Változtatás átvezetésére

kötelezett példány: nem kötelezett példány:

Példány sorszám:

**AZ ANDROLÓGIAI LABORATÓRIUM MŰKÖDÉSE**

**mp 003 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. | 2025.09.08. | 6.2.3 pont módosítása |
| 2. |  |  |
| 3. |  |  |

1. **Cél. Alkalmazási terület**

A dokumentum célja az Intézetünk (DEKK ARC) andrológiai laboratóriumában folyó tevékenységek szabályozása , mely szerves része az Intézetünk IVF laboratóriumában folyó munkáknak.

1. **Hivatkozások**
* WHO V. (2010)
* 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
* ESHRE Revised guidelines for good practise in IVF laboratories (2015)

The Vienna Consensus: report of an experting meeting on the development of ART laboratory performance indicators

**3. Meghatározások, rövidítések**

DEKK- Debreceni Egyetem Klinikai Központ

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology

HBA – hialuronsav kötő képesség ( hyaluronic acid binding test)

IVF – In vitro fertilizáció

CASA- egy mikroszkópba épített digitális fényképezőgép általi képrögzítésre alkalmas szoftver. /Computer Assistant Sperm Analisator/

**4. Szükséges létszám**

A feladatokat két fő laboratóriumi szakasszisztens heti 40 órában látja el. A munkamegosztás megegyezés és a munka mennyisége szerint történik, minden esetben a biológusokkal egyeztetve.

**5. Szükséges eszközök**

* lamináris áramlású fülke a steril munkához,
* termosztát, az oldatok és ejaculátumok kapacitációjához,
* melegítőlap: az inkubálást nem igénylő oldatok és vizsgálati anyagok megfelelő hőfokon
* fáziskontraszt mikroszkóp a humán ejaculátumok vizsgálatához, spermium analízishez (CASA-hoz kapcsoltan),
* számítógépes spermium analizátor a humán spermiumok számlálásához, mozgásának értékeléséhez, morfológiai elemzéséhez,
* Makler kamrák spermiumszámláláshoz,
* automata fagyasztóval összekötött folyékony nitrogéntároló és ellátórendszer, a fagyasztókészülék folyamatosan folyékony nitrogénnel való táplálásához és a gőzfázisú tárolóegység megfelelő szinten tartásához,
* nitrogéntartályok, a fagyasztott ivarsejtek és embriók tárolásához,
* programozható centrifuga, mely a biológiai minták centrifugálására szolgál,
* automata pipetták, több mérettartományban, steril egyszer használatos heggyel ellátva, a mintavételekhez,
* eü. tisztaságú gázok (szén-dioxid, nitrogén-karbogén) a termosztátok és a lamináris fülke működtetéséhez, a megfelelő típusú reduktorokkal,
* szövettenyésztő minőségű (nem embrió toxikus) egyszer használatos laboratóriumi edényzet (spermatartály, centrifugacső, petricsésze, pipettahegyek) a laboratóriumban folyó steril munkákhoz,
* fagyasztószalmák, tároló kazetták, konzolok, a biológiai minták fagyasztásához és fagyasztva tárolásához különböző színekben és méretben
* hűtőszekrény, a reagensek, kitek, tenyésztőoldatok, fagyasztóoldatok megfelelő hőmérsékleten történő tárolásához
* analitikai mérleg
* tárgylemezek, fedőlemezek, folyadékhőmérők, pH mérő, stopperórák, ollók, csipeszek, a laboratóriumi munkafolyamatok végzéséhez és ellenőrzéséhez
1. **Művelet leírása**
	1. **A laboratóriumba érkező anyagok** (tenyésztő oldatok, festékek, reagensek, kitek, vizsgálati anyagok**) átvétele, tárolása, felhasználásukra vonatkozó rendszabályok betartása.**

Minden alkalommal ellenőrizzük, hogy a minta szállítása megfelelő hőmérsékleten történt. Hűtve tárolandó oldat nem melegedhet fel és nem fagyhat meg a szállítás közben. 2-8°C közötti laboratóriumi hűtőszekrénybe helyezzük.

Kapcsolódó szállítási papírt minden esetben ellenőrizzük átvétel közben.

**6.2. A vizsgálati anyagok feldolgozása** **(humán ejaculátum, hereszövet, fagyasztott**

 **ivarsejtek, HBA teszt, spermiogram készítése)**

A beérkezett mintát 37,0°C-os termosztátba helyezzük, állandó CO2, O2 és N2, valamint páratartalmon inkubáljuk.

A minta elfolyósodását követően elkezdjük az ejaculátum feldolgozását.

A spermiumpreparálás célja a mintában található jól mozgó és jó minőségű spermiumok

 izolálása laboratóriumi módszerekkel (mosás, centrifugálás, speciális tápoldatok).

**6.2.1. A minta makroszkópos elemzésekor:**

Vizsgáljuk a minta viszkozitását, megmérjük térfogatát esetleg a pH-ját (lakmuszpapírral). Normál esetben a minta színe opálos, vadgesztenye illatú, térfogata 2-3 ml közötti, pH-ja 7,2-7.8.

**6.2.2. A minta mikroszkópos elemzése**

Erre a célra Makler kamrát használunk: Egy csepp elfolyósodott ejakulátumot teszünk a kamrára, majd azt annak fedő lapjával buborékmentesen lefedjük.

**A vizsgált spermiumminta mozgásának értékelése**: Becsléssel történik, százalékban adjuk meg. A spermiumokat mozgásuk alapján három csoportba osztjuk:

- 3: előre haladó célirányos mozgás

- 2: nem célirányos lassú vagy helyben mozgó alakok.

 - 0: nem mozgó alakok.

A mikroszkópos elemzéskor megfigyelt fehérvérsejtek (esetleg vörös vértestek) sejttörmelékek, vegyes baktériumok, egyéb sejtalkotók jelenlétét is rögzítjük.

**A vizsgált spermiumminta számának értékelése:**

Erre a célra Makler kamrát használunk: Egy csepp elfolyósodott ejakulátumot helyezünk a kamra számláló felületére, majd azt buborékmentesen lefedjük. A mikroszkópon a nagyítást 20x-os nagyítás mellett 5 perc várakozás után 10 kockában elvégezzük a számlálást. Az így kapott értéket 106-ra emelve megkapjuk millió/milliliter koncentrációját a mintában lévő sejtszámnak.

**6.2.3. Sűrűség grádiens szeparálás**

* Steril fecskendő segítségével 0,5-1,5 ml 90%-os SpermGrad oldatot mérünk egy steril, nem embriotoxikus kúpos műanyag centrifugacsőbe
* Ezt követően a rétegre 0,5-2,0 ml ejakulátumot mérünk egy steril tűvel ellátott fecskendővel.
* Az így előkészített mintát 20 percig centrifugáljuk 300 g-n
* Majd steril tű segítségével a felső réteget és az abban maradt ejaculátumot óvatosan eltávolítjuk
* Ezt követően 1,0-2,5 ml ekvillibrált SperRinse oldatottal szuszpendáljuk
* Centrifugáljuk 10 percen keresztül 400 g-n
* Óvatosan eltávolítjuk a felülúszót steril tű segítségével, majd a minta minőségétől függően 0,2-0,4 ml ekvilibrált G-IVF Plus tápoldatot rétegzünk rá
* Inkubátorba helyezzük maximum 60 percre (minta minőségétől függően)
* Majd 0,1 ml-t leszívunk a felülúszóból és egy műanyag kémcsőbe fecskendezzük
* Makler kamra segítségével megvizsgáljuk a preparált mintát

**6.2.4. Spermiumfagyasztás**

A humán hímivarsejtek mélyfagyasztott állapotban hosszú ideig megőrzik életképességüket. Az ivarsejtek fagyasztását (jelen esetben spermiumfagyasztást) biológus, embriológus vagy biológus asszisztens, andrológiai laboratóriumi asszisztens végezheti, aki legalább egy év gyakorlatot szerzett ivarsejtek fagyasztásával illetve igazolja, hogy spermium fagyasztással kapcsolatos tanfolyamon vett részt.

Az embriológiai illetve andrológiai laboratóriumokban végzett fagyasztás, fagyasztva tárolás és felolvasztás során a szükséges szakmai minimumfeltételekről szóló jogszabályon kívül, az alábbi műszerezettséget kell biztosítani:

* cseppfolyós nitrogénes vagy gőzfázisú tároló(k) mínusz 196 fok alatti hőmérséklettel
* számítógép vezérlésű programozható automata fagyasztókészülék (vitrifikáció illetve párában történő fagyasztás esetén nem szükséges)
* fagyasztáshoz szükséges oldatok
* műanyag hordozók (műszalmák, kazetták, gobletek, kaniszterek) különböző színekben
* a műszalmák steril zárásához szükséges eszközök, anyagok
* folyamatos folyékony nitrogén ellátás

**6.2.5. Fagyasztott spermium kiolvasztása**

A kiolvasztásra kerülő mintát először 28°C-os vízfürdőbe helyezzük 5 percig, majd szobahőmérsékleten inkubáljuk további 10 percig. A közvetlen felhasználás megkezdéséig inkubátorban tartjuk. A minta feldolgozását a fentebb említett módon (6.2 pont) folytatjuk.

**Biztonsági előírások:**

* A fagyasztásra alkalmas műszerek működőképességét folyamatosan ellenőrizni kell
* A fagyasztás megkezdése előtt a folyékonynitrogén szintjének ellenőrzése kötelező
* A fagyasztó automata programbeíró kódját csak a kijelölt személyek ismerhetik, a programok módosítását is csak ők végezhetik el
* A tárolóedények folyékony nitrogén szintjének ellenőrzését vagy manuálisan vagy gépi úton kell megoldani, ahol megoldható riasztórendszerrel egybeépítve. Az ellenőrzések időpontját, valamint a feltöltések idejét regisztrálni kell egy naplóban.
* A tárolóedényeket zárni kell, illetéktelenek a zárak kinyitásához nem férhetnek hozzá.
* A páciensek ivarsejtjeinek egyértelmű azonosíthatóságáról gondoskodni kell a nemzetközi normákban előírtaknak megfelelően
* A fagyasztás és a fagyasztva tárolás adatait a spermiumfagyasztási naplóban és számítógépben is rögzíteni kell, mely utóbbiról biztonsági másolatokat kell készíteni.
* A fagyasztással kapcsolatos jogszabályban előírt dokumentációnak tartalmaznia kell a fagyasztást kérelmező személyes adatait, a beleegyező nyilatkozatot a rendelkezési nyilatkozatot. amelynek egy aláírt példányát a kérelmező az aláírása után magánál tartja.

**6.2.6. Spermiumok hialuronsav kötődésének vizsgálata (HBA teszt)**

A természetes megtermékenyítés során az érett spermiumok kötődnek a hialuronsavhoz, amely a petesejt cumulus oophorus mátrixának fő alkotóeleme. A hiarulonsavhoz való kötődés azt jelenti, hogy a spermium fejlődése sikeresen lezajlott. A hiarulonsavhoz kötődni képtelen spermiumok számos jelét mutatják az éretlenségnek. Citoplazmát és hisztonokat tartalmaznak, rendellenes morfológiájúak, genomikus egységük gyengébb. Az érett spermiumok a kémiai úton rögzített hialuronsavhoz is képesek kötődni. Mikroszkópban megtekintve őket: a fejükkel a hiarulonsavhoz kötődnek, a farkuk legyezőszerűen csapkod, de nem végeznek előrehaladó mozgást.

A HBA tárgylemez két egyező hialuronsavval bevont vizsgálókamrát tartalmaz. A mozgó kötött és nem kötött spermiumok közös területen való számlálása révén kiszámítható a kötődés aránya.

Az eredmények értékelése: A hiarulonsavhoz kötődő spermiumok százalékos aránya gyakorlatilag bármilyen érték lehet 0 és 100 % között. Az alacsony HBA pontszám kis számú érett spermiumot jelent, a terméketlenség valószínűsíthető. A megtermékenyítő képesség meghatározásakor nem szükséges, hogy az összes spermium kötődjön a hialuronsavhoz, de a kötődő spermiumok arányának el kell érnie egy hatékony szintet, hogy a megtermékenyülés nagy valószínűséggel bekövetkezzen. Ez az arány intézetünkben: 60 %.

**6.2.7. Spermiogram készítése CASA 3 automata spermium analizátorral**

CASA: egy mikroszkópba épített digitális fényképezőgép általi képrögzítésre alkalmas szoftver, az emberi spermaelemzés elősegítésére, a WHO iránymutatásainak megfelelően.

A vizsgált minta elfolyósodását és a korábban leírt makroszkópos elemzését követően indítjuk el a CASA spermium analizátor mintakezelő programját. Az elemzésről részletes dokumentum készül a kórlap illetve a páciens számára.

**6.3. A vizsgálatok és a keletkezett adatok naplókban és számítógépben való rögzítése, aktualizálása, statisztikák készítése**

Az andrológiai laboratóriumban keletkezett leletek, adatok rögzítése és tárolása részben a jogszabályokban rögzített módon és formában történik. Az intézet által létrehozott és alkalmazott papír, illetve elektronikus formában keletkezik, tárolódik és őrződik. Az ivarsejt laboratórium tevékenységéről a jogszabályban előírt módon és alkalmanként készül éves jelentés hazai, illetve külföldi szervezetek számára.

**6.4. A fagyasztott ivarsejtek** **(petesejtek, hímivarsejtek)** **és a fagyasztva tárolt embriókra vonatkozó adatok kezelése**

A tárolási idejének ellenőrzése, a páciensek kiértesítése a fagyasztva tárolás idejének lejártáról, illetve a fizetési kötelezettség elmaradásáról, a fagyasztás, fagyasztva tárolás illetve felolvasztás során keletkezett dokumentumok kezelése, számítógépben és naplókban való rögzítése (megkülönböztetett figyelemmel a fagyasztva tárolt ivarsejtek és embriók megsemmisítésére, vagy azok más anonim személyek részére történő felajánlására) az andrológiai illetve embriológiai laboratórium dolgozóinak a feladata.