Változtatás átvezetésére

kötelezett példány: nem kötelezett példány:

Példány sorszám:

# AZ IVF LABORATÓRIUM MŰKÖDÉSE

# mp 002 arc

Készítette: Tóthné Varga Emese

 folyamatgazda

Átvizsgálta: Kádár Melinda

 MICS vezető

Jóváhagyta: Dr. Tándor Zoltán

 Igazgató

**M ó d o s í t á s o k**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Sorszáma** | **Dátuma** | **Leírása** |
| 1. | 2023. 10. 05. | 5. pont kiegészítése |
| 2. |  |  |
| 3. |  |  |

1. **Cél. Alkalmazási terület**

A DEKK ARC az Klinikai Központ ellátási területéhez tartozó biztosított, valamint ellátási területtől függetlenül biztosított, avagy térítéses ellátásban részesülő gyermektelenséggel küzdő párok számára nyújt szolgáltatást az asszisztált reprodukciós eljárások területén. Ezek közül alapvetően az IVF, ICSI eljárások és azok különböző változatai révén kíván segítséget nyújtani a meddő pároknak.

Az ARC elsődleges feladata magas színvonalú szolgáltatás nyújtása az in vitro fertilizációs eljárások területén, európai szintű sikerességi rátával és kiemelkedően jó betegelégedettségi mutatókkal.

Az intézetben dolgozó biológus munkatársak számára a tevékenységünk leírása, megismertetése.

1. **Hivatkozások**
* 1997 évi CLIV tv. az egészségügyről
* 002098 klinikai egészségügyi szakmai irányelv az infertilitás és szubfertilitás kivizsgálásáról és az asszisztált reprodukciós kezelésekről (2019)
* 30/1998. (VI.24) NM rendelet az emberi reprodukciós eljárások végzésére vonatkozó, valamint az ivarsejtekkel embriókkal való rendelkezésre és azok fagyasztva tárolására vonatkozó részletes szabályokról
* 60/2003 (X.20) ESZCSM rendelet az egészségügyi szolgáltatások nyújtásához szükséges szakmai minimumfeltételekről
* 49/1997. (XII.17) NM rendelet a kötelező egészségbiztosítási pénztár keretében igénybe vehető meddőségkezelési eljárásokról
* ESHRE Istanbul consensus on embryo assessment (2011)
* ESHRE Vienna Consensus (2015)
* ESHRE Revised guidelines for good practise in IVF laboratories (2015)
* ESHRE International evidence-based guideline for assessment and management of polycystic ovary syndrome (2018)
* ESHRE guideline ultrasound: oocyte pick-up (2019)

**3. Rövidítések**

ESHRE – European Society of Human Reproduction

ET – embrióbeültetés (embriotransfer)

HBA – hialuronsav kötő képesség ( hyaluronic acid binding test)

hCG – human chorialis gonadotropin

ICSI – intracitoplazmatikus spermium injektálás

IVF – in vitro fertilizáció

LH – luteinizáló hormon

AHA- asszisztált hatching

FSH- follikulus stimuláló hormon

1. **Szükséges létszám:**
* laborvezető (orvos, vegyész, gyógyszerész, biológus képesítéssel) min: 1 fő
* biológus /szakasszisztens min.1 fő

A feladatokat 3 fő biológus heti 40 órában látja el. A munkamegosztás megegyezés és a munka mennyisége szerint történik a vezető biológus irányításával.

1. **Szükséges eszköz**
* inverz mikroszkóp(ok): a petesejtek vizsgálatához, min: 1 db jelenleg. 2 db
* lamináris áramlású fülkék a steril munkához : min.1 db jelenleg: 3 db
* mikromanipulációs rendszer (inverz mikroszkóphoz csatl.) min.1 jelenleg: 3 db
* Polar Aide: petesejt osztódási orsóját láthatóvá tevő és minőségét vizsgáló rendszer
* spermium morfológiai vizsgáló rendszer
* vibrációmentes asztal
* sztereomikroszkóp (a petesejtek kereséséhez és a manipulációs munkához
* termosztátok, inkubátorok: a embriók tenyésztéséhez és a tápoldatok inkubálásához
* eü. tisztaságú gázok: a lamináris fülkék és a termosztátok működéséhez a megfelelő típusú reduktorokkal kiegészítve
* hűtőszekrény: az embriótenyésztéshez szükséges tápoldatok tárolásához
* szövettenyésztő minőségű, egyszer használatos, nem embriótoxikus laboratóriumi edényzet
* punkciós tűk, embriotranszferkatéterek (egyszerhasználatos, steril műanyageszközök, nem embriótoxikusak)
* motoros automatapipetták, egyszerhasználatos, steril szűrővel ellátott heggyel
* tápoldatok
1. **Művelet leírása**
	1. **Előkészületek petesejtnyeréshez, megtermékenyítéshez, tenyésztéshez**

A follikulusok aspirációja ultrahangvezérlés mellett, a hüvelyen keresztül, steril körülmények között történik.

**5.1.1.A petesejtnyerést megelőző előkészületek:**

A petesejtek leszívása előtti napon délután elkészítjük a páciens(ek) tenyésztő edényeit és kimérjük a petesejtnyeréshez és az embriótenyésztéshez szükséges tápoldatokat és azokat inkubátorokba helyezzük ekvilibrálás céljából.

 **5.1.2. Embriótenyésztés EmbrioScope plusz inkubátorban**

Az EmbrioScope plusz-ban történő tenyésztéshez speciális tenyésztőedény szükséges. Ezt az edényt a punkciót megelőző nap délutánján készítjük elő. Steril körülmények között, lamináris fülke alatt dolgozunk.

* 1. **Petesejtnyerés (punkció)**

 A folyamat során a steril kémcsőbe nyert follikulus folyadékot a biológus lamináris fülke alatt, steril körülmények között előmelegített steril nem embriótoxikus petricsészébe önti, sztereomikroszkóp alatt megkeresi benne a petesejteket, majd azokat steril Pasteur pipettával az előre elkészített, előmelegített (37 fok), nagy puffer kapacitású tápoldatba gyűjti. A petesejtnyerés idejét, a gyűjtött petesejtek számát és minőségét a reprodukciós eljárási nyilvántartási lapon rögzíti.

A tápoldatban átmosott petesejteket az előző nap elkészített fertilizációs médiumot tartalmazó tenyésztőedénynek a steril olajjal lefedett részébe helyezzük. Az edényen rögzítjük a páciens nevét és a nyert petesejtek számát, majd az edényt inkubátorba helyezzük. Itt várakoznak 2-5 órát a megtermékenyítésig.

**5.3. Konvencionális fertilizáció (IVF)**

A petesejtek 2-4 órás inkubálását követően steril fülke alatt kivesszük a fertilizációs edény olaj alatti rekeszéből, majd steril Pasteur pipettával megkezdjük azok mechanikus tisztítását. A folyamat során a pipettával folyamatosan fel-le mozgatjuk a petesejteket, így a folyadékáramlás lesodorja a petesejtekről a felesleges kumuluszsejteket. Ezt követően a megtisztított petesejteket elosztjuk a még nem használt rekeszekben, majd petesejtenként 100 000 megfelelően előkészített spermiumot mérünk steril pipettával hozzájuk. Tíz perc elteltével ellenőrizzük, hogy megfelelő számú spermiumot juttattunk-e be a petesejtekhez, majd visszahelyezzük az edényt az inkubátorba.

* 1. **Intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI)**

- a beavatkozás megkezdése előtti előkészítés

**-** enzimezés**:** hialuron savval megtisztítjuk a sejteket a kumulus sejtektől

**-** az ICSI edény előkészítése

**5.4.1. Az ICSI menete:**

A megtisztított petesejteket egyenként az ICSI dish-es edény mikrocseppjeibe helyezzük, miután egyesével beszámoztuk azokat. Az edény felső részébe kimért cseppekbe helyezzük a páciens férjének megtisztított spermiumait. Ezt követően elvégezzük egyesével az injektálásokat . Ehhez az előzőleg felhelyezett és 35 fokos szögben pozicionált mikrokapillárisokat az edénybe engedjük, a rendszert élesre állítva először kiválasztunk egy jó mozgású, érettnek látszó, kiváló morfológiájú spermiumot, immobilizáljuk azt az ICSI mikropipetta segítségével, majd a kiválasztott petesejtet tartalmazó mikrocseppben a tartó mikrokapilláris segítségével rögzített petesejtbe injektáljuk azt, a következő módon: a spermiumot tartalmazó injektáló mikrokapillárist a petesejt zona pellucidájához érintjük, miközben a végébe pozicionáljuk a hímivarsejtet. Ezt követően az injektáló kapillárissal behatolunk a petesejt belsejébe és megszívjuk, amíg az oolemma meg nem szakad. Amint megszakad a petesejt membránja a spermiumot visszahelyezzük az ooplazmába. Végül a tartókapilláris segítségével elengedjük a petesejtet.

Minden egyes elvégzett ICSI után feljegyezzük a tenyésztési lapon a petesejtek érettségét, minőségét és a szúrás eredményességét. Feltüntetjük a beavatkozás idejét és a beavatkozást végző biológus nevét. Előfordul. hogy nem minden petesejt érett, ilyenkor az éretlen sejteket nem injektáljuk visszatesszük őket a tenyésztő( érlelő) oldatba és másnap végezzük el a mikromanipulációt.

Ha befejeztük az injektálásokat, a fertilizált sejteket azonnal betesszük mikrokapilláris segítségével a tenyésztőoldatot tartalmazó előző napon elkészített mikrocseppes tenyésztőedénybe, majd az inkubátorba.

**5.4.2. PICSI**

Az érett spermiumok feje egy hialuronsav specifikus receptort hordoz, amely képes a petesejtet körülvevő cumulus oophorus rétegben levő hialuronsavhoz kötődni. A PICSI edény az az eszköz, amellyel kiválasztható az érett spermium a hialuronsavkötő képesség alapján.

**5.5. A megtermékenyülés (fertilizáció) ellenőrzése:**

**5.5.1.Hagyományos fertilizációt (IVF) követően**

 18-20 órával a fertilizációt követően, tisztítás után mikroszkóp alatt ellenőrizzük a megtermékenyülést. Az eredményt a páciens tenyésztési lapján rögzítjük.

**5.5.2.Intracitoplazmatikus spermium injektálást (ICSI) követően**

Másnap (16-18 órával az ICSI után) ellenőrizzük a fertilizáció eredményességét fűtött tárgyasztallal rendelkező inverz mikroszkóp alatt. Az eredményeket a fentebb (IVF) említett módon rögzítjük.

Mindkét esetben szabályos megtermékenyülésnek a 2 PN-es zigóta állapotot tekintjük. A szabálytalanul megtermékenyült petesejteket (3 PN, 1 PN) elkülönítjük a tenyészettől. A megtermékenyülés másik biztos jele a második sarki test megjelenése, illetve annak fragmentáltsága. Ezt is rögzítjük a tenyésztési lapon az értékelést végző biológus nevével együtt.

**5.5.3. Az embriók tenyésztése és osztódásuk ellenőrzése**

A zigótából fejlődő embriók osztódását naponta ill. kétnaponta ellenőrizzük. Nem szekvenális tenyésztés esetében csak a beültetés tervezett időpontja előtt nézzük meg az embriókat. Az ellenőrzéseket fűtött tárgyasztallal ellátott inverz mikroszkóp segítségével végezzük. EmbrioScopos tenyésztésnél a biológus számítógép megfelelő alkalmazásával részletesen ellenőrzi az embrió fejlődésének menetét több szempontot figyelembe véve. Ez esetben nem kell kivenni a fejlődő embriókat az inkubátorból!

48 órával a fertilizációt követően általában 2-4 sejtes,72 órával a megtermékenyülést követően 6-8 sejtes az embrió. Az osztódás sebességén kívül fontos a embriók szerkezetének ellenőrzése. A blasztomerek nagysága, a citoplazmában megfigyelhető rendellenességek (vakuola, granularitás) s a fragmentumok (sejtmag nélküli citoplazmás képződmények) alapján osztályozzuk az embriókat. Az értékelésnél figyelembe vesszük a blasztomerek nagyságát az azokban látható sejtmagok számát, annak eltérő mivoltát. Ennek eredményét a biológusok (naponta) rögzítik a páciens tenyésztési lapján, valamint az értékelést végző biológus neve is rögzítésre kerül.

A tenyésztés negyedik napjára az életképes embriók kompaktálódnak, eltűnnek a sejtek közötti éles határok. Ezen a napon nem ellenőrizzük a tenyésztést.

A tenyésztés 5. napjára (ritkán a 6.-ra) az embriók elérik a blasztocysta stádiumot. Ennek a stádiumnak az értékelése Gardner szempontjai (ESHRE Istambul consensus on embryo assesment) szerint történik. Ebben az értékelésben figyelembe vesszük az embrió expandáltságának mértékét, a belső sejtmassza ICM és a trophoektoderma állapotát, valamint az embrió hathcingelésének mértékét.

**5.6. Asszisztált Hatching**

Az embriók beágyazódási folyamatának fontos része a zona pellucida elvékonyodása és az embrió kiszabadulása . ez a folyamat elősegíthető mechanikusan, kémiai úton és lézerrel. A beavatkozás javallatai: -vastag zona pellucida (nagyobb mint 15 mikrométer) - 35év feletti életkor - magas FSH szint a ciklus harmadik napján-gyenge minőségű fragmentált embriók - fagyasztásból felengedett embriók - több sikertelen beavatkozás.

**5.7. A megtermékenyített embriók méhbe történő visszahelyezése (embriótranszfer)**

Az embriótranszfer napján a páciens tenyésztési lapján rögzített adatok elemzésének segítségével kiválasztjuk a beültetésre legalkalmasabb embriót (embriókat). Ha a beültetés a harmadik vagy második napon történik elvégezzük az embriók asszisztált hatching-ét. A beültetésre szánt embriókat az előző napon elkészített és inkubált, az embrió fejlettségi állapotának megfelelő tápoldatba helyezzük, steril olaj alá. Majd visszahelyezzük az edényt az inkubátorba.

A még jó minőségű, de beültetésre nem szánt embriókat, a páciens kérésének megfelelően fagyasztjuk (vitrifikáljuk). A kiválasztást végző embriológus nevét rögzítjük a páciens Reprodukciós nyilvántartási lapján illetve a beültetésre, ill. fagyasztásra szánt embriókat jelöli a biológus a páciens tenyésztési lapján.

A beültetés megkezdése előtt az embriókat áthelyezzük a többlyukú tenyésztőedény embrio glue-t tartalmazó vályatába steril mikrokapilláris segítségével. Steril fülkében fűtött tárgyasztalú sztereomikroszkóp alatt dolgozunk. A transzferkatéter tápoldattal történő átmosása után, transzferfecskendő segítségével felszívjuk az embrió(ka)t a katéterbe . A katéter végét egy kisebb cseppel lezárjuk, majd a biológus a beavatkozást végző orvos kezébe helyezi a katétert. Az orvos bevezeti a méh üregébe a katétert, majd a biológus befecskendezi annak tartalmát. A beavatkozást követően a biológus tápoldattal átmossa a katétert ellenőrizve, hogy nem maradt e benne embrió. A beavatkozást végző biológus nevét rögzítjük a páciens reprodukciós nyilvántartási lapján.

**5.8. Embriófagyasztás**

Az in vitro fertilizációs beavatkozásokhoz kapcsolódóan szükség lehet a reproduktív sejtek és szövetek, illetve embriók mélyhűtésére.

A fagyasztva tárolás feltételei:

**5.8.1. Személyi feltételek:**

A fagyasztva tárolást biológus vagy orvos végzettségű személy, vagy ezek valamelyikének felügyeletével olyan biológus asszisztens végezheti, aki legalább egy év gyakorlatot szerzett ivarsejtek, illetve embriók fagyasztva tárolásában, vagy igazolja, hogy fagyasztással kapcsolatos speciális akkreditált tanfolyamon vett részt.

A gyakorlat megszerzésért, illetve a tevékenység végzéséért az IVF labor vezetője a közvetlen felelős.

**5.8.2. Tárgyi feltételek**

Az IVF laboratóriumokban végzett fagyasztva tárolás során a szükséges szakmai minimumfeltételekről szóló jogszabályokban leírtakon kívül az alábbi műszerezettségi feltételeket kell biztosítani:

- cseppfolyós nitrogénes vagy gőzfázisú tároló(k) -150 fok alatti hőmérséklet

- számítógép vezérlésű, programozható fagyasztó automata berendezés

- a fagyasztáshoz szükséges oldatok

- műanyag hordozó (műszalma), műanyag kazetta, goblet, kaniszter (fém) különböző színekben

- a hordozók (tárolási egységek) steril zárásához szükséges eszközök, anyagok

- folyamatos folyékony nitrogén ellátás

**5.8.3. Az embriók tárolását kizáró körülmények.**

* jogszabályban előírt kizáró feltételek fennállása
* az embriók egyébként friss embriótranszferre alkalmatlanok
* az embriók a minősítési rendszer utolsó két kategóriájába tartoznak
* a pár az embriók mélyfagyasztását nem kéri

**5.8.4. Biztonsági előírások:**

* a fagyasztásra alkalmas laborműszereket, azok működőképességét folyamatosan ellenőrizni kell, az ellenőrzések időpontját, eredményét rögzíteni kell
* a fagyasztóautomaták programbeíró kódját csak a kijelölt személyek ismerhetik, a programok módosítását is csak ők végezhetik el, amely változtatásokat írásban is rögzíteni kell a laborprotokollban
* a fagyasztási eljárás megkezdése előtt a folyékony nitrogén szintjének ellenőrzése kötelező
* a fagyasztóautomata rendelkezzen szünetmentes áramforrással
* a tárolóedények folyékony nitrogén szintjének ellenőrzését vagy gépi ellenőrző és riasztó rendszerrel vagy manuális rendszerrel kell megoldani. Az ellenőrzések időpontját, valamint a tárolóedények folyékony nitrogénnel való feltöltésének idejét regisztrálni kell.
* a tároló, zárható edényeket tartalmazó helyiségbe illetéktelenek nem léphetnek be
* a páciensek, a fagyasztva tárolt ivarsejtek, embriók egyértelmű azonosíthatóságáról gondoskodni kell
* a fagyasztás és fagyasztva tárolás adatait megfelelő módon (fagyasztási napló, számítógép)

kell tárolni

* a fagyasztva tárolás dokumentációjának tartalmazni kell:
	+ a fagyasztva tárolást kérelmező páciens(ek) személyes adatait, a beleegyező nyilatkozatot, a rendelkezési nyilatkozatot, amelynek egy példányát a kérelmező aláírás után magánál tartja.

 Korábban lassú fagyasztást alkalmaztak 2 PN stádiumban, a korai osztódások szakaszában és blasztocysta stádiumban is. Napjainkban a vitrifikáció szinte teljesen átvette a lassú fagyasztás helyét a embriók mélyhűtésénél. Intézetünkben is ezt az eljárást alkalmazzuk, melyhez a Kitazato Vitrification Kit-CRYOTOP ® módszert alkalmazzuk. Ezzel a módszerrel petesejtek fagyasztására is van lehetőség. A folyamat menete a következő:

A fagyasztást szobahőmérsékletű fülkében végezzük kikapcsolt állapotban. Az oldatokat használat előtt hűtőből kivéve 1 órán át szobahőmésékleten inkubáljuk. Az oldatok kimérését előre elvégezhetjük. A reproplate első vájatába 300ul ES oldatot pipettázunk. A másik két vájatba 300-300 ul VS1 oldatot mérünk. Első lépésben Az embriókat az inkubátorból kivesszük és a denupet segítségével áthelyezzük az első (ES) oldatba minimális tápoldattal. Az időtartam 15 perc. Ha felúszik, vissza helyezzük a vájat aljába. Az idő eltelte után az embriót miniális folyadékkal át helyezzük a következő (középső) vájatba, ahol az első VS oldat van. Az embriót felszínén engedélyük ki, a maradék oldatot félre helyezzük és friss ES oldatot szívva levisszük a VS aljára, ahol csak az embriót engedjük ki, a maradék ES-t félre tesszük. Friss VS-t szívva az embriót néhányszor szuszpendáljuk a felesleges ES eltávolítására! Az embrió max. 30 mp-et tölthet és kapillárist kell a lépés előtt cserélni! A következő lépésben az embriót a második VS-be helyezzük át, itt már a VS aljába, a felesleges VS-t pedig ki dobjuk és friss VS-t szívva ismételjük az előbb részletezett lépést 2x. Itt szintén 30 mp-t tölthet maximum, ezt követően az embriót felszívva a CryoTop-ra helyezzük mikroszkóp alatt a fekete jel főlé kicsivel, minimális térfogattal (vékony hártya), majd a folyékony nitrogénbe merítjük. Ezt követően a CryoTopot a tartójába helyezzük és össze pattintjuk, majd végül a fagyasztó kazettába helyezzük ügyelve arra, hogy végig folyékony N2 alatt maradjanak.

Petesejt esetén az első vájatba 20 ul BS-t mérünk, ebbe helyezzük a petesejtet/eket. Következő lépésben 20 ul ES-t mérünk rá körkörös mozdulatot leírva, majd 3 perc inkubáció következik. Ezt a lépést még egyszer megismételjük. Végül 240 ul ES-t mérünk rá és 9 percig inkubálódik. Ezután a fent részletezett mosási lépések következnek. A petesejteket punkció után 2 órával előzetes enzimezést követően vitrifikáljuk.

* 1. **Embrió kiolvasztás**

Intézetünkben két módszert alkalmazunk a fagyasztva tárolt embriók felolvasztására:

* a korábbi lassú programozott fagyasztással történt fagyasztva tárolt embriók felengedését
* vitrifikáció után történő felolvasztást

A kiolvasztáshoz szükséges eszközök megegyeznek a fagyasztáshoz (vitrifikáció) szükséges eszközökkel. Ez a típusú kiolvasztó oldat egyaránt alkalmas a petesejt, a 2 PN-es zigóta állapotban, a többsejtes állapotban, és a blasztociszta állapotban lefagyasztott embriók kiolvasztására.

A felolvasztás előtt a TS oldatot 37 fokra, a DS és WS pedig szobahőmérsékleten inkubáljuk. A TS oldathoz használt kis petri csészét szintén 37 fokra helyezzük melegedni. A Reproplate 3 vájatába előre ki mérjük a be inkubált oldatokat. Az első vájatba 300 ul DS-t, a másik két vájatba 300-300ul WS-t mérünk. Felolvasztás előtt a TS oldat teljes tartalmát (3ml) bele öntjük az előre melegített kis petri csészébe, majd további felhasználásig vissza helyezzük 37 fokra. Közvetlenül a felhasználás előtt kivesszük a TS-t tartalmaztó edényt, majd a CryoTop hegyét bele helyezzük mikroszkóp alatt a TS oldatba és várjuk, hogy az embrió el váljon a CryoTop felszínéről. A bemerítés közben elindítjuk a stoppert, a folyamat 1 perc. A használt TS oldatot ne dobjuk ki, mert még egyszer fel lehet használni aznap! Amennyiben az CryoTop felszínéről nem vált le az embrió, azzal együtt visszük tovább a következő oldatba, ami a DS. Itt 3 percet tölt az embrió és úgy helyezzük az oldatba, hogy előtte minimális mennyiségű TS oldatot helyezük a Reproplate aljára , ahol a DS oldat van és ebbe helyezzük bele az embriót. 3 perc után az első mosó lépés jön, az előbb részletezett módon helyezzük a DS-ből az első WS-be az embriót, ahol 5 percet tölt. Ezután az első WS-ből a második WS-be helyezzük az embriót úgy, hogy annak a felszínén engedjük ki és hagyjuk, hogy a gravitáció hatására le szálljon az embrió a vájat aljába. Ezt a lépést többször ismételjük 1 percen át, majd a 37 fokra előre inkubált tenyésztő oldatba helyezzük át az embriót. Az embriók mozgatását hagyományos automata pipettával végezzük. Az embrió teljes feléledése 2 órát vesz igénybe, petesejt esetében a kiolvasztást követő 2 óra után kell a fertilizációt elvégezni!

A folyamat során az embrió és petesejt felolvasztása között nincs különbség.

**6. Kritériumok**

**6.1. Elfogadás kritériumai**

6.1.1. Szakmai megfelelőség (lásd szakmai minimum feltételek, illetve irányelvek)

6.1.2. Szakmai minimumfeltételek megléte

**6.2. Végrehajtás kritériumai**

6.2.1. A megfelelően képzett, illetve tovább képzett valamint létszámában az ellátási szükséglet kielégítéséhez elegendő számú személyzet.

6.2.2. Az intézet működési rendje