muestra.

Siguiendo el Manual de la OMS 2010 se anotan los datos de movilidad diferenciando entre:

- o Espermatozoides inmóviles (IM): Espermatozoides que no se mueven
- o Espermatozoides con movilidad progresiva (PR): Espermatozoides que se desplazan. Engloba a los espermatozoides de movilidad A+B de los anteriores manuales de la OMS.
- o Espermatozoides con movilidad no progresiva (NPR): Espermatozoides que se mueven pero no avanzan.

**El límite inferior de referencia para la movilidad total se sitúa en el 40% y para la movilidad progresiva es un 32%**

- MORFOLOGÍA: La morfología también se observa a 400 aumentos (objetivo de 40x), contando un número entre 100 y 200 espermatozoides y determinando el porcentaje de espermatozoides sin alteraciones encontrados con un contador de células hematopoyéticas.

**El límite inferior de referencia para la morfología es del 4%**

<b>PRINCIPALES PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS DEL SEMINOGRAMA</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Límites inferiores de referencia OMS 2010</b>
<b>Volumen (ml)</b>	1.5
<b>Concentración (mill/ml)</b>	15
<b>Número spz (mill/eyaculado)</b>	39
<b>Motilidad (% spz móviles)</b>	40 (a+b+c)
<b>Movilidad progresiva</b>	32 (a+b)
<b>Morfología (% spz normales)</b>	4
<b>Vitalidad (% spz vivos)</b>	58
<b>Leucocitos (mill/ml)</b>	<1.0

**4. Diagnóstico:**

- a. Aspermia: ausencia de semen. Valorar la posibilidad de eyaculación retrógrada.
- b. Astenozoospermia: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite de referencia.
- c. Azoospermia: No aparece ningún espermatozoide en el eyaculado ni en la muestra procesada y resuspendida. Puede ser de dos tipos: secretora o excretora. En cualquiera de los casos la indicación es realizar una biopsia de testículo. En los casos en los que el volumen seminal es muy bajo hay que valorar la posibilidad de que exista una eyaculación retrógrada.
- d. Criptozoospermia: No se observan espermatozoides en el eyaculado pero sí en la muestra resuspendida por lo que la concentración de espermatozoides es muy baja.
- e. Hemospermia: presencia de eritrocitos en el eyaculado.
- f. Leucospermia: presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del valor umbral.
- g. Necrozoospermia: Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
- h. Normozoospermia: número total de espermatozoides (o concentración), porcentaje de espermatozoides móviles y espermatozoides con morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia.
- i. Oligozoospermia: número total de espermatozoides (o concentración) por debajo del límite de referencia.
- j. Teratozoospermia: porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite de referencia.

También podemos encontrar distintas combinaciones dependiendo de la patología observada:

- Astenoteratozoospermia
- Oligoastenozoospermia
- Oligoteratozoospermia
- Oligoastenoteratozoospermia

### **5. Capacitación espermática y REM (recuento de espermatozoides móviles):**

La capacitación espermática es la preparación del semen para ser utilizado en las distintas TRA. Tiene como objetivo seleccionar los espermatozoides de mejor movilidad en un medio de cultivo. Puede realizarse mediante Swin Up (Anexo I. Protocolos de Andrología) como por gradientes de concentración (WHO, 2012).

El REM es el recuento de espermatozoides móviles que se realiza sobre la muestra capacitada.

Procedimiento:

- a. Poner 1 ml de muestra en un tubo Falcon previamente rotulado para realizar el análisis. En muestras frescas se diluye con medio IVF en una proporción 1:1, y en muestras congeladas se diluye en una proporción 2:1 (IVF:Muestra) para eliminar con mayor seguridad la presencia del crioprotector.
- b. Se mezcla todo en el tubo Falcon con una pipeta pasteur de plástico comprobando que la muestra queda completamente homogeneizada.
- c. Centrifugar la muestra 10 minutos a 1.200 rpm.
- d. Retirar el sobrenadante con una pipeta pasteur de cristal.
- e. Se añade una cantidad determinada de medio IVF dejándolo caer por la pared del tubo cuidadosamente. El volumen de medio que se añade varía en función del objetivo de la capacitación:
  - Valoración del REM para seminograma e inseminación artificial: Se añade 350 µl de IVF.
  - Fecundación in vitro (FIV) o microinyección espermática (ICSI): Se añade una cantidad variable entre 150µl y 350µl dependiendo de la concentración de la muestra en fresco.
- f. Se deja la muestra durante un tiempo mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente sobre el baño térmico para que los espermatozoides móviles puedan migrar hacia la fase de medio IVF.
- g. Después del periodo de incubación se recoge el sobrenadante, donde se sitúan los espermatozoides móviles, que se visualiza como una fase intermedia de color blanquecino cuando hay bastante concentración. En caso de no visualizarse una nube de espermatozoides se recoge la fase más cercana al pellet. Es importante que en este proceso el pellet quede intacto

- para que los espermatozoides inmóviles no se mezclen con los espermatozoides de buena movilidad.
- h. Este medio con espermatozoides móviles se deposita en un tubo de 5ml previamente rotulado con los mismos datos anotados en el tubo Falcon donde se sitúa la muestra.
  - i. Se prepara la cámara Makler con una gota de esta muestra recuperada para determinar la concentración de espermatozoides con buena movilidad.
  - j. Se determina el valor del REM que se puede dar de dos formas:
    - a. Concentración del REM (mill/ml) = Movilidad x concentración de espermatozoides (mill/ml)
    - b. REM (millones): REM (mill/ml) x volumen de la muestra (ml)
  - k. Se anotan los datos del REM en los formularios indicados para cada caso.
  - l. En caso de que la muestra vaya a ser utilizada en alguna TRA se mantiene a temperatura ambiente sobre el baño térmico hasta que sea utilizada.
  - m. Al finalizar la valoración del seminograma + REM debemos anotar los resultados obtenidos en la Hoja de análisis seminal y en la historia clínica del paciente.

### 6. Registros

- a. Documento "Hoja de recogida de muestra": Se archiva en la carpeta que se encuentra en el área de gestión.
- b. Documento "Hoja de análisis seminal para TRA": Se anotan todos los datos del análisis y se archiva en la carpeta "Seminograma" que se encuentra en el área de gestión.
- c. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en su historia clínica.

### 7. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del Laboratorio de Andrología.

## CONGELACIÓN DE SEMEN

### 1. Preparación del material:

1. Antes de la preparación de la muestra es necesario atemperar el crioprotector al menos durante 30 minutos en la cabina a temperatura ambiente.
2. La muestra se recoge según el mismo procedimiento utilizado para los seminogramas.
3. Si el objetivo de la congelación es preservar la fertilidad se congelarán mínimo 3 pajuelas. Si la muestra congelada será utilizada en el ciclo en curso se congelarán 1 ó 2 pajuelas para utilizar en el ciclo próximo en función de la calidad seminal. Además de las pajuelas para congelar, se utilizará una pajuela extra para realizar la prueba de descongelación.
4. Antes de comenzar con la congelación, las pajuelas deben ser convenientemente rotuladas con el nombre completo del paciente y la fecha.

### 2. Procesado de la muestra:

1. Realizar un análisis de la muestra en fresco y anotar en la hoja de congelación de muestra seminal los datos del paciente, la fecha de la congelación y las características de la muestra (volumen, concentración, vitalidad, morfología...).
2. Poner el volumen de semen necesario en un tubo Falcon de 15 ml y diluirlo con el crioprotector en una proporción 3:1.
3. Homogeneizar la dilución antes de cargar las pajuelas.
4. Para cargar las pajuelas se utiliza una jeringa y una aguja de insulina. Se introduce la aguja por el extremo cerrado de la pajuela y una vez enganchada la jeringa se introduce el otro extremo de la pajuela en la muestra. Se absorbe la mayor cantidad de muestra posible dejando siempre un margen de aire de aproximadamente 2cm en el extremo inferior para que el semen no se desborde al expandirse por el frío.
5. Las pajuelas cargadas se guardan a en la nevera 4°C durante 30 min.
6. Después se depositan en vapores de nitrógeno líquido durante otros 30 min.
7. Posteriormente se introducen en nitrógeno líquido y se guardan en su ubicación final.
8. Los datos del análisis seminal además de ser anotados en la hoja de congelación, se apuntan en la base de datos informatizada (Sara).
9. La ubicación en donde se han guardado las pajuelas se apunta junto con el diagnóstico y el número de pajuelas en la hoja Excel de semen congelado, en la hoja de congelación en papel y en la base de datos.

### 3. Prueba de descongelación:

1. Se descongela la pajueta cargada para realizar la prueba de descongelación como se describe en el Anexo I (Protocolos de Andrología).
2. En caso de mala supervivencia espermática se comunicará al médico correspondiente para informar al paciente.

#### **4. Registros:**

1. Documento "Hoja de congelación de muestra seminal": Se archiva en la carpeta "Semen congelado" que está en el área de gestión.
2. Documento Excel "Semen Congelado": Se anota en el Excel que se encuentra en: carpeta Laboratorio de andrología/ Registros/Congelación de semen.
3. Historia clínica informatizada: Se anota la congelación, la calidad de la muestra y la prueba de descongelación

#### **5. Anexos**

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del Laboratorio de Andrología.

## BIOPSIA TESTICULAR

### 1. Preparación del material el día previo:

Preparar medio tamponado G-MOPS en 3 tubos llenos y 3 jeringas de 1ml. Llenas hasta la mitad, por si se precisa realizar biopsia de epidídimo. Este medio se conserva en el frigorífico toda la noche. El día siguiente, antes de la biopsia se atempera en la estufa a 37°C.

### 2. Día de la biopsia:

Biopsia de epidídimo

- Cuando el urólogo lo solicite, se le entrega una jeringa en el quirófano.
- Esperar a que realice la biopsia y devuelva la jeringa con el medio.
- Depositar el medio de la jeringa en una placa de 35mm previamente atemperada.
- Expandir el medio por toda la superficie para poder observar mejor en el microscopio invertido, pero cuidar de que no se seque.
- Si se observan espermatozoides, avisar inmediatamente al urólogo para finalizar la biopsia.
- Pasar el medio con espermatozoides de la placa a un tubo falcon de 15mL.
- Este tubo se traslada a andrología y se realiza una centrifugación suave a 400rpm durante 4 min para eliminar los eritrocitos de la muestra.
- Se recoge el sobrenadante y se descarta el pellet.
- El sobrenadante se lava y capacita siguiendo el protocolo de capacitación espermática

Biopsia de testículo:

- En el momento del TESE el G-MOPS se vierte en placas de 35mm, en una cantidad suficiente para poder triturar el tejido sin que se seque pero sin poner medio en exceso para no diluir la muestra.
- Triturar la muestra con agujas de bisturí hasta que se forme una masa lo más homogénea posible.
- Observar bajo microscopio si hay espermatozoides
- Si se encuentran espermatozoides, avisar inmediatamente al urólogo para finalizar la biopsia.
- Pasar el medio con espermatozoides de la placa a un tubo Falcon de 15ml convenientemente rotulado.

- Este tubo se traslada al laboratorio de andrología y se realiza una centrifugación suave a 400rpm durante 4 min para eliminar los eritrocitos de la muestra.
- Se recoge el sobrenadante y se descarta el pellet.
- El sobrenadante se lava y capacita siguiendo el protocolo de capacitación espermática.

Estas muestras pueden ser congeladas siguiendo el protocolo de congelación de muestras de semen o pueden ser utilizadas en fresco para la ICSI.

Si no se encuentran espermatozoides móviles, se puede preparar una muestra añadiendo pentoxifilina 1:1.

Los datos obtenidos de la muestra se anotan en la hoja de ciclo o en la de congelación de muestras de semen (dependiendo del caso). Posteriormente los datos se pasan a la historia clínica en la base de datos informatizada.

### **3. Registros**

- a. Documento "Hoja de congelación" (Anexo III): Se archiva en la carpeta "Semen congelado" que se encuentra en el área de gestión.
- b. Documento "Hoja de ciclo" (Anexo IV): Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos (cada carpeta con su año correspondiente) que se encuentra en el área de gestión.
- c. Historia clínica informatizada: Se anota el resultado del procedimiento en la historia clínica en el lugar correspondiente.

### **4. Anexos**

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del Laboratorio de Andrología.

Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología.

## **PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES CON EYACULACIÓN RETRÓGRADA**

### **1. Procedimiento**

- a. Alcalización de la muestra de orina: En los pacientes diagnosticados de eyaculación retrógrada, los espermatozoides no se encuentran en el eyaculado si no en la orina. Para garantizar la viabilidad de los espermatozoides presentes en la orina es necesario alcalinizar la muestra de orina del paciente. Para ello es necesario que el paciente tome bicarbonato sódico según indique el urólogo.
- b. Procesado de la muestra:
  - i. Se obtiene una primera muestra por eyaculación en un bote estéril convenientemente rotulado y después es necesario recoger una muestra de orina en otro bote estéril rotulado.
  - ii. Se valora el pH de la muestra de orina con tiras medidores de pH de rango 7,2-8. Sólo si la muestra está dentro del rango, las dosis ingeridas por el paciente fueron las adecuadas.
  - iii. Medir el volumen de la muestra de orina utilizando una pipeta graduada.
  - iv. Distribuir la muestra de orina en tubos Falcon de 15ml de fondo cónico.
  - v. Centrifugar 5 minutos a 2.400 rpm
  - vi. Desechar el sobrenadante de cada tubo por decantación.
  - vii. Resuspender el pellet de cada tubo en 0,5ml de medio IVF
  - viii. Agrupar el pellet resuspendido en uno o dos tubos Falcon de 15ml, utilizando una pipeta pasteur de plástico.
  - ix. Centrifugar de nuevo la muestra 5 min a 2.400rpm
  - x. Desechar el sobrenadante por decantación.
  - xi. Resuspender el pellet en 0,5ml de medio IVF.
  - xii. Realizar el análisis habitual del semen según lo descrito en el protocolo para seminogramas.

### **2. Registros**

- a. Documento "Hoja de ciclo": Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos (cada carpeta con su año correspondiente) que se encuentra en el área de gestión.
- b. Historia clínica informatizada: Se hace una anotación con las características de la muestra y el resultado del proceso.

### **3. Anexos**

Anexo III. Plantillas de Andrología

Anexo IV. Plantillas de Embriología

## FRAGMENTACIÓN DE ADN

Método basado en la tecnología SCD (Sperm Chromatin Dispersion). Los espermatozoides frescos o descongelados se introducen en un gel de agarosa inerte en placas pretratadas. Un tratamiento inicial con ácido desnatura el ADN en aquellos espermatozoides con el ADN fragmentado. A continuación la solución de lisis elimina la mayoría de proteínas nucleares, lo que provoca en las cadenas de ADN intactas unos halos grandes de ADN marcado. Por el contrario, los espermatozoides con el ADN fragmentado no muestran este halo o es muy pequeño.

Contenido del kit (contiene lo necesario para 10 determinaciones)

- SCS: 10 portaobjetos pretratados con agarosa.
- ACS: 10 tubos eppendorf conteniendo agarosa de bajo punto de fusión.
- AD: 1 tubo con solución de ácido desnaturante. 1ml.
- LS: Un bote de solución de lisis. 100 ml.

### 1. Procedimiento

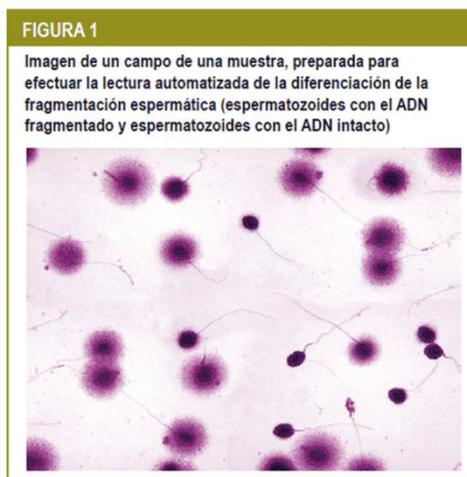
- 1) Mantener la solución de lisis (LS) a temperatura ambiente (22°C)
- 2) Atemperar un bote de plástico estéril (el utilizado normalmente para muestras de semen) con agua a 37°C en el incubador del laboratorio de andrología. Introducir una bandeja metálica en la nevera.
- 3) Diluir la muestra de semen en medio de cultivo/ diluyente de semen (IVF)/ PBS hasta alcanzar una concentración de  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  spz/mL.
- 4) Introducir un eppendorf de agarosa (ACS) en un corcho flotante (corcho rosa con forma de espermatozoide) en un tubo nuevo de plástico estéril con agua. El bote con el eppendorf lo introducimos en el microondas durante un minuto (o hasta que el agua comience su ebullición).
- 5) Transferir el eppendorf de agarosa con el corcho flotante, al bote con agua previamente atemperado en el incubador de andrología e incubar durante 5 min.
- 6) Añadir 25µL de muestra de semen al eppendorf de agarosa licuado.

Homogeneizar la muestra. Depositar un volumen de 14 a 20 µL de la mezcla obtenida sobre un portaobjetos pretratado de agarosa (SCS), depositar un cubreobjetos de 18x18mm sobre la muestra depositada evitando la formación de burbujas.

- 7) A partir de este momento, manejar el portaobjetos, siempre, en posición horizontal, para evitar derrames.
- 8) Depositar el portaobjetos sobre una superficie fría (bandeja metálica previamente introducida en la nevera), y mantenerlo en la nevera durante 5 min. para conseguir la gelificación de la agarosa.
- 9) Mientras, preparar la solución desnaturalizante (AD). Preparar la cabina para realizar los “baños” con 6 recipientes de incubación. Para ello, mezclar 80 µL de solución AD con 10 mL de agua destilada. Verter la mezcla sobre el primer recipiente de incubación.
- 10) Sacar el portaobjetos de la nevera y retirar el cubreobjetos con cuidado, evitando que la muestra gelificada se rompa. Es mejor retirarlo tirando de una esquina del cubre hacia fuera. A partir de este momento, usar guantes y manejar el portaobjetos horizontalmente con ayuda de pinzas.
- 11) Incubar el portaobjetos con la solución AD preparada en el paso 9) durante 7 min.
- 12) Después, verter 10 mL de la solución de lisis atemperada en el siguiente recipiente de incubación. Incubar el portaobjetos durante 25 min.
- 13) Incubar en un tercer recipiente, con un mínimo de 10 mL de agua destilada (o hasta que cubra el recipiente de incubación) para lavar la solución de lisis durante 5 min.
- 14) Finalmente, deshidratar la muestra incubándola durante 2 min en etanol al 70% (4º recipiente de incubación), etanol al 90% (5º recipiente de incubación) y etanol al 100% (6º recipiente de incubación) sucesivamente.
- 15) Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.
- 16) Después de secar las preparaciones, pueden guardarse en cajas de portaobjetos durante meses.
- 17) Tinción “Diff.Quik”: Incubar la preparación en la solución de eosina de color rojo durante 6 min. Posteriormente, incubar la preparación en la solución de Azur B de color azul durante 6 min. Los soportes de incubación son 2 cajas de portaobjetos, una para cada color.

## **2. Clasificación de los espermatozoides según su aspecto:**

- Espermatozoides sin ADN fragmentado: El espermatozoide presenta un halo grande o de tamaño medio a lo largo de su cabeza.
- Espermatozoides con ADN fragmentado: El espermatozoide presenta un halo pequeño o inexistente, el color de la cabeza es de un morado más intenso.



- Los datos y resultados de la muestra se anotan en la hoja informe de fragmentación y posteriormente los datos se pasan a la historia clínica en la base de datos informática.

### 3. Registros

- a. Documento "Hoja de informe de fragmentación": Se rellena y se guarda en la carpeta de "Fragmentación" que se encuentra en el área de gestión.
- b. Historia clínica informatizada: Se apunta el resultado de la fragmentación y la recomendación en el caso que sea necesario.

### 4. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del laboratorio de Andrología.

## MACS

### 1. Pasos previos:

Previamente se debe informar al laboratorio de que se va a realizar un MACS para reservar una columna. El día anterior tenemos que preparar un tubo con medio IVF (protocolo de preparación del laboratorio).

**2. Recogida y entrega de la muestra seminal:** Se realiza siguiendo el protocolo de Seminograma.

### 3. Preparación de la muestra seminal:

- a. REM (recuperación de espermatozoides móviles): Se realiza un seminograma + Swim up como está descrito en el protocolo de seminogramas.
- b. MACS: El kit contiene lo necesario para 6 determinaciones: 6 botes con 0,15ml anticuerpo (Anexin-V kit reagent), 6 botes con 10 mL Binding Buffer y 6 columnas.

Además de estos fungibles, también se utilizan un imán y un soporte magnético. Todos los procesos del procedimiento se deben realizar en condiciones de esterilidad.

### 4. Procedimiento:

- a. Sacar el anticuerpo de la nevera para que esté a temperatura ambiente.
- b. El volumen obtenido de la REM se pone en un tubo de fondo redondo de 5ml.
- c. Si tenemos una concentración muy alta (más  $10^7$  a  $10^8$ ) podemos diluir utilizando el Binding Buffer o IVF.
- d. A la REM se le añaden 100  $\mu$ l de anticuerpo.
- e. Añadir Binding Buffer hasta un volumen final de 500  $\mu$ l.
- f. Mezclar e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- g. Colocar la columna MS en el imán fijo en el soporte metálico. Poner un tubo debajo de la columna.
- h. Lavar la columna con 1000  $\mu$ l de Binding Buffer, descartar el buffer.
- i. Poner un nuevo tubo (previamente rotulado) debajo de la columna. Depositar la muestra en la columna. Recolectar el medio que fluye por la parte inferior de la columna en el tubo. Esta será la muestra de células purificadas, que se utilizará para las técnicas de FIV.
- j. Lavar la columna con 500  $\mu$ l de Binding Buffer y recoger el flujo. Esta muestra también es de células purificadas y se puede juntar con la primera fracción.

Todos los datos de la muestra se anotan en la hoja de ciclo y posteriormente los datos se pasan a la historia clínica en la base de datos informática (Sara).

### **5. Registros**

- Documento “Hoja de recogida de muestras”: Se archivan en la carpeta “Muestras de semen” que se encuentra en el área de gestión.
- Documento “Hoja de ciclo”: Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos (cada carpeta con su año correspondiente) que se encuentra en el área de gestión.
- Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en su historia clínica.

### **6. Anexos**

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del laboratorio de Andrología.

<b>ANEXO II</b>	<b>PROTOSCOLOS DE EMBRIOLOGÍA</b>
Protocolos del laboratorio de embriología.	Actualizado Enero 2016

## ÍNDICE

1. PREPARACIÓN DEL LABORATORIO	PÁG.2
2. PUNCIÓN OVÁRICA	PÁG.4
3. DENUDACIÓN DE OOCITOS	PÁG.5
4. FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)	PÁG.6
5. MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁSTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)	PÁG.7
6. VISUALIZACIÓN Y CATEGORIZACIÓN DE OOCITOS, CIGOTOS Y EMBRIONES	PÁG.10
7. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA	PÁG.16
8. VITRIFICACIÓN DE OOCITOS	PÁG.18
9. DESVITRIFICACIÓN DE OOCITOS	PÁG.20
10. VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES	PÁG.22
11. DESVITRIFICACIÓN DE EMBRIONES	PÁG.24

## PREPARACIÓN DE LABORATORIO

### 1. DESARROLLO

Antes de preparar el Laboratorio

- Se completa una hoja resumen del día próximo con los pacientes y procesos que se van a realizar en el Laboratorio de Embriología.
- Asegurarse de que la cabina de flujo laminar del laboratorio de embriología tiene, al menos, uno de sus puestos sin calefactar.
- Rotular todas las placas/tubos que se vayan a utilizar en el laboratorio. En las placas de cultivo dibujar una flecha en dirección de las agujas del reloj.
- Poner pegatinas de colores con los nombres de las pacientes (un color por cada día; desvitrificados en azul). Evitar poner punciones del mismo día en un mismo incubador.

Preparación del Laboratorio

Cuando se va a abrir un nuevo medio, se comprueba su fecha de caducidad y se rotula en la tapa la fecha en la que se abre. También se registra el número de lote en la hoja de registro de cambios de medio del laboratorio.

#### Punción

##### Día previo a la punción (Día -1)

Tubos

- 1 tubo Falcon de 50ml con D-PBS suplementado con penicilina/streptomina añadiendo 500µl del stock. Incubar a 37°C y 6% de CO<sub>2</sub>.
- 1 tubo de fondo redondo de 14ml con 6ml de medio ASP que se guarda en el incubador de trabajo.
- 1 tubo de fondo redondo de 14ml con 3ml de medio IVF/paciente que se guarda en el incubador de trabajo.
- 1 tubo Falcon de 50ml de aceite mineral OVOIL (6ml/paciente). Este tubo se guarda en el incubador de trabajo.

#### Placas

Por cada punción que se vaya a realizar preparar:

- Placa Falcon de doble pocillo con 3ml de IVF en el pocillo central y 4ml en el anillo exterior.

- Placa Petri de 35mm con una microgota de 125µl de IVF, recubrir completamente la microgota con OVOIL.
- Placa Petri de 35mm con microgotas de 25µl de medio de cultivo único. La primera microgota empieza en la flecha. Poner en el centro dos microgotas de 50µl de G1 para lavar los embriones. Recubrir completamente de OVOIL.

Por cada transferencia de embriones preparar:

- Placa Nunc de 4 pocillos, rellenar los pocillos 1 y 2 con 900µl de medio de cultivo único, la piscina central se rellena con 800µl de medio sobrante

Cabina de flujo: Programar la campana una hora antes de la hora de la punción.

### **Día de la punción (Día 0)**

#### **Placas**

Por cada paciente preparar:

- Placa Petri de 35mm con microgotas de 25µl de medio de cultivo único. La primera microgota empieza en la flecha. Hacer tantas microgotas como oocitos se hayan microinyectado. Si se tienen más de 10 oocitos hacer 2 placas (rotular que son 2). Poner en el centro de la placa dos microgotas de 50µl de medio único para lavar los embriones.
- Placa Petri de 35mm con microgotas de 25µl de G2. La primera microgota empieza donde la flecha. Hacer tantas microgotas como embriones viables se tengan en la placa de G1. Si se tienen más de 10 oocitos hacer 2 placas (rotular que son 2). Poner en el centro de la placa dos microgotas de 50µl de G2 para lavar los embriones

### **Desvitrificación de oocitos**

#### **Placas**

Por cada desvitrificación (DV) de oocitos, el día anterior se preparan:

- Placa Petri de 35mm con 4 microgotas de 75µl de medio IVF recubiertas completamente con OVOIL.
- Placa Petri de 35mm con microgotas de 25µl de medio de cultivo único. La primera microgota empieza en la flecha (una microgota por oocito DV). Poner en el centro de la placa dos microgotas de 50µl de G1 para lavar los oocitos.

### **Desvitrificación de embriones**

#### **Placas**

Por cada DV de embriones en estadio cleavage (día +2,+3), el día anterior preparar:

- Placa Petri de 35mm con microgotas de 25µl de medio de cultivo único. La primera microgota empieza en la flecha (una microgota por embrión DV). Poner en el centro de la placa dos microgotas de 50µl de medio de cultivo único para lavar los embriones.

El día de la DV pasar los embriones a la placa de microgotas y dejar evolucionar los embriones hasta el día siguiente que se transfieren, por ello el día de la DV se prepara la placa de transferencia (placa Nunc de 4 pocillos).

Por cada DV de embriones en estadio de mórula o blastocisto (día +4,+5,+6), el día anterior preparar:

- Placa Nunc de 4 pocillos, rellenar los pocillos 1 y 2 con 800µl de medio de cultivo único, la piscina central se rellenan con 800µl de medio sobrante.

Todas las placas se guardan en el incubador. Cada una bien rotulada y en el lugar correspondiente a su paciente

### **Preparación del Laboratorio para DGP (diagnóstico genético preimplantacional)**

#### **Tubos**

- Preparar 1 tubo Falcon de 50ml de aceite mineral OVOIL (6ml por cada embrión a biopsiar). Este tubo se guarda en la estufa de embriología.

#### **Placas**

- Preparar 1 placa Nunc de 4 pocillos por cada 2 embriones a biopsiar. Poner en los pocillos 1 y 2 una microgota de 25µl de medio de cultivo único y recubrir con OVOIL. Rotular los pocillos 1 y 2 tanto en la tapa como en la parte interna.

### **Preparación del Laboratorio para Biopsia Testicular.**

- Se deberán preparar 2 tubos extra de MOPS+ con 12mL.

## **2. REGISTROS**

- Hoja de registro de cambio de medios (Anexo III. Plantillas Andrología).

# PUNCIÓN OVÁRICA

## 1. DESARROLLO

Preparación previa a la punción:

- a. Realizar las mediciones diarias de equipos y anotarlas en el lugar correspondiente (Anexo VI. Hojas de Registro de Mantenimiento).
- b. Meter los tubos de MOPS+ preparados el día anterior en la estufa.
- c. Colocar placas Petri de 100mm y una placa de 35mm en el lado caliente de la campana. Se prepara una pipeta Pasteur corta para la recogida de oocitos.
- d. Una vez comenzada la punción se entregan los tubos de MOPS al quirófano procurando que no se pierda temperatura. Para ello se utiliza un calentatubos, una placa calefactada o ambas cosas.
- e. Se llena la placa Petri de 35mm con medio tamponado.
- f. El líquido folicular aspirado en la punción se recibe en el laboratorio en tubos o en jeringas y se vierte en las placas de 100mm procurando llenarlas sólo hasta la mitad para facilitar la visualización.
- g. En la lupa situada en la campana, se visualizan todas las placas siguiendo primero un movimiento circular para ver bien los bordes y después un movimiento en zig-zag para recorrer toda la placa. Los oocitos encontrados se recogen con la pipeta Pasteur y se sitúan en la placa de 35mm con medio tamponado.
- h. Cuando termina la punción, se cuenta el número de oocitos recuperados y se pasan a la placa de doble pocillo situada en el incubador. Primero se realiza un lavado en el anillo exterior y después se sitúan en el pocillo central de la placa.
- i. Los oocitos se dejan de 1 a 3 horas previas a la denudación.
- j. Por último se anota el número de oocitos obtenidos en la hoja resumen del día, que se encuentra en la parte superior de la cabina de flujo.

## 2. REGISTROS

Hoja de Registro de Mantenimiento (Anexo IV. Hojas de Registro de Mantenimiento): se encuentra en el laboratorio de Embriología. Posteriormente los datos serán almacenados en el Excel correspondiente.

# PROTOCOLO DE DENUDACIÓN DE OOCITOS

## 1. DESARROLLO

Preparación de la denudación

- A las 2 horas de la punción se realiza la denudación de oocitos. Sacar media hora antes la hialuronidasa (HYASE 10X<sup>TM</sup> - Vitrolife) que se encuentra en la nevera y dejarla en la zona no calefactada de la cabina de flujo laminar para que se atempere.
- Coger una pipeta Pasteur de vidrio corta y una pipeta Pasteur de vidrio estirada, enganchar ambas a un chupete.
- Coger un capilar de 135µm y ponerlo en la Stripper o en la SweMed.
- Coger una placa de 100mm y ponerla en la parte calefactada de la cabina de flujo.
- Coger un tubo de 5ml de fondo redondo. Mezclar 900µl de GAMETE y 100µl de HYASE.
- Poner 250µl de la dilución en la placa Petri de 100mm sacada previamente. También poner varias gotas de 100µl de GAMETE.

Denudación de oocitos.

- Sacar la placa de doble pocillo de IVF del incubador y llevarla a la lupa calefactada.
- Coger la pipeta Pasteur corta y pasar los oocitos a la gota de la dilución de HYASE (no más de 15 segundos en esa gota). Aspirar y expulsar los oocitos varias veces para ir degradando el complejo corona-cúmulo-oocito (CCCO).
- Pasar a una gota limpia de MOPS donde se comenzará a denudar mecánicamente con la pipeta Pasteur estirada y con el capilar de 135µm.
- Identificar los oocitos maduros (MII) y pasarlos a la placa Petri de 35mm con una microgota de 125µl de medio IVF recubierta con aceite mineral OVOIL, que se encuentra en el incubador.
- Anotar en la hoja resumen del día, que se encuentra en la parte superior de la cabina de flujo, el número de oocitos maduros obtenidos.
- Anotar en la tabla Resumen Ciclos Laboratorio, el número de oocitos maduros de cada paciente.

## 2. REGISTROS

- a. Hoja resumen del día: Se encuentra en la parte superior de la cabina de flujo.

## PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

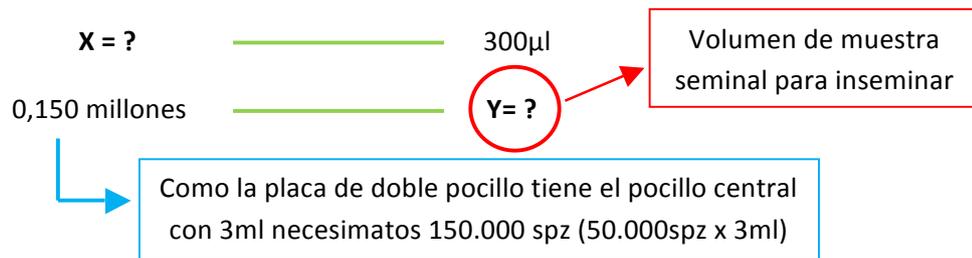
### 1. DESARROLLO

a) Inseminación de los oocitos.

- Coger 300µl de la REM que se le hizo a la muestra de semen.
- Calcular cuántos millones se tienen en 0,3ml (300µl), ya que los millones obtenidos al analizar la muestra al microscopio son en 1ml:



- Como la concentración óptima para la FIV es de 50.000 spz/ml y el pocillo de IVF tiene 3ml:



- Cuatro horas después de la punción realizar la inseminación de los oocitos con el volumen que se haya obtenido al hacer los cálculos.

b) Pelado de oocitos.

- Después de 16-18 horas de la inseminación, se desnudan (utilizando los capilares comerciales y la Stripper) e identifican los cigotos en el anillo central, luego los pasamos a la placa de microgotas de G1 (lavar en las gotas centrales).
- Se procede a la comprobación de la fecundación en el micromanipulador.
- Anotar en la hoja de ciclos de la paciente y en la tabla Resumen Ciclos Laboratorio, el número de oocitos fecundados.

### 2. REGISTROS

Documento "Hoja de ciclo" (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos que se encuentra en el área de gestión.

# PROTOCOLO DE MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

## 1. DESARROLLO

Montaje de las agujas de microinyección:

- Encender el micromanipulador, los motores de los microinyectores y el controlador de la temperatura de la placa térmica.
- Centrar los brazos de los micromanipuladores de tal forma que luego tengamos espacio para movernos en cualquier dirección.
- Antes de colocar las pipetas hay que asegurarse de que el sistema de inyección tiene suficiente aceite y están purgados.
- Abrir la protección de las pipetas.
- Quitar la pipeta usada (desenroscando el lápiz) y soltar un poco de aceite para comprobar que no hay burbujas en el sistema. Sacar con cuidado la pipeta e introducirla en el lápiz con cuidado de no formar burbujas.
- Proceder a la colocación de la holding o pipeta de sujeción (que es un sistema de aire y por tanto no se necesita purgar).
- Colocar el objetivo a 5x, enfocar las pipetas, rectificar su posición en caso de que no estén correctamente orientadas. Una vez tenemos ambas pipetas centradas, seguir ajustando con los objetivos 10x, 20x y 40x.
- Subir las pipetas para poder luego colocar la placa de ICSI fácilmente.

Preparación de la placa de microinyección:

- Media hora antes de microinyectar sacar el PVP de la nevera y dejarlo en la zona no calefactada de la campana para que se atempere.
- Coger una placa Petri de 50x9mm y dibujar un ojal con un rotulador. Trabajar en la parte no calefactada de la cabina de flujo laminar para que no se sequen las microgotas.
- Dentro del ojal poner 3 microgotas de 6µl de PVP en fila. En las 2 gotas inferiores poner muestra seminal en función de la concentración obtenida (importante comprobar nombres).

- A los laterales del ojal poner tantas microgotas de 6µl de medio tamponado GAMETE como oocitos haya que microinyectar.
- Cubrir las microgotas completamente con OVOIL previamente atemperado en la estufa a 37°C. Pasar la placa a la zona calefac
- tada ya que vamos a manipular gametos.
- En la tapa de la placa poner una gota de medio tamponado MOPS.
- Sacar la placa Petri de 35mm con la microgota de 125µl de IVF en la que previamente dejamos los oocitos maduros (MII). Lavar los oocitos en la gota de MOPS y luego pasarlos a la placa de ICSI.

#### Microinyección:

- Comprobar que el microinyector está limpio (no tiene polvo ni restos de medio de cultivo de su uso previo) y en caso de necesitar limpiarlo se utilizará una gasa estéril y agua destilada. La limpieza siempre se hará con la pletina fría.
- Llevar la placa de ICSI de la cabina de flujo laminar al microinyector.
- Enfocar el borde de la primera gota de PVP y bajar la pipeta de ICSI hasta enfocarla.
- Aspirar PVP aproximadamente hasta el codo. Comprobar que la pipeta no aspira ni sopla.
- Disminuir el aumento del objetivo y subir ligeramente la ICSI para ir a la gota de PVP + espermatozoides (spz).
- Enfocar el borde de la gota, y poner el objetivo de 40x.
- Seleccionar el espermatozoide móvil y con mejor morfología, inmovilizarlo con un golpe seco de la pipeta de ICSI.
- Aspirar el spz por la cola.
- Disminuir el aumento del objetivo y subir ligeramente la ICSI para ir a la gota de MOPS donde tenemos el oocito.
- Enfocar el borde de la gota, y poner el objetivo de 20x para enfocar el oocito y orientar el corpúsculo polar (CP) entre las 6 y las 7.
- Sujetar el oocito con la holding.
- Cambiar al objetivo de 40x y enfocar el oocito y la pipeta de ICSI.
- Colocar la pipeta de ICSI en el mismo plano del oocito y posicionarla junto a la zona pelúcida (ZP). Situar el spz en la punta de la pipeta.

- Microinyectar.
- Soltar el oocito de la holding.
- Hacer este procedimiento con todos los oocitos.
- Pasar los embriones a la placa de microgotas de G1 de uno en uno y en el orden en el que se microinyectaron.
- Anotar el número de MII que se microinyectaron en la hoja de ciclo que ya tendrá los datos de la paciente y del seminograma de su pareja (o donante). También pondrá el nombre de la donante de óvulos si no es ciclo propio.

## **2. REGISTROS**

Documento “Hoja de Ciclo” (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos que se encuentra en el área de gestión.

# PROTOCOLO DE VISUALIZACIÓN Y CATEGORIZACIÓN DE OOCITOS, CIGOTOS Y EMBRIONES

Para realizar una categorización correcta y estandarizada de los cigotos y embriones obtenidos en los tratamientos de reproducción asistida se utilizarán los parámetros recomendados por la clasificación de ASEBIR actualizados en la 3<sup>o</sup> edición del cuaderno: "Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos."

## 3. PROCEDIMIENTO

### Día 0

En el momento de la microinyección se puede hacer una mejor observación de la morfología del oocito, se anotarán como desfavorables las siguientes características:

- Acumulaciones de REL.
- Granulosidad central.
- 1<sup>er</sup> CP gigante (>30µm).
- Vacuolización excesiva.
- Oocitos gigantes (>200µm): no deben ser microinyectados.
- Anomalías de la Zona Pelúcida.

### Día 1

- La fecundación se observa 16-20 horas después de la microinyección.
- Antes de la visualización es necesario encender el micromanipulador y el controlador de la temperatura de la placa térmica. Después se saca la placa del incubador y se coloca en el microinyector.
- Se enfoca la primera gota (la que está debajo de la flecha) y se pone el objetivo de 40x.
- Características a observar y anotar:
  - Corpúsculos polares (CP): Número, apariencia y localización respecto a los pronúcleos.
  - Número de pronúcleos (PN).
  - Apariencia de los pronúcleos: Simetría, sincronía y localización.
  - Cuerpos precursores nucleolares (NPB): Número, simetría y polarización.
  - Halo citoplasmático: Presencia/ausencia y aspecto.

- En una fecundación correcta se observan 2 PN y 2 CP.
- Los cigotos con 3 o más PN son desechados.

### **Día 2 y Día 3, estadio celular: D+2, D+3**

Los embriones se visualizan en los siguientes rangos:

- D+2: 43-45 horas posinseminación.
- D+3: 67-69 horas posinseminación.

Las características a observar son:

- Número de células y ritmo de división.
- Porcentaje y tipo de fragmentación celular.
- Tamaño de los blastómeros estadio-específico.
- Visualización de núcleos y grado de multinucleación.
- Anomalías citoplásmicas:
  - Anillo acitoplasmático.
  - Presencia de vacuolas.
  - Pitting o moteado
- Forma del blastómero.
- Zona pelúcida.
- Grado de compactación/adhesión temprana.

Se evalúan los embriones según la clasificación de ASEBIR (Tabla 1) y se anotan los datos en la hoja de ciclo correspondiente.

Para el sistema de gradación se ha empleado las categorías de ASEBIR:

- Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
- Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: Embrión regular con una probabilidad de implantación media.
- Categoría D: Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja. Llamamos la atención sobre que, dentro de la categoría D, hay embriones con anomalías diversas, que hacen que su probabilidad de implantación sea prácticamente nula.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES EN ESTADIO CELULAR

Ritmo de división		Otras características:	
<u>Nº células D+2</u>	<u>Nº células D+3</u>	<b>% Fragmentación</b> A..... ≤ 10% B..... > 10-25% C..... > 25-35% D..... > 35%	<b>Zona Pelúcida</b> A...normal B...anormal
2 cel	3-5 cel → D 6-8 cel → C		<b>Grave alteración citoplásmica ...D</b>
3 cel	4-5 cel → D 6-9 cel → C	<b>Multinucleación</b> A..... sin multinucleación C..... 1 cél. bn en D+2 o bien 1-2 cél. bn en D+3. Resto Grado A D..... Cualquier otra multinucleación	
4 cel	5 cel → D 6 cel → C 7 cel → A 8 cel → A 9 cel → B 10 cel → B 11-12 cel → C	<b>Simetría</b> A... 4(D+2)Estadio-Específico(EE) → 8(D+3)EE B... 4(D+2)EE → 7(D+3)NoEE C... 4(D+2)EE/NoEE → 8(D+3)NoEE D... 3 cél. (D+2) NoEE	
5 cel	6 cel → D 7-10 cel → B 11-12 cel → C	<b>Vacuolas</b> A.. Sin vacuolas B.. ≤50% cél. con vacuolas pequeñas C.. ≤50% cél. con vacuolas grandes D.. >50% cél. con vacuolas pequeñas	
6 cel	7 cel → D 8-12 cel → C	<b>Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula:</b> Falta de división en 24h; >50% de fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D.	
>6 cel	≥ 1 cel más que D+2 → D		

**a. Día 4 (D+4): Mórula.**

El día 4 de desarrollo los embriones compactan. El grado de compactación es valorable pero dado que no se pueden descartar embriones por su estado en D+4 no se van a evaluar los embriones hasta el día 5 de desarrollo y así mantener un cultivo más estable.

En caso de que fuera necesario valorar el embrión en D+4 o que se visualice compactación en D+3 se hará siguiendo el siguiente criterio:

- Inicio de adhesión: estadio en el que las células se pueden identificar bien por separado, aunque con las membranas adyacentes.
- Compactación: estadio en el que es difícil diferenciar los blastómeros entre sí.

**b. Día 5 (D+5): Blastocisto.**

Según lo expuesto en la segunda edición del cuaderno de embriología (ASEBIR, 2008) y el consenso de Estambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, realizarse en el intervalo de observación recomendado.

- D+5: 114-118 h posinseminación.
- D+6: 136-140 h posinseminación.

Los parámetros que se van a observar en el estadio de blastocisto son:

- **Evolución del embrión.** Organización del blastocisto, de mejor a peor tasa de implantación:
  - Aparición del blastocele en D+5.
  - Aparición del blastocele en D+6.
  - Aparición del blastocele después de D+6.
- **Grado de expansión del blastocele:**

Cuando el blastocisto está organizado, el blastocele ocupa prácticamente todo el volumen del embrión. Este parámetro se correlaciona favorablemente con la tasa de implantación.

- **Zona pelúcida**, de mejor a peor tasa de implantación:
  - Aparece adelgazada en D+5.
  - Aparece adelgazada en D+6.
- **Trofoectodermo**, de mejor a peor tasa de implantación:
  - Trofoectodermo con epitelio homogéneo y células elípticas.

- Trofoectodermo con epitelio irregular.
- Trofoectodermo con epitelio irregular con células escasas.
- Trofoectodermo con focos degenerativos.
  - **Masa celular interna**, de mejor a peor tasa de implantación:
    - Tamaño de la MCI de 1900 - 3800 mm, con apariencia oval y compactada.
    - Tamaño de la MCI de <1900 mm, con apariencia diferente a oval y compactada.
  - **Fragmentación y vacuolización**:  
Su presencia se considera siempre un factor de mal pronóstico.

Siguiendo la clasificación de ASEBIR se van a clasificar los embriones según las siguientes tablas:

TABLA 2. Gradación embrionaria para D+5

D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión"  Hasta: "Eclosionando"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
	D	A,B,C o D	D	
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)			C	
Mórula no compacta	Mórula	D		

TABLA 3. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad de la MCI y el TE.

		TROFOECTODERMO			
		A	B	C	D
MASA CELULAR INTERNA	A				
	B				
	C				
	D				

#### 4. REGISTROS

Documento "Hoja de Ciclo" (Anexo IV Plantillas del Laboratorio de Embriología): Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos que se encuentra en el laboratorio de andrología.

## PROTOCOLO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

### 5. DESARROLLO

Preparación previa:

- Media hora antes de la transferencia se prepara una jeringa de 2ml llena de medio de lavado para que se atempere.
- Se prepara un catéter y una jeringa de transferencia (jeringa verde de 1ml.).

Selección de embriones y preparación de la transferencia:

- Seleccionar los embriones a transferir según los criterios de ASEBIR (2015) y se marcan con una T en la hoja de ciclo.
- Los embriones sobrantes de buena calidad serán seleccionados para congelar y se marcan con una V en la hoja de ciclo.
- Previo a la transferencia se informa a los pacientes de la evolución embrionaria y la calidad de los embriones a transferir y congelar.

Transferencia:

- Cuando la paciente se encuentra en quirófano se lleva la jeringa con medio de lavado y se sitúa en el campo estéril.
- Se abren los envoltorios de la jeringa y el catéter de transferencia.
- Cuando el ginecólogo ha canalizado nos avisa para cargar los embriones en el catéter.
- Se comprueba en el incubador, la placa y el catéter el nombre de la paciente.
- Llenar la jeringa embriotestada (verde) con el medio del pocillo 1. Enganchar la jeringa al catéter.
- Vaciar la jeringa+catéter en el pocillo 1 para purgar el catéter.
- Ir al pocillo 2 y cargar el embrión. Coger un volumen máximo de 0,3ml.
- Mover la vaina externa del catéter para tapar la zona donde está el embrión.
- Una vez en el quirófano, nos situamos a la derecha del médico. El médico retirará la vaina interna (con nuestra ayuda) e introduce el catéter blando dentro del catéter guía con el que canalizó.

- Una vez situado el punto donde se quiere depositar los embriones (con ayuda del ecógrafo), se procede a descargarlos suavemente presionando el émbolo de la jeringa.
- El médico retira cuidadosamente el catéter y vuelve a introducirlo en la vaina externa que lo protege, lo llevamos al laboratorio para revisar en la lupa que los embriones han sido correctamente transferidos.
- En caso de que al revisar en la lupa nos aparezca el embrión, repetiremos el mismo procedimiento.
- Anotar los datos de la transferencia en la hoja de ciclo de la paciente y en la base de datos informatizada.

## **6. REGISTROS**

- a. Hoja de Ciclo (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos que se encuentra en el área de gestión.
- b. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en la historia clínica correspondiente.

## PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN DE OOCITOS

### DESARROLLO

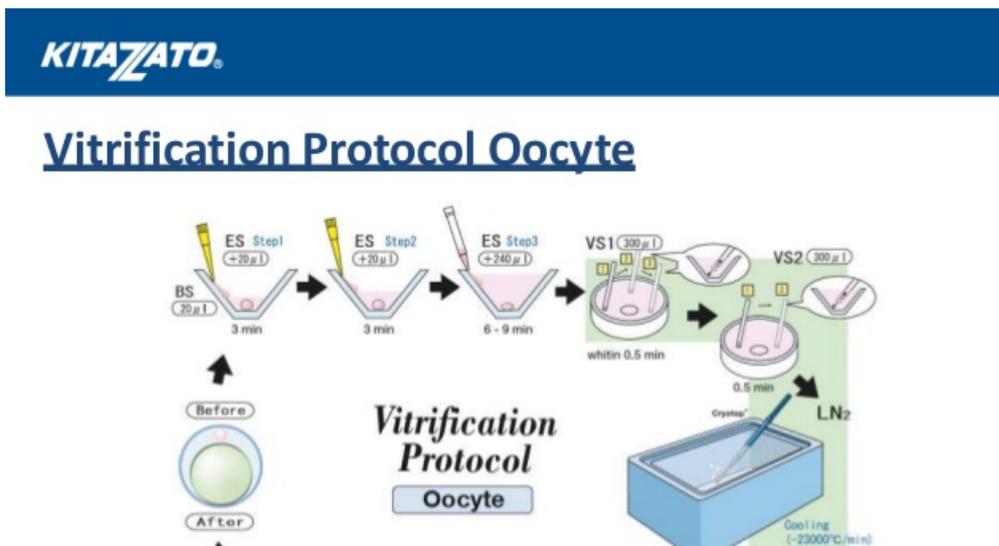
- b. Preparación del material.
- Sacar una hora antes los medios de vitrificación situados en la nevera. Llevarlos a la parte no calefactada de la cabina de flujo para que se atemperen.
  - Antes de vitrificar, rellenar la hoja de registro de vitrificación de la paciente, rotular las pajuelas que se vayan a utilizar y rellenar el recipiente para nitrógeno al 90%.
  - Colocar las pajuelas rotuladas, una placa Petri de 100mm y el recipiente con nitrógeno en el lado **no calefactado** de la cabina de flujo. Preparar la stripper colocando el capilar de 170µm.
- c. Vitrificación.
1. Hacer una gota de 20µl del medio BS en la placa petri de 100mm. Situar los oocitos en esa gota.
  2. Hacer una gota de 20µl de ES contigua a la gota anterior y unir las con la pipeta. Esperar 3 minutos.
  3. Hacer otra gota de 20µl de ES junto a la anterior y unir las con la pipeta. Esperar 3 minutos.
  4. Depositar 240µl de ES en la gota de los oocitos y esperar de 6 a 9 minutos.
  5. Hacer dos gotas de 300µl de medio VS.
  6. Pasado el tiempo necesario depositar los oocitos en el medio VS, lavar varias veces y pasar por la segunda gota de medio VS.
  7. Cargar los oocitos en la pajueta retirando el exceso de líquido.
  8. Los pasos 6 y 7 tienen que durar como máximo 1,5 minutos.
  9. Depositar rápidamente la pajueta en el recipiente con nitrógeno y moverla de un lado al otro para evitar la formación de burbujas. Posteriormente, cubrir con el capuchón dentro del nitrógeno.
  10. Almacenar la pajueta en el tanque de nitrógeno y anotar en la hoja de vitrificación, en el Excel de congelación y en la historia clínica informatizada.

**REGISTROS**

- a. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en la historia clínica correspondiente
- b. Excel de congelación. Se anotan los siguientes datos: historia clínica, nombre, ubicación, número y color de pajuelas.
- c. Hoja de vitrificación (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Se rellenan todos los datos de la hoja y se archiva en el área de gestión.

**PROTOCOLO DEL PROVEEDOR**

Esquema de vitrificación de Kitazato.



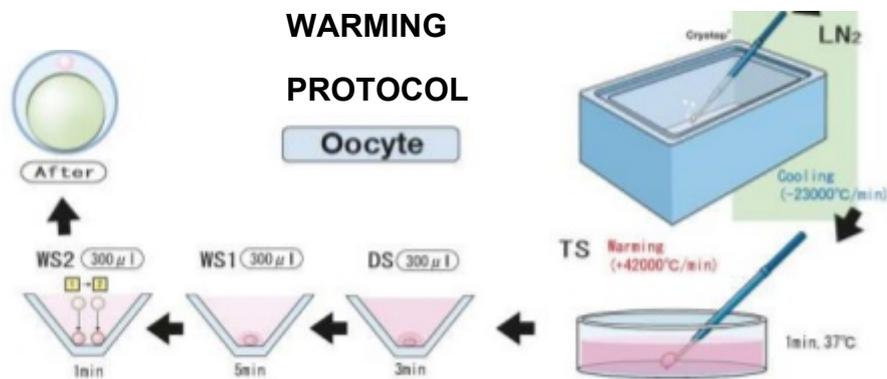
## PROTOCOLO DE DESVITRIFICACIÓN DE OOCITOS

### DESARROLLO

- Preparación del material.
  - Sacar los medios de desvitrificación de la nevera al menos una hora antes de comenzar. Situar el medio TS en el incubador junto con una placa de 35mm.
  - Coger una placa Petri de 100mm por cada pajueta.
  - Sacar la hoja de registro de vitrificación de la paciente, ver el Excel de registro de congelación y comprobar donde están almacenados los oocitos.
  - Preparar la Stripper con un capilar de 170µm.
  
- Desvitrificación.
  1. Poner el medio TS en la placa petri y volver a situarla en el incubador.
  2. Rellenar el recipiente para nitrógeno al 90%. Sacar la margarita del tanque de nitrógeno donde se encuentran las pajuelas. Pasar las pajuelas al nitrógeno líquido y volver a colocar la margarita en el tanque.
  3. Preparar una gota de 300µl de ES para tener preparado el segundo medio.
  4. En la parte calefactada de la campana sacar la placa petri con medio TS
  5. Preparar la pajueta sacándola del capuchón dentro del nitrógeno líquido.
  6. Poner el contador a funcionar.
  7. Sacar rápidamente la pajueta y depositarla en la placa con medio TS, si los oocitos no se desprenden directamente agitar la pajueta ligeramente o absorberlos con la Stripper. Esperar máximo 1 minuto.
  8. Pasar los oocitos a la gota de medio ES que dejamos preparada, colocar la placa en el lado **no calefactado** de la campana y esperar 3 minutos.
  9. Durante este tiempo, preparar las siguientes gotas de 300µl de medio WS.
  10. Pasado el tiempo pasar los oocitos a la primera gota de WS y esperar 5 minutos.
  11. Pasar los oocitos a la segunda gota de WS y esperar 1 minuto.
  12. Colocar la placa en el lado calefactado de la campana y guardar los oocitos en placa petri con medio lavando en varias gotas.
  13. Dejarlos reposar al menos 2 horas antes de la microinyección.
  14. Anotar la desvitrificación en la hoja, en el Excel y en la base de datos informatizada.

## PROTOCOLO DEL PROVEEDOR

Esquema de desvitrificación de Kitazato



## REGISTRO

- a. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en la historia clínica correspondiente
- b. Excel de congelación. Se anotan los datos de la desvitrificación: fecha, número de pajuelas y supervivencia.
- c. Hoja de vitrificación (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Se rellenan todos los datos de la hoja y se archiva en el área de gestión.

## PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES

### DESARROLLO

#### d. Preparación del material.

- Sacar una hora antes los medios de vitrificación situados en la nevera. Llevarlos a la parte no calefactada de la cabina de flujo para que se atemperen.
- Antes de vitrificar, rellenar la hoja de registro de vitrificación de la paciente, rotular las pajuelas que se vayan a utilizar y rellenar el recipiente para nitrógeno al 90%.
- Colocar las pajuelas rotuladas, una placa Petri de 100mm y el recipiente con nitrógeno en el lado **no calefactado** de la cabina de flujo. Preparar la stripper colocando el capilar de 170µm para embriones en D3 y de 200µm para embriones en D5.

#### e. Vitrificación.

1. Hacer una gota de 300µl del medio BS en la placa petri de 100mm. Situar los oocitos en esa gota.
2. Hacer dos gotas de 300µl de medio VS.
3. Pasado el tiempo necesario depositar los oocitos en el medio VS, lavar varias veces y pasar por la segunda gota de medio VS.
4. Cargar los embriones en la pajuela retirando el exceso de líquido.
5. Los pasos 6 y 7 tienen que durar como máximo 1,5 minutos.
6. Depositar rápidamente la pajuela en el recipiente con nitrógeno y moverla de un lado al otro para evitar la formación de burbujas. Posteriormente, cubrir con el capuchón dentro del nitrógeno.
7. Almacenar la pajuela en el tanque de nitrógeno y anotar en la hoja de vitrificación, en el Excel de congelación y en la historia clínica informatizada.

### REGISTROS

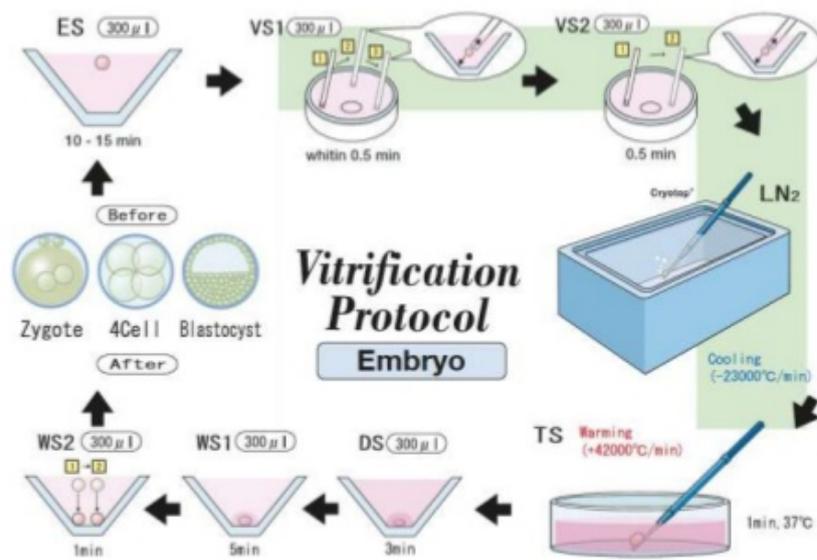
- a. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en la historia clínica correspondiente
- b. Excel de congelación. Se anotan los siguientes datos: historia clínica, nombre, ubicación, número y color de pajuelas.
- c. Hoja de vitrificación (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Se rellenan todos los datos de la hoja y se archiva en el área de gestión.

## PROTOCOLO DEL PROVEEDOR

Esquema de vitrificación de Kitazato.

**KITAZATO**

### Vitrification Protocol Embryo



www.dibimed.com

**Dibimed**

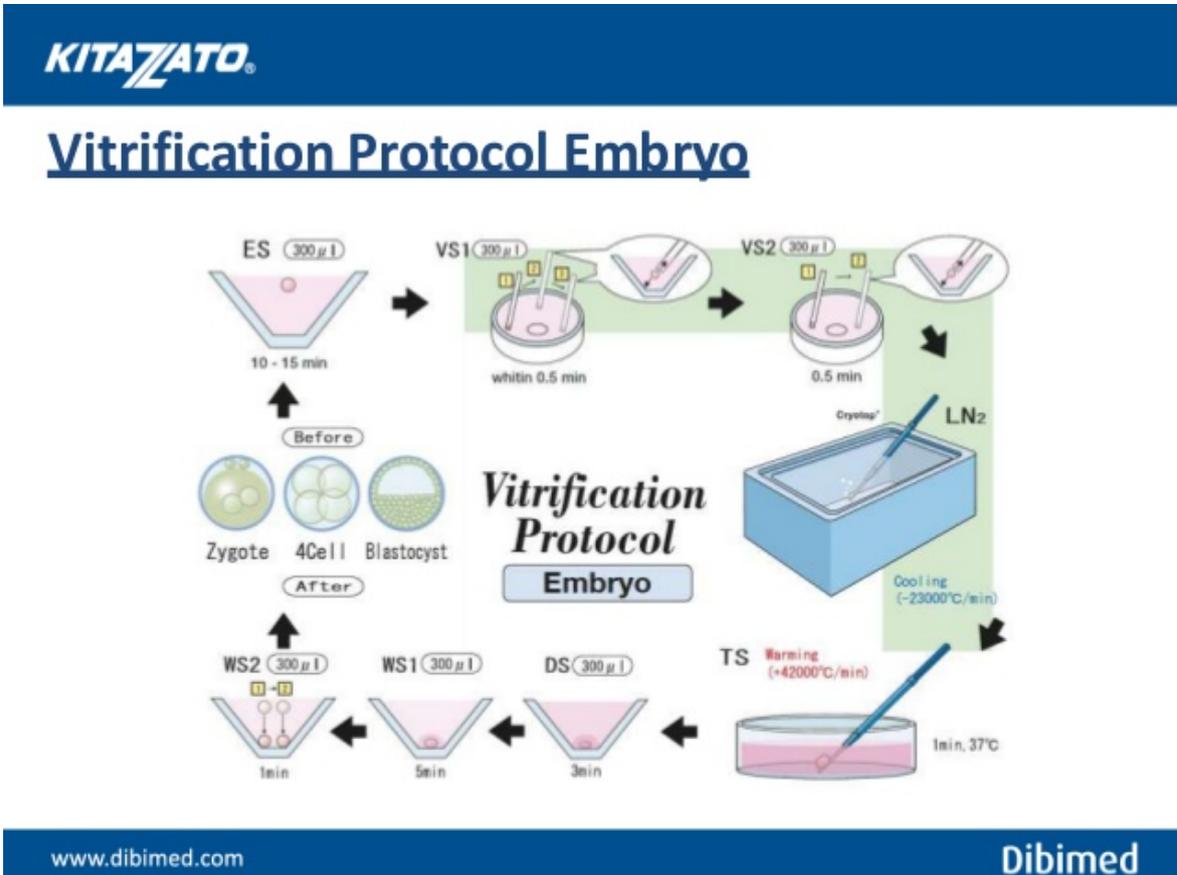
## PROTOCOLO DE DESVITRIFICACIÓN DE EMBRIONES

### DESARROLLO

- Preparación del material.
  - Sacar los medios de desvitrificación de la nevera al menos una hora antes de comenzar. Situar el medio TS en el incubador junto con una placa de 35mm.
  - Coger una placa Petri de 100mm por cada pajueta.
  - Sacar la hoja de registro de vitrificación de la paciente, ver el Excel de registro de congelación y comprobar donde están almacenados los oocitos.
  - Preparar la Stripper con un capilar de 170µm para embriones en D3 y 200170µm para embriones en D5.
  
- Desvitrificación.
  1. Poner el medio TS en la placa petri y volver a situarla en el incubador.
  2. Rellenar el recipiente para nitrógeno al 90%. Sacar la margarita del tanque de nitrógeno donde se encuentran las pajuelas. Pasar las pajuelas al nitrógeno líquido y volver a colocar la margarita en el tanque.
  3. Preparar una gota de 300µl de ES para tener preparado el segundo medio.
  4. En la parte calefactada de la campana sacar la placa petri con medio TS
  5. Preparar la pajueta sacándola del capuchón dentro del nitrógeno líquido.
  6. Poner el contador a funcionar.
  7. Sacar rápidamente la pajueta y depositarla en la placa con medio TS, si los embriones no se desprenden directamente agitar la pajueta ligeramente o absorberlos con la Stripper. Esperar máximo 1 minuto.
  8. Pasar los embriones a la gota de medio ES que dejamos preparada, colocar la placa en el lado **no calefactado** de la campana y esperar 3 minutos.
  9. Durante este tiempo, preparar las siguientes gotas de 300µl de medio WS.
  10. Pasado el tiempo pasar los oocitos a la primera gota de WS y esperar 5 minutos.
  11. Pasar los oocitos a la segunda gota de WS y esperar 1 minuto.
  12. Colocar la placa en el lado calefactado de la campana y guardar los embriones en placa petri con medio lavando en varias gotas.
  13. Anotar la desvitrificación en la hoja, en el Excel y en la base de datos informatizada.

**PROTOCOLO DEL PROVEEDOR**

Esquema de desvitrificación de Kitazato

**REGISTRO**

- d. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en la historia clínica correspondiente
- e. Excel de congelación. Se anotan los datos de la desvitrificación: fecha, número de pajuelas y supervivencia.
- f. Hoja de vitriificación (Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología): Se rellenan todos los datos de la hoja y se archiva en el área de gestión.

## ANEXO III

---

# PLANTILLAS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA

---

PLANTILLA ANDROLOGÍA 1. Análisis seminal para TRA	Pág.2
PLANTILLA ANDROLOGÍA 2. Recogida de muestra seminal	Pág.3
PLANTILLA ANDROLOGÍA 3. Datos de recogida de muestra seminal	Pág.4
PLANTILLA ANDROLOGÍA 4. Hoja de toma de datos de la muestra	Pág.5
PLANTILLA ANDROLOGÍA 5. Congelación de semen	Pág.6
PLANTILLA ANDROLOGÍA 6. Inseminación Artificial Conyugal (IAC)	Pág.7
PLANTILLA ANDROLOGÍA 7. Inseminación Artificial Donante (IAD)	Pág.8

---

Actualizado Enero 2016

---

## ANÁLISIS SEMINAL PARA TRA

**Nombre:**

**Fecha:**

**Valores: OMS 2010**

Días de abstinencia:

Aspecto:

Licuefacción:

**pH:**

**Volumen:** ml

Referencia > 1.5 ml

**Concentración:** mill/ml

Referencia > 15 mill.spz/ml

**Motilidad total:** %

Espermatozoides progresivos: %

Referencia >32 %

Espermatozoides no progresivos: %

Espermatozoides inmóviles: %

**Morfología:** %

Referencia > 4%

**Vitalidad:** %

Referencia > 58%

**REM (Recuento de espermatozoides móviles):**

**millones/ml**

Movilidad a las 0h: %

Movilidad a las 24h: %

Observaciones:

**DIAGNÓSTICO:**

Los valores aquí obtenidos pueden fluctuar entre diferentes muestras de semen. El resultado se basa en el análisis de una única muestra y podría no ser totalmente representativo. El resultado de este análisis seminal debe ser siempre interpretado por su médico/biólogo.

## **RECOGIDA DE MUESTRA SEMINAL**

**Lea con detenimiento las instrucciones y ante cualquier duda consulte con el personal de la clínica.**

### INSTRUCCIONES PREVIAS:

- La abstinencia sexual recomendada es de **1 a 3 días**. Se entiende como abstinencia sexual la ausencia de eyaculación ya sea por coito, autoestimulación o eyaculación involuntaria.
- Obtención de la muestra fuera del centro: En caso de que sea necesario obtener la muestra fuera del centro es necesario que sea entregada en el plazo máximo de una hora en el recipiente proporcionado por el centro. En caso de necesitar otro recipiente éste debe ser estéril como los utilizados en la recogida de muestras de orina.  
El transporte debe realizarse cuidadosamente, con el bote hacia arriba y procurando mantener una temperatura corporal por lo que es recomendable transportarla junto al cuerpo.
- Es importante que se recoja toda la muestra completa ya que las distintas fracciones tienen distinta calidad. En caso de no ser así tiene que ser indicado en la casilla correspondiente.

### INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA:

- Es recomendable orinar antes de la obtención de la muestra.
- Para mantener la higiene necesaria se debe realizar un lavado exhaustivo de manos previo.
- En el caso de recogerla en casa rotule la pegatina en mayúsculas indicando:
  - Nombre y apellidos
  - Nombre y apellidos de su pareja (en caso necesario)
  - Fecha de entrega
- En el caso de recogerla en la clínica compruebe que su nombre y apellidos está correctamente escrito.
- Pegue la pegatina en el bote y destápelo para mayor comodidad
- Una vez recogida la muestra compruebe que deja el bote bien cerrado.
- Entregue la muestra con la hoja debidamente cumplimentada al personal de la clínica.

**DATOS DE RECOGIDA DE MUESTRA SEMINAL**

Doctor solicitante: \_\_\_\_\_

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Documento de identificación: \_\_\_\_\_

Nombre y apellidos de su pareja: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

CP: \_\_\_\_\_ Localidad: \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ País: \_\_\_\_\_

¿Toma actualmente algún medicamento?

NO SI  Indique medicamento y cantidad: \_\_\_\_\_¿Ha tenido fiebre en los últimos días? SÍ  NO 

Días de abstinencia: \_\_\_\_\_

Hora de entrega de la muestra: \_\_\_\_:\_\_\_\_

¿Ha recogido toda la muestra del eyaculado?

SI NO  Indique si ha perdido muestra del principio o del final: \_\_\_\_\_

En caso de que la muestra haya sido obtenida fuera de la clínica indicar hora de eyaculación: \_\_\_\_:\_\_\_\_

 SEMINOGRAMA FIV/ICSI CONGELACIÓN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL FISH FRAGMENTACIÓN DNA OTROS:

FIRMA:

**HOJA DE TOMA DE DATOS DE LA MUESTRA**

<b>Aspecto:</b>	<b>Licuefacción:</b>	<b>pH:</b>
<b>Volumen:</b> ml		Referencia > 1.5 ml
<b>Concentración:</b> mill/ml		Referencia > 15 mill.spz/ml
<b>Motilidad:</b>		
Espermatozoides progresivos: %		Referencia >32 %
Espermatozoides no progresivos: %		
Espermatozoides inmóviles: %		
<b>Morfología:</b> %		Referencia > 4%
<b>Vitalidad:</b> %		Referencia > 58%
<b>REM (Recuento de espermatozoides móviles):</b>		<b>millones/ml</b>
<b>Movilidad a las 0h:</b> %	<b>Movilidad a las 24h:</b> %	

**CONGELACIÓN DE SEMEN****Nombre:****Nº HISTORIA:****Fecha:****UBICACIÓN:****Nº PAJUELAS:****PRUEBA DE DESCONGELACIÓN:**

MEDIO DE CONGELACIÓN:

Días de abstinencia:

Aspecto:

Licuefacción:

**Volumen:** ml**Concentración:** mill/ml**Motilidad:** %**OBSERVACIONES:**

DESCONGELACIÓN	FECHA	SUPERVIVENCIA
1º DESCONGELACIÓN		
2º DESCONGELACIÓN		
3º DESCONGELACIÓN		

<b>CICLO</b>	
<b>PRESERVACIÓN</b>	

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CONYUGAL (IAC)

**Paciente:****Edad:****Pareja:****Edad:****Fecha:****Nº HISTORIA:****Valores: OMS 2010****Días de abstinencia:****Aspecto:****Licuefacción:****pH:****Volumen:** ml

Referencia &gt; 1.5 ml

**Concentración:** mill/ml

Referencia &gt; 15 mill.spz/ml

**Motilidad:**

Espermatozoides progresivos: %

Referencia &gt;32 %

Espermatozoides no progresivos: %

Espermatozoides inmóviles: %

**Morfología:** %

Referencia &gt; 4%

**REM (Recuento de espermatozoides móviles):****millones/ml**

Observaciones:

**DIAGNÓSTICO:**

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DONANTE (IAD)

**Nº HISTORIA:**

**Paciente:**

**Pareja:**

**Fecha:**

---

**Nº DONANTE:**

**Volumen: ml**

**Concentración: mill/ml**

**Movilidad total: %**

**Morfología: %**

### CARACTERÍSTICAS

<b>REFERENCIA</b>	
<b>BANCO</b>	
<b>GRUPO</b>	
<b>ALTURA (cm)</b>	
<b>PESO (Kg)</b>	
<b>COLOR PELO</b>	
<b>TIPO PELO</b>	
<b>COLOR OJOS</b>	
<b>PIEL</b>	
<b>RAZA</b>	

**REM (Recuento de espermatozoides móviles): millones/ml**

## ANEXO IV

---

# PLANTILLAS DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

---

PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 1. Hoja Ciclo	Pág.2
PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 2. Vitricación de embriones	Pág.3
PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 3. Hoja ciclo oocitos vitrificados	Pág.4
PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 4. Vitricación de oocitos	Pág.5

---

Actualizado Enero 2016

---



### VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES

PACIENTE:

Nº HISTORIA:

TRATAMIENTO:

UBICACIÓN:

FECHA:

Nº CICLO:

Nº PAJUELAS:

COLOR:

VITRIFICACIÓN									
EMBRIÓN									
D+									
CALIDAD									
PAJUELA									

DESVITRIFICACIÓN				DESVITRIFICACIÓN				DESVITRIFICACIÓN				DESVITRIFICACIÓN			
PAJUELA															
FECHA DV				FECHA DV				FECHA DV				FECHA DV			
D+ VITRI				D+ VITRI				D. VITRI				D+ VITRI			
% SUPERV.				% SUPERV.				% SUPERV.				% SUPERV.			
D+3				D+3				D+3				D+3			
D+4				D+4				D+4				D+4			
D+5				D+5				D+5				D+5			
D+6				D+6				D+6				D+6			
DESTINO				DESTINO				DESTINO				DESTINO			

OBSERVACIONES:

PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 2. Vitrificación de embriones.

PACIENTE:  
 PAREJA:  
 TIPO CICLO:

EDAD:  
 EDAD:

Nº HISTORIA:

Nº CICLO:

OOCITOS DV		SUPERVIVENCIA		DONANTE										Nº DONANTE																						
FECHA																																				
Nº	D+0						D+1			D+2					D+3				D+4			BLASTOCISTO		DESTINO												
	ESTADIO	Granulosidad	REL	Vacuolas	EPV	CP	ZP	PATRÓN	1 NPB	PN Separados	PN Desiguales	Nº CÉLULAS	ES/NES	Fragmentación	NUCLEACIÓN			Vacuolas	CALIDAD	Nº CÉLULAS	ES/NES	Fragmentación	NUCLEACIÓN			Vacuolas	CALIDAD	Nº CÉLULAS	COMP. > 50%	Fragmentación	Vacuolas	D+5	D+6			
1																																				
2																																				
3																																				
4																																				
5																																				
6																																				
7																																				
8																																				
9																																				
10																																				
11																																				
12																																				
13																																				
14																																				
15																																				
OBSERVACIONES:																																				
TRANSFERENCIA:																																				
SEMEN	PAREJA	DÍAS DE ABSTINENCIA				DONANTE	REF:				DIAGNÓSTICO																									
VOLUMEN	ml	CONCENTRACIÓN		mill/m	MORFOLOGÍA	VITALIDAD				REM	mill/ml																									
MOTILIDAD TOTAL		PROGRESIVA			NO PROGRESIVA			INMÓVILES				MACS																								

PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 3. HOJA CICLO OOCITOS DESVITRIFICADOS.

PACIENTE:  
 N° HISTORIA:  
 FECHA VITRIFICACIÓN:  
 UBICACIÓN:  
 PAJUELA (S)/ COLOR:

N° OOCITOS:

VITRIFICACIÓN										
N° OOCITOS										
ESTADIO										
N° PAJUELA										

DESVITRIFICACIÓN			
FECHA 1º DESVITRIFICACIÓN			
N° PAJUELA/S DV			
OOCITOS SOBREVIVEN/OOCITOS TOTALES		PORCENTAJE	

FECHA 2º DESVITRIFICACIÓN			
N° PAJUELA/S DV			
OOCITOS SOBREVIVEN/OOCITOS TOTALES		PORCENTAJE	

FECHA 1º DESVITRIFICACIÓN			
N° PAJUELA/S DV			
OOCITOS SOBREVIVEN/OOCITOS TOTALES		PORCENTAJE	

OBSERVACIONES

**PLANTILLA EMBRIOLOGÍA 4. VITRIFICACIÓN DE OOCITOS.**

## **ANEXO V**

---

# **HOJAS DE REGISTRO DE ACTIVIDAD**

---

<b>PLANTILLA ACTIVIDAD 1. Ciclos.</b>	<b>Pág.2</b>
<b>PLANTILLA ACTIVIDAD 2. Congelación de embriones</b>	<b>Pág.3</b>
<b>PLANTILLA ACTIVIDAD 3. Congelación de oocitos</b>	<b>Pág.4</b>
<b>PLANTILLA ACTIVIDAD 4. Congelación de semen</b>	<b>Pág.5</b>
<b>PLANTILLA ACTIVIDAD 5. Registro de donantes de semen</b>	<b>Pág.6</b>
<b>PLANTILLA ACTIVIDAD 6. Registro de donantes de oocitos</b>	<b>Pág.7</b>

---

Actualizado Enero 2016

---



CONGELACIÓN DE EMBRIONES													
FECHA	PACIENTE	Nº HISTORIA	Nº CICLO	Nº EMBRIONES	DÍA DESARROLLO	CALIDAD	Nº PAJUELAS	RESTANTES	COLOR PAJUELAS	CONT.	Nº CANESTE	COLOR	OBSERVACIONES

**HOJA DE REGISTRO DE ACTIVIDAD 2. Congelación de embriones**



CONGELACIÓN OOCITOS										
FECHA	REFERENCIA	Nº HISTORIA/PROCEDENCIA	Nº OOCITOS	ESTADÍO	CALIDAD	Nº PAJUELAS	COLOR PAJUELAS	CONT.	Nº CANESTE	COLOR

**HOJA DE REGISTRO DE ACTIVIDAD 3. Congelación de oocitos.**



DONANTES DE OOCITOS														
DONANTE	NOMBRE	F.NACIMIENTO	CARIOTIPO	HIJOS	GRUPO	TALLA	PESO	COLOR DE PIEL	COLOR DE OJOS	COLOR DE PELO	TEXTURA	RAZA		
	Nº DONACIONES	Nº NACIDOS	Nº ABORTOS	FECHA PUNCIÓN/DV	Nº HISTO	OOCITOS PUNCIÓN	MII	nº OOS DV	SUPERVIVENCIA	VITRI RESTANTES	Nº FECUNDADOS	RESULTADO FRESCO	RESULTADO DV	OBSERVACIONES

**HOJA DE REGISTRO DE ACTIVIDAD 6. Registro de donantes de oocitos.**

## ANEXO VI

---

# HOJAS DE REGISTRO DE MANTENIMIENTO

---

PLANTILLA MANTENIMIENTO 1. Mantenimiento de equipos diario, semanal y mensual. Pág.2

PLANTILLA MANTENIMIENTO 2. Cambio de medios. Pág.3

---

Actualizado Enero 2016

---

FECHA															
DIARIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C60 Tª															
C60 CO2															
G210 Tª															
G210 CO2															
G210 O2															
SUPERFICIES CALEFACTADAS															
FRIGORIFICO															
CONGELADOR															
CLIMATIZACIÓN															

SEMANAL (Con equipo de medida)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C60 Tª															
C60 CO2															
G210 Tª															
G210 CO2															
G210 O2															
RELLENADO CONT.1															
RELLENADO CONT.2															

MENSUAL															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Microscopio invertido															
Micromanipuladores															
Microscopio contraste de fases															
Superficies calefactadas															
Frigorífico (máx/min.)															
Congelador (máx/min.)															
Limpieza incubador C60															
Limpieza incubador g210															

**PLANTILLA DE REGISTRO DE MANTENIMIENTO 1. Mantenimiento de equipos diario, semanal y mensual.**

FECHA							
ACEITE	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
IVF	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
MEDIO CULTIVO ÚNICO	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
MEDIO TAMPONADO	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
VITRIFICACIÓN	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
DESVITRIFICACIÓN	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
HYALURONIDASA	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						
PVP	NOMBRE LAB.						
	FECHA CAD.						
	LOTE						

**PLANTILLA DE REGISTRO DE MANTENIMIENTO 2. Cambio de medios.**

**INDICADORES  
DE CALIDAD**

**ANEXO VII**

Indicadores ASEBIR y sus especificaciones:  
mínima, deseable y óptima.

Actualizado  
Junio de 2016

ANEXO VII

INDICADORES DE CALIDAD

INDICADOR		Óptimo	Deseable	Mínimo
Porcentaje de fecundación normal FIV/ICSI	Propios	73,5 (70,2-79,2)	63,2 (62,3-65,2)	58,1 (56,7-59,5)
	Donados	78,9 (75,7-92,5)	70,3 (69,4-73,0)	66,3 (65,4-67,2)
Porcentaje fallo total de fecundación normal	FIV		10,0	
	ICSI		3,0	
Porcentaje de ovocitos degenerados post-ICSI			8,0	
Porcentaje de gestación clínica por transferencia	FIV/ICSI propios fresco	43,5 (39,1-54,9)	32,7 (30,7-34,5)	25,2 (23,4-27,1)
	TE FIV/ICSI ovo propios crioconservados	52,3 (50,0-66,7)	41,0 (36,4-48,6)	33,3 (25,0-34,0)
	FIV/ICSI donados fresco	60,0 (54,7-78,9)	42,9 (41,6-47,6)	25,3 (25,0-36,1)
	TE FIV/ICSI ovo donados crioconservados	63,8 (51,3-85,7)	45,1 (36,4-51,1)	28,0 (20,0-36,4)
Tasa de implantación	FIV/ICSI propios fresco	30,2 (26,2-37,2)	20,0 (19,0-21,6)	14,5 (13,8-15,3)
	TE FIV/ICSI ovocitos propios crioconservados		85% de la observada en fresco	
	FIV/ICSI donados fresco	44,1 (37,9-57,1)	29,7 (24,9-31,2)	16,5 (13,0-19,5)
	TE FIV/ICSI ovocitos donados crioconservados		85% de la observada en fresco	
Porcentaje de gestación clínica por transferencia de preembriones crioconservados	Ovocitos propios	37,3 (32,7-65,6)	22,1 (20,4-24,7)	13,3 (12,0-15,6)
	Ovocitos donados	48,0 (37,6-83,3)	29,0 (25,0-31,9)	21,9 (16,7-23,8)
Tasa de implantación en ciclos de preembriones crioconservados	Ovocitos propios	26,4 (20,1-43,8)	13,6 (12,2-15,9)	6,9 (5,1-9,0)
	Ovocitos donados	34,6 (24,0-63,6)	15,0 (14,3-18,9)	7,6 (0,8-10,1)

INDICADOR		Óptimo	Deseable	Mínimo
Número de preembriones transferidos por embarazo	FIV/ICSI propios	4,3 (4,1-4,5)	5,9 (5,5-7,0)	7,7 (6,0-20,0)
	FIV/ICSI donados	3,1 (3,0-3,2)	4,4 (3,9-6,4)	7,4 (4,3-14,0)
	CT ovocitos propios	4,6 (4,0-5,0)	8,0 (6,4-10,0)	12,5 (8,0-29,0)
	CT ovocitos donados	3,5 (3,3-4,0)	7,0 (5,2-9,7)	9,7 (6,7-22,0)
Porcentaje de preembriones utilizados	FIV/ICSI propios	70,8 (66,0-90,1)	56,5 (54,8-58,3)	47,9 (45,4-50,4)
	FIV/ICSI donados	68,8 (62,9-88,8)	52,3 (48,7-55,9)	41,6 (41,4-42,9)
Porcentaje de supervivencia ovocitaria tras descriptoconservación	Ovocitos propios	91,1 (82,1-93,7)	75,2 (46,6 - 81,6)	35,9 (26,8- 46,6)
	Ovocitos donados	89,8 (83,1- 94,2)	80,0 (70,6- 82,3)	52,4 (49,3-70,4)
Porcentaje de supervivencia preembrionaria tras descriptoconservación	Ovocitos propios	84,5 (77,3-95,7)	60,8 (58,2-65,8)	45,7 (40,7-50,8)
	Blastocistos propios		15% más de la observada en embriones	
	Ovocitos donados	88,0 (83,3-96,9)	66,8 (61,1-72,4)	52,0 (46,1-55,0)
	Blastocistos donados		15% más de la observada en embriones	
Porcentaje de gestación clínica	IAC	18,2 (15,6-33,3)	10,2 (9,2-11,4)	6,3 (6,1-7,0)
	IAD	31,1 (25,0-50,0)	17,9 (15,4-19,6)	10,7 (9,2-11,4)
Porcentaje de supervivencia espermática tras descriptoconservación	Semen total congelado		35,0	
	Semen recuperado previo a la congelación		50,0	
Porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles progresivos	Swim up		25,0	
	Gradientes de densidad		35,0	
Tasa de gestación múltiple	FIV/ICSI propios	15,5 (13,9-16,6)	-	-
	FIV/ICSI donados	17,3 (11,6-22,7)	-	-

INDICADOR		Óptimo	Deseable	Mínimo
<b>Tasa de gestación múltiple</b>	IAC	<b>7,5</b> (6,3-8,3)	-	-
	IAD	<b>7,9</b> (6,7-9,6)	-	-
<b>Número medio preembriones por transferencia en fresco</b>	Ovocitos propios	<b>1,74</b> (1,72-1,75)	<b>1,81</b> (1,79-1,85)	<b>2,05</b> (1,96-2,37)
	Ovocitos donados	<b>1,73</b> (1,67-1,75)	<b>1,84</b> (1,82-1,89)	<b>2,06</b> (1,97-2,56)
<b>Porcentaje de preembriones crioconservados por ciclo</b>	Ovocitos propios	<b>38,5</b> (30,1-52,7)	<b>21,6</b> (17,0 -24,0)	<b>12,9</b> (11,2-13,7)
	Ovocitos donados	<b>45,2</b> (38,1- 68,8)	<b>28,4</b> (26,3-30,0)	<b>19,2</b> (18,2-21,2)