



# Wytyczne ESHRE dla Dobrej Praktyki w Laboratoriach IVF

M. Cristina Magli, Etienne Van den Abbeel\*, Kersti Lundin,  
Dominique Royere, Josiane Van der Elst and Luca Gianaroli

for Committee of the Special Interest Group on Embryology



Human Reproduction Vol.23, No.6 pp. 1253–1262, 2008

# Zrewidowane wytyczne dla dobrej praktyki w laboratoriach zapłodnienia in vitro

- 1. Personel i dyrekcja
- 2. Polityki i procedury
- 3. Bezpieczeństwo laboratorium
- 4. Identyfikacja pacjentów i ich gamety, zygoty i zarodki
- 5. Przygotowanie pożywek i testująca kontrola jakości
- 6. Obchodzenie się z zarodkami, zygotami, komórkami jajowymi i plemnikami
- 7. Izolowanie komórki jajowej
- 8. Przygotowanie nasienia
- 9. Inseminacja komórek jajowych
- 10. Ocena zapłodnienia
- 11. Hodowla zarodków i przenoszenie
- 12. Kryokonserwacja gamet, zygot i zarodków
- 13. Wspomaganie wylęgania się zarodka
- 14. Przed implantacyjną diagnostyką genetyczną
- 15. Kontrola jakości i gwarancja jakości

# Personel i dyrekcja (1)

- 1.1 Laboratorium powinno być kierowane przez stosownie wykwalifikowaną, doświadczoną i odpowiedzialną osobą po studiach skończonych odpowiednim dyplomem w dziedzinie embriologii, biologii albo medycyny według obowiązujących reguł w danym kraju.
- 1.2 Odpowiedzialność dyrektora laboratorium powinna dotyczyć:
  - 1.2.1 Zapewnienia , że sprzęt laboratoryjny jest odpowiedni i bezpieczne przez systematycznie kontrolowanie ich działania i przechodzące okresowe utrzymanie.
  - 1.2.2 Zapewnienia istnienia napisanych procedur dla wszystkich technik wspomaganego rozrodu i nadzoru na stosownie wykonane procedur przez personel laboratorium.
  - 1.2.3 Aktualizowanie i uaktualnienie księgi procedur i zapewnić , że tylko uaktualniona wersja księgi jest dostępna w laboratorium.
  - 1.2.4 Zweryfikowanie , że wszystkie procedury są wykonane zgodnie z systemem kontroli jakości.

# Personel i dyrekcja (2)

- (c.d) Odpowiedzialność dyrektora laboratorium powinna dotyczyć:
- 1.2.5 Zapewnienie, że odpowiednia liczba pracowników znajdują się w laboratorium, zapewniająca optymalnej realizacji zaoferowanych technik w stosunku do ich obciążenia w danym momencie.
- 1.2.6 Zapewnienie, że cały nowy personel został odpowiednio instruowany i orientowany i otrzymał program wprowadzenia. Początkujący powinni przejść przez program szkolenia pod kierunkiem i kontrolą doświadczonych embriologów i dyrektora laboratorium.
- 1.2.7 Zorganizowanie i skontrolowanie szkolenie pracowników laboratorium i zapewnić, że personel otrzymują bezustanną naukową i medyczną edukację.
- 1.2.8 Zapewnianie, że odpowiedzialność indywidualna każdego członka personelu i ich odpowiedzialności są zdefiniowane i wskazane w napisanych procedurach, które są znane i akceptowane przez wszystkich członków personelu.
- 1.2.9 Starać się o regularna wymiana informacji i dyskusja z klinicznymi kolegami.

**Table 2.2 Personnel qualifications recommended for embryology programs by the American Society for Reproductive Medicine<sup>2</sup>**

**Laboratory Director: must satisfy one complete row**

Degree <sup>a</sup>	Certification	Experience <sup>b</sup>	ART procedures <sup>c</sup>
PhD, <sup>d,e</sup> MD, <sup>e</sup> or DO <sup>e</sup>	In embryology	2 years	60 ART procedures
No doctoral degree	In embryology, qualification prior to January 1992	2 years	60 ART procedures

**Supervisor<sup>f</sup>: must satisfy one complete row**

Degree <sup>a</sup>	Experience <sup>b</sup>	ART procedures <sup>c</sup>
Master's or Bachelor's Degree <sup>d</sup>	6 months	60 ART procedures

**Technologist: must satisfy the complete row**

Degree <sup>a</sup>	ART procedures <sup>c</sup>
Bachelor's Degree <sup>d</sup>	30 ART procedures, under supervision

<sup>a</sup>Degree should be from an accredited institution.

<sup>b</sup>Documented pertinent experience in a program performing IVF-related procedures, including quality control, detailed knowledge of cell culture, ART, and andrology procedures.

<sup>c</sup>Number of ART procedures completed (each procedure including examination of follicular aspirates, insemination, documentation of fertilization, and preparation for embryo transfer) in a program performing at least 100 IVF procedures per year with a minimum annual 10% IVF live birth rate per retrieval.

<sup>d</sup>Degree should be from an accredited institution, in a chemical, physical, or biological science as the major subject.

<sup>e</sup>Education should include expertise and/or special training in biochemistry, cell biology, and physiology of reproduction with experience in experimental design, statistics, and problem solving/trouble shooting.

<sup>f</sup>If the laboratory director is also the medical director, there should be a qualified designated supervisor.

**Table 2.3 Staffing norms for ART facilities in the United States**

Number of IVFs	Average number of laboratory staff	
	McCulloh <sup>a</sup>	Boone and Higdon <sup>b</sup>
0	0.47	2.92
100	1.6	4.3
250	3.3	6.4
400	5.0	8.5
1000	11.7	16.9

**Table 2.5 List of equipment, parameters for QC, and frequency of QC**

Equipment	Parameter for QC	Frequency of QC	Comments
Incubator	Temperature	Daily	Annual preventive maintenance
	CO <sub>2</sub>	Daily	
	Humidity	Daily	
Heating surfaces	Temperature	Daily	
Heating bath	Temperature	Daily	
	Water level	Daily	
Heating block	Temperature	Daily	
Microscope	Image quality	Daily	Annual preventive maintenance
CASA	Sperm count	Daily	Annual preventive maintenance
	Motility (%)	Daily	
	Motility (velocities)	Daily	
	Morphology (%)	Daily	
Controlled rate freezer	Sufficient refrigerant	Each use	Annual preventive maintenance
	Start temperature	Each use	
	Seeding temperature	Each use	
	Final temperature	Each use	
Storage dewers	Liquid N <sub>2</sub> level	Daily	
Refrigerator	Temperature	Daily	
Freezer	Temperature	Daily	
Heating, ventilation, and air conditioning systems	Room temperature	Daily	Clean filters/humidifiers periodically
	Room humidity	Daily	
<b>QC equipment</b>			
Thermometers	Temperature (accuracy/precision)	Periodically	
pH meters	pH (accuracy/precision)	Each use (daily)	Annual preventive maintenance
Osmometers	Osmolality (accuracy/precision)	Each use (daily)	Annual preventive maintenance
Hygrometers	Humidity (accuracy/precision)	Periodically	
Timers	Time (accuracy/precision)	Periodically	
CO <sub>2</sub> monitor	%CO <sub>2</sub> (accuracy/precision)		Fyrite should be changed every 300 determinations

QC, quality control; CASA, computerized semen analyzer.

## 2. Polityki i procedury

- 2.1 Wszystkie procedury laboratorium muszą zapewnić właściwą i dokładną identyfikację pacjentki, gamet, zygot i zarodków , równocześnie powinny zapewniać poufności danych.
- 2.2 Powinna być dostępna w laboratorium, uaktualniona wersja szczegółowych instrukcji dla wszystkich używanych procedur.
- 2.3 Napisany, podpisany i datowany protokoły powinny istnieć dla każdej procedury , która jest wykonana w laboratorium.
- 2.4 W instrukcjach muszą być napisane procedury dotyczące niepoprawnej albo niekompletnej identyfikacji prób i ich zapisu w odpowiednich dokumentach. Również powinno się zarejestrować jakimkolwiek niezastosowaniem się do procedur, wyjątkową sytuacją albo niepożądanym zdarzeń.
- 2.5 Laboratorium i kliniczne wyniki (tj. odsetek zapłodnień, odsetek ciąży biochemicznych i klinicznych, itp.) powinny być regularnie uaktualniony, podsumowywany i dyskutowany i być dostępny dla całego personelu. W razie konieczności, odpowiednie działanie powinno być zainicjowane.
- 2.6 Rejestr powinien być utrzymany by pozwolić na regularną ocenę wyników, włączając rejestr działań każdego pojedynczego operatora.
- 2.7 Każda komunikacja z innymi (klinicyści, genetycy, pielęgniarki i administracja) powinna być wyszczególniona przez napisane procedury.
- 2.8 Biorąc pod uwagę wysokiego stopnia uwagi potrzebnej podczas pracy embriologa albo praca technika laboratoryjnego, jakakolwiek komunikacja z laboratorium, takie jak rozmowy telefoniczne, powinny być zatrzymane do minimum.



**Table 2.4 Preparing a protocol<sup>a</sup>: when preparing a written protocol, include the following information**

Principle and/or purpose of the test	Provide a general outline of the point of the procedure and how the procedure is performed
Specimen required for the test	Describe any instructions necessary to be certain that the specimen is collected in a way that will assure correct processing and testing
Reagents, standards, controls, media	List any materials needed to perform the procedure
Instrumentation	List any instruments to be used and any quality control procedures needed to assure that the instrument is functioning correctly
Step-by-step instructions	Carefully describe in narrative form exactly how the procedure is to be performed
Calculations	Describe how to perform any necessary calculations
Frequency and tolerance of controls	Describe any controls that should be run to assure quality of the performance of the procedure
Expected values	List expected values for the results so that the performer will know if the values are within a reasonable range
Limitations	Describe any limitations on the interpretation of the results or on the utility of the procedure
References	List sources of information that the user may wish to consult if questions arise
Effective date and schedule for review	Indicate the date that the procedure will become effective, and date(s) that it is scheduled for review
Distribution	List all persons/locations to which the procedure has been sent
Author	List the person who wrote the procedure

<sup>a</sup>From NCCLS GP2-A3.<sup>12</sup>

# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(1)

- 3.1 Projektowanie laboratorium
- Budowa laboratorium powinno zapewnić warunki sterylne i optymalne warunki dla manipulacji gamet, zygot i zarodków na wszystkich etapach procedury.
- Pomimo że nie ma udokumentowanych przypadków wirusowej kontaminacji ze względu na jakość powietrza. Odnotowano lepsze wyniki po filtracji powietrza z pyłów i lotnych związków dostarczanego do pomieszczeń laboratoryjnych i klinicznych powietrza. Należy rozważyć utrzymanie czystych warunków powietrza. Ponadto, nadciśnienie laboratorium może przyczynić się do wyłączenia zanieczyszczeń z zewnętrznych obszarów.
- Pokoje do zmiany ubrania powinny być umieszczone w pobliżu laboratorium, posiadające urządzenia do mycia rąk.
- Dostęp do laboratorium powinno być ograniczone tylko do upoważnionego personelu.

**Table 2.6 Contact materials and availability of prior mouse embryo testing**

Item	Available with prior mouse embryo assay?
Culture medium	Yes
Culture dishes	Yes
Embryo transfer catheters	Yes
Pipettes, serological	No, requires testing
Pipettes, micropipettes for moving embryos	Yes
Pipettes, Pasteur	Yes
Microtools for ICSI, AZH, and holding	Yes
Centrifuge tubes	No, requires testing
Culture tubes	No, requires testing
Pipette tips	Yes
Gases for maintenance of CO <sub>2</sub> levels	No, requires testing
Filters for gases or medium	No, requires testing

ICSI, intracytoplasmic sperm injection; AZH, assisted zona hatching.

**Table 3.1 ISO 17025:2005 standard table of contents**

**4 Management requirements**

- 4.1 Organization
- 4.2 Management system
- 4.3 Document control
- 4.4 Review of requests, tenders and contracts
- 4.5 Subcontracting of tests and calibrations
- 4.6 Purchasing services and supplies
- 4.7 Service to the customer
- 4.8 Complaints
- 4.9 Control of nonconforming testing and/or calibration work
- 4.10 Improvement
- 4.11 Corrective action
- 4.12 Preventive action
- 4.13 Control of records
- 4.14 Internal audits
- 4.15 Management reviews

**5 Technical requirements**

- 5.1 General
  - 5.2 Personnel
  - 5.3 Accommodation and environmental conditions
  - 5.4 Test and calibration methods and method validation
  - 5.5 Equipment
  - 5.6 Measurement traceability
  - 5.7 Sampling
  - 5.8 Handling of test and calibration items
  - 5.9 Assuring the quality of test and calibration results
  - 5.10 Reporting the results
-

**Table 2.1 Personnel qualifications required for high-complexity testing in andrology laboratories as specified by the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA '88)<sup>1</sup>**

**Laboratory Director (or Clinical Consultant) must possess Laboratory Director License in the state (if available) and satisfy one complete row**

Degree <sup>a</sup>	Certification	Experience <sup>b</sup>	Supervision <sup>c</sup>
MD, or DO, and licensed to practice medicine in the state	Anatomic pathology, or clinical pathology, or both (ABP or AOBP)		
MD, DO, or DPM, and licensed to practice medicine, osteopathy, or podiatric medicine in the state	None	≥1 year	≥2 years
Doctoral Degree <sup>d</sup>	Certified by ABMM, ABCC, ABB, or ABMLI	2 years <sup>e</sup>	2 years <sup>e</sup>
No doctoral degree	Certification prior to 2/28/1992	2 years	2 years

# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(2)

- Dostarczyć wszystkie materiały jednorazowego użycia do laboratorium poprzez służbę
- Lokalizacja pomieszczeń i urządzeń, takich jak inkubatory, wirówki i sprzęt kriogeniczny powinna być logicznie zaplanowana na w celu utrzymania wysokiej efektywności i bezpieczeństwa w każdej dziedzinie pracy.
- Oddzielne powierzchnie biurowe należy przewidzieć do prac administracyjnych, takich jak ewidencjonowanie i wprowadzania danych.
- Ogólnie mokry obszar, w którym mycia sprzętu, sterylizacji, itp. jest wykonywane muszą być oddzielone od laboratorium zarodków. Analiz, w których stosowane są środki utrwalające muszą być przeprowadzane w oddzielnym pomieszczeniu, najlepiej w digestorium.

# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(3)

## 3.2 Sprzęt laboratoryjny

- Sprzęt laboratoryjny musi być odpowiedni do prac laboratoryjnych i łatwe do czyszczenia i dezynfekcji.
- Krytyczne elementy wyposażenia, w tym inkubatorzy, urządzenia do programowego zamrażania gamet i zygot i urządzeń przechowywania zarodków, powinny być odpowiednio umiejscawiane i monitorowane.
- Automatyczne włączanie się zapasowego generatora awaryjnego w przypadku zaniku zasilania powinno być zabezpieczony .
- Minimalną liczbę dwóch inkubatorów jest zalecane.
- Butle gazowe powinny być umieszczone na zewnątrz lub w oddzielnym pomieszczeniu i włączone do automatycznego systemu zapasowego.
- Inkubatory powinny być często czyszczone i sterylizowane.

# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(4)

- Formularzy zwyczajnej i nadzwyczajnej konserwacji wszystkich urządzeń muszą być odpowiednio wypełnione i przechowywane.
- Urządzenia do utrzymywania temperatury mediów, gamet, zygot i zarodków w każdej fazie postępowania, jak inkubatory, powinny być na miejscu blisko miejsca pracy
- Regularne kontrole parametrów funkcjonalnych urządzeń używanych do utrzymania temperatury i CO<sub>2</sub> powinny być wykonywane za pomocą kalibrowanych termometrów i dodatkowych metod analizy CO<sub>2</sub> i / lub pomiaru pH.
- Zapis tych pomiarów, jak również wartości wykazane z wyświetlaczy cyfrowych z każdego urządzenia, muszą być wpisane
- Instrukcja obsługi dla każdego urządzenia powinna być dostępna w laboratorium.
- Pisemne instrukcje powinny być dostępne dla wszystkich członków personelu do działań, jakie należy podjąć w przypadku awarii sprzętu.



# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(5)

## 3.3 czynniki zakaźne

- Szczepienie pracowników przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B lub innemu wirusowi, dla których szczepionka jest dostępna, jest zalecane.
- Przesiewowe badania pacjentów i dawców gamet dla HIV, wirusowego zapalenia wątroby typu B / C i innych chorób przenoszonych drogą płciową przed przetworzeniem lub kriokonserwacji powinny być rutynowo wykonane zgodnie z dyrektywą Komisji 2006/17/WE z załącznikiem III.
- Przyjęcie pacjentów do leczenia cyklem zapłodnienia in vitro jest uregulowane przez lekarzy, i chociaż personel laboratorium powinien traktować każdą próbkę jako potencjalnie zakaźną, pracownicy laboratorium muszą być poinformowane o ryzyku związanym z obsługą zainfekowanych materiałów biologicznych, gdy informacja jest dostępna.

# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(6)

- 3.4. Środki ochronne
- Ścisłe przestrzeganie zasad higieny personelu.
- Użyj odzieży laboratoryjnej
- W razie potrzeby użyj nietoksycznych (bez talku) rękawic i masek.
- Korzystamy z ochrony oczu i twarzy, i rękawice jeśli kriogeniczne materiały są obsługiwane.
- Użyj pionowych komór przepływu laminarnego.
- Użyj mechanicznych urządzeń do pipetowania.
- Użyj digestorium w przypadku utrwalacza.

# 3. Bezpieczeństwo laboratorium(7)

- W przypadku wykorzystania materiałów jednorazowego użytku, po użyciu, wyrzucić ich natychmiast w odpowiednim pojemniku na odpady.
- Potencjalne zakaźne materiały muszą być usunięte w sposób bezpieczny dla pracowników laboratorium i obsługi, konserwacji i sprzątane przed kontaktem z tym materiałem w trakcie ich pracy.
- Igły i inne ostre narzędzia powinny być traktowane z dużą ostrożnością i wyrzucić do specjalnych pojemników. Jeśli to możliwe, należy pominąć szkło w laboratorium, w przeciwnym wypadku odrzucić pipety Pasteura i połamane szkła w specjalnych pojemnikach.
- Żywność , napojów, papierosów i cygar są surowo zabronione.
- Użycie perfum, make-up i silne dezodoranty powinny być ograniczone.

# 4 .Identyfikacja pacjentów, ich gamet, zygot i zarodków (1)

- 4.1 Przed rozpoczęciem procedury związane z cyklem leczenia, embriolog powinien sprawdzić, czy pacjent podpisał odpowiedni formularz zgody.
- 4.2 Wyniki badań klinicznych i serologicznych pacjentów przed ich dopuszczeniem do IVF powinny być sprawdzane w celu wykrycia ewentualnych pozytywnych wyników na infekcję wirusową.
- 4.3 Pisemne formularze powinny szczegółowo opisać różne fazy IVF u, w tym wszystkie procedury operacyjne i laboratoryjne, w których protokoły, sprzęt i lista materiałów powinny zostać określone. W ten sposób, powtarzalność wyników oraz kompetencje w zakresie manipulacji gamet, zygot i zarodków mogą być zapewnione

# 4 .Identyfikacja pacjentów, ich gamet, zygot i zarodków (2)

4.4 Zasady dotyczące prawidłowej obsługi i identyfikacji gamet, zygot i zarodków powinny być sprawdzone przez system kontroli i, w razie potrzeby należy stosować podwójne sprawdzenie (double check) przez drugą osobę.

- Wszystkie materiały uzyskane od pacjentów, tj. próbki z krwi, płynu pęcherzykowego i próbki spermy, muszą posiadać unikalny identyfikator pary.
- Wewnętrzna komora inkubatorów powinna być zorganizowana w celu ułatwienia identyfikacji zarodków, zygoty, komórek jajowych i plemników.
- Weryfikacja tożsamości pacjentów powinna być wykonywana w krytycznych etapów: przed pobraniem komórki jajowej, przy odzyskaniu nasienia, przed zapłodnieniem lub ICSI, w kriokonserwacji i przed procedurą transferu zarodków.
- Podwójne przeglądy zalecane są co najmniej w: zapłodnieniu komórek jajowych, przenoszenie zarodków, zygoty lub zarodków przed zamrażaniem i rozmrażaniem.
- Dokumentacja wszystkich kluczowych etapów w formularzach każdego pacjenta jest niezbędna.
- Tożsamość embriologa w każdym punkcie procesu IVF, od daty otrzymania przez ostateczną decyzję, datę i czas, powinny być jasno określone. Pozwala to na śledzenie próbki przez cały okres jej przebywania w laboratorium, a także w późniejszych terminach.

4.5 Szkolenie wszystkich pracowników laboratorium odpowiednio do tych procedur jest obowiązkowe.

# 5. Przygotowanie mediów i ich kontrola jakości (1)

## 5.1 Odczynniki

- Pożywki powinny być klasy hodowli tkanek, najlepiej testowane testem hodowli zarodków myszy i być sterylne.
- Korzystanie z komercyjnych, badanych nośników kontrolą jakości jest zalecane.
- Gdy komercyjne media są wykorzystywane, ważne jest, aby sprawdzić, czy producenci używają zatwierdzone testy kontroli jakości, jeśli nie kontrola musi być wykonana przez laboratorium.
- Ponadto integralność pakietów i odpowiednie warunki dostawy powinny być kontrolowane. Dokumentacja kontroli jakości za pomocą odpowiedniego systemu biologicznego muszą być dostarczone przez producenta dla każdego produkowanego medium.
- Korespondencja z dostarczonych partii powinny być zweryfikowana.
- Odczynniki i środki powinny być zawsze używane przed data ważności podana przez producenta
- odpowiednie urządzenia chłodnicze muszą być dostępne dla mediów i przechowywania odczynników.

# 5. Przygotowanie mediów i ich kontrola jakości (2)

5.2 Surowica lub płyn pęcherzykowy od donora nie jest zalecany jako dodatek do mediów. Dostawcy komercyjnych albumin surowicy ludzkiej lub nośnika zawierającego białka powinny dostarczać dowodów z badań przesiewowych zgodnie z lokalnymi przepisami dla dawców krwi.

5.3 Stosowanie oleju mineralnego.

- Oocyty, zygoty i zarodki mogą być hodowane w zrównoważonym oleju mineralnym. Olej pomaga w utrzymaniu temperatury, ciśnienia osmotycznego i pH podczas krótkotrwałych manipulacji komórek jajowych i zarodków. Również olej powinien być testowany odpowiednim testem kontroli jakości, w tym odpowiednim systemem biologicznym. Opis tych testów powinien być dostarczony przez producenta.

5.4 Każda partia pożywki i oleju mineralnego powinna być zapisywana

- U każdego pacjenta, arkusza lub ewentualnie dokumentowana, podczas którego dokładny okres czasu została wykorzystana, na każdym etapie postępowania dla każdego pacjenta.

## 6. Postępowanie z zarodkami, zygotami, komórkami jajowymi i plemnikami(1)

- 6,1 Odpowiednie środki powinny zostać podjęte w celu zapewnienia, że komórki jajowe, zygoty i zarodki są utrzymywane w 37 ° C w czasie manipulacji / obserwacji.
- 6,2 W miarę możliwości jednorazowe materiały do hodowli tkanek powinni być wykorzystywane do hodowli komórek i manipulacji płynów ustrojowych (patrz dyrektywa Komisji 2006/17 / P. L 38/50 w sprawie urządzeń medycznych oraz dyrektywy Komisji 2006/86 / p. L 294/34 i L 294/38, C.6 na krytyczne odczynniki i materiały). Zapis używanych numerów serii dla każdego okresu czasu powinny być udokumentowane i przechowywane.
- 6,3 pipetowania urządzenia (pasteurs, ciągnione pipety, końcówki itp.) powinny być używane tylko do celów postępowania tylko, nie powinny być używane przez więcej niż jednego pacjenta i powinny być usuwane natychmiast po użyciu.
- 6.4 Leczenie równoczesne więcej niż jednego pacjenta nie powinno być wykonywane w tym samym miejscu pracy. Każda próbka powinna być traktowane oddzielnie i leczenie powinno być zakończone przed przejściem do następującej próbki.



## 6. Postępowanie z zarodkami, zygotami, komórkami jajowymi i plemnikami(2)

6,5 Informacja identyfikacyjna umieszczona na płytkach hodowlanych / probówkach powinna zawierać dane pacjentki jak imię nazwisko data urodzenia.

- ❑ Procedury muszą być w miejscu, które zapewniają właściwą identyfikację pacjenta we wszystkich etapach procedury.
- ❑ Etykietowanie płytek / probówek zawierających komórki jajowe, zygoty, embriony lub nasienia musi być stała.
- ❑ Inkubatory powinny być uporządkowane w celu ułatwienia identyfikacji zarodków, zygot, komórek jajowych i nasienia dla każdego pacjenta.

6,6 Na każdym etapie postępowania, data, godzina i tożsamość embriologa powinno być odnotowane. Jest to szczególnie przydatne w przypadku późniejszego sprawdzania danych .

6,7 Przed otrzymaniem próbek, tożsamość odpowiednich pacjentów powinna być potwierdzona (double check).

6.8 Wszystkie powyższe punkty są również stosowane w czasie zamrażania i rozmrażania gamet, zygot i zarodków, z wyjątkiem wymogu temperatury podczas rozmrażania, które mogą się różnić w zależności od używanego protokołu.

# 7. Izolacja oocytów

- 7,1 Powinno się stosować odpowiednie urządzenia do utrzymania temperatury 37 °C, przy laboratorium i obszary izolacji oocytów w różnych miejscach. Płytki Petriego dla skanowania oocytów, probówki w blokach grzewczych powinny być ogrzane w 37 °C.
- 7,2 Szczegółowe procedury dotyczące pobierania oocytów i ich hodowli musi być dostępny.
- 7,3 Aspiraty płynu pęcherzykowego są sprawdzane pod kątem obecności kompleksów oocyt-komórki wzgórnka pod mikroskopem stereoskopowym z odpowiednią bazą oświetlenia i stolik podgrzewaną wodą. Zazwyczaj obserwacje komórek przeprowadza się pod powiększeniem 8 – 60X. Ekspozycja na światło oocytów powinna być ograniczona do minimum.
- 7,4 Morfologiczne kryteria opisu jakości oocytów i dojrzałości, a także sposób obserwacji powinny zostać określone. Ocena morfologiczna odzyskanych oocytów powinna być udokumentowana w formularzu pacjentów.
- 7,5 gdy komórki jajowe dawcy są używane, musi być zagwarantowane możliwości śledzenia zgodnie z zasadami obowiązującymi w klinice. Przy każdej procedury zamrażania/witryfikacja oocytów dawcy, niepowtarzalny europejski kod musi być nadane. Realizacja tego unikalnego kodu w Polsce przewiduje się na koniec 2013 roku.

# 8. Przygotowanie nasienia(1)

- 8,1 Próbkki nasienia w sterylnych, plastikowych pojemnikach (gatunek dla tkanek, jeśli są dostępne) powinny być pobrane bez użycia prezerwatywy, plemnikobójcze kremy lub smary. Pojemnik powinien być wyraźnie oznakowane z nazwiskami pary. Procedura identyfikacji musi być na miejscu, aby umożliwić przydział próbki spermy do pacjentki, zwłaszcza w przypadku próbek wyprodukowanych poza kliniki. Po zebraniu próbek powinno one być dostarczone do laboratorium, jak tylko jest to możliwe w ciągu jednej godziny, co jest korzystny dla pobrania, oraz unikać zbyt niskie i wysokie temperatury, (WHO, 2010).
- 8.2 Zapisy powinny być typu pojemnik (jeśli to różni się od normy), czas i miejsce pobrania (w szczególności w odniesieniu do próbek wytworzonych gołym klinicznych) i czas pomiędzy zbierania i przygotowywania.
- 8,3 Jeżeli dawca spermy jest używany, niezbędne informacje umożliwiające identyfikację (kod dawcy / kod kliniki lub banku) muszą być rejestrowane. Definicja unikalnego kodu Europejskiego przewiduje się w Polsce na koniec 2013 r. Od tego czasu należy stosować niepowtarzalny europejski kod

# 8. Przygotowanie plemników (2)

8.4. pisemne procedury powinny być dostępne i obejmują:

- rodzaj media do przygotowania plemników
- technika przygotowania plemników (np swim-up lub gradient gęstości)
- czas wirowania i siła
- Warunki i czas inkubacji

8.5. sposób przygotowania nasienia powinny być rejestrowane, w tym szczegółowe informacje o każdej zmianie na standardowy protokół laboratoryjnych.

8.6. powinno się zarejestrować parametry przed i po przygotowaniu nasienia i każde rozcieńczenie przeprowadzone przed inseminacji.

8.7 . W przypadku chirurgicznego pobierana plemników, po inseminacji , nadwyżkę plemników powinny być konserwowana do dalszych cykli wspomaganego rozrodu; należy unikać powtarzania zabiegów operacyjnych.

8.8. Przygotowanie nasienia musi być chronione przed ekstremalnymi temperaturami (Mortimer, 2005):

- Jeżeli zawiesina plemników ostygnie poniżej 20 ° C, następuje szok termiczny e względu na zmiany w zachowaniu fazy fosfolipidów błonowych.
- Jeżeli temperatura wzrośnie powyżej normy fizjologicznej, plemniki będą nieodwracalnie uszkodzone.

# 8. Przygotowanie plemników (3)

8.9 Przygotowanie plemników do zapłodnienia.

8.9.1 Sposób przygotowania dobiera się w zależności od indywidualnych próbek. Przygotowanie próbnej przed cyklem leczenia może być wskazane, aby wybrać najbardziej odpowiednią technikę. Przygotowanie nasienia ma na cel :

- zwiększyć koncentracji i wybór ruchliwych plemników;
- odrzucić plazmy nasienia, i zanieczyszczeń ;
- Selekcja w celu zmniejszenia nieprawidłowych form plemników

8.9.2 zamrożone zapasowe próbka nasienia wymagane dla tych pacjentów, dla których możliwość trudności pobrania nasienia jest przewidywane.

8.9.3 Różne metody stosowano do przygotowania nasienia. Wśród nich, technika Swim-Up stopniowe wirowanie w gradiencie gęstości są najczęściej używane. Standardowe protokoły przygotowania nasienia muszą być szczegółowo opisane w procedurach. Zgodnie z ogólną zasadą, nadmierne odwirowywania należy unikać zwłaszcza w próbkach oligozoospermicznych w celu uniknięcia zwiększenia stężenia reaktywnych form tlenu (Twiggg et al., 1998).

8.9.4 Pożywki hodowlane stosowane do zawiesiny plemników buforowane wodorowęglanem, są podatne na zmiany pH po wystawieniu na działanie powietrza atmosferycznego przez ponad dwie minuty (Mortimer i Mortimera, 2005). Ponadto, przedłużone narażenie na działanie strumienia powietrza o dużej prędkości będzie powodować spadek temperatury w zawieszynie. Stąd procedura przygotowania plemników do zapłodnienia musi być przeprowadzana w warunkach, które pozwalają kontrolować temperatury i pH. Po przygotowaniu , zawiesina plemników powinna być trzymana w temperaturze 37° C w odpowiednim pH dla optymalnej kapacytacji.

## 9. Insemination of oocytes (1)

9.1 Conventional IVF insemination.

9.1.1 A record should be kept of the time of insemination and the sperm concentration used.

9.1.2 The number of spermatozoa must be sufficient to yield oocyte fertilization without compromising embryo development.

9.1.3 A double identity check at the time of insemination procedure is recommended.

# 9. Insemination of oocytes (2)

## 9.2 ICSI procedure.

### 9.2.1 Preparation of oocytes for ICSI.

Removal of cumulus–corona cells. Oocytes are denuded from the surrounding cumulus and corona cells using an enzymatic procedure with hyaluronidase, mostly followed by mechanical denudation using a pipette. Both the enzyme concentration and the duration of exposure to the enzyme should be limited. Care needs to be taken in order to avoid damage to the oocytes, which can result from too vigorous pipetting or from a pipette diameter which is too small.

### 9.2.2 The injection procedure.

Record should be kept of the time of insemination (start and end of the procedure), as it depends on crucial factors such as the quality of the sperm sample and the experience of the operator. During ICSI, the following points are important:

- Morphology and maturity status of each oocyte should be recorded.
- The selection and immobilization of a viable sperm cell.
- The rupture of the oolemma prior to the release of the sperm cell into the oocyte.

9.2.3 At the end of the procedure, both the holding and injection needles must be discarded.

9.2.4 A double identity check at the time of ICSI dish preparation is recommended.

# 10. Scoring for fertilization(1)

- 10.1 All oocytes that have been inseminated or microinjected should be transferred into new dishes with preequilibrated fresh culture medium and examined for the presence and number of pronuclei and polar bodies at 16 to 20 hours post insemination.
- 10.2 This examination should be done under high magnification (at least 200), using an inverted microscope equipped with Hoffman optics or equivalent, in order to verify normal fertilization and pronuclear morphology.
- 10.3 The morphological status of each oocyte/zygote should also be recorded.



# 10. Scoring for fertilization(2)

- 10.4 Oocytes with one pronucleus or more than two pronuclei should be cultured separately from normally fertilized oocytes. Parthenogenetically activated oocytes can develop to blastocyst; if transferred, they will give false expectations of implantation. Zygotes with three pronuclei can also develop and a triploid karyotype could implant and occasionally reach term and delivery but the newborns die early postnatal. In addition, human triploids originated from polyspermic fertilization (representing by far the major cause of triploidy), often develop to partial hydatidiform moles that can lead to choriocarcinoma (Jauniaux, 1999; Zaragoza et al., 2000).
- 10.5 Oocytes showing no signs of fertilization at the expected time window should be maintained in culture and observed for late appearance of pronuclei extrusion of the second polar body and (or) cleavage. It is important to document deviations regarding the time of pronuclei and polar body appearance.

# 11. Embryo culture and transfer (1)

- 11.1 The scoring of embryos should be performed at high magnification (at least 200, preferably 400) under an inverted microscope with Hoffman optics or equivalent. The evaluation should include, but not necessarily be limited to; number of cells, percentage of fragmentation, size and cytoplasmic appearance of blastomeres, nuclear status (presence of one or several nuclei per blastomere).
- 11.2 The stage of embryo development at the time of transfer should be documented. Embryos can be grown to Day 5 or 6 for transfer at the blastocyst stage, usually by cultures in sequential media. Current data show that blastocyst culture and transfer can be of advantage for certain groups of patients (Blake et al., 2007; Papanikolaou et al., 2007).
- 11.3 In some countries the maximum number of embryos to be transferred is established by local/national legislation. It is advisable not to exceed two embryos for transfer. In cases where two or more embryos are replaced, the couple has to be extensively informed on the risks of multiple gestations. As a general recommendation, the policy of single-embryo transfer is highly recommended.

# 11. Embryo culture and transfer (2)

11.4 The patient records for embryo transfer must be dated and signed, and should include details of:

- Batch number and type of media used for transfer
- Time from oocyte retrieval to transfer
- Time from oocyte insemination to transfer
- The number and developmental stage of embryos at transfer
- Fate of supernumerary embryos
- Type of catheter used for transfer
- Name of the clinician performing the transfer
- Name of the operator loading the catheter
- Notes about the clinical procedure: whether the transfer was easy, difficult, presence of blood, etc. (optional)

# 11. Embryo culture and transfer (3)

- 11.5 If the laboratory is some distance from the embryo transfer room, arrangements should be made to maintain temperature and pH whilst transporting embryos.
- 11.6 Sterile disposable catheters should be used for transfer. (see Commission Directive 2006/17/ p. L 38/50 on medical devices, and Commission Directive 2006/86/ p. L 294/34 and L 294/38, C.6 on critical reagents and materials).
- 11.7 double identity check is recommended at the moment of loading the catheter.
- 11.8 Before transferring the embryos, the patients' identity must be double checked.

# 12. Cryopreservation of gametes, zygotes and embryos (1)

12.1 Techniques and facilities for cryopreservation of gametes, zygotes and embryos should be available in each IVF centre with the aim of:

- cryopreserving spare embryos after transfer;
- delaying embryo transfer in a subsequent cycle if the patient is unable to undergo the procedure or is at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome;
- storing the zygotes or embryos generated from donated oocytes in order to allow a six-month quarantine so that the potential donors may be controlled for infectious diseases prior to embryo transfer;
- establishing a fertility reserve by storing gametes, zygotes or embryos for later use as in cases of cancer patients or in women at risk of early menopause. If the laboratory performs cryopreservation, a system should be in place for the detection of low levels of liquid nitrogen in the tanks and for high levels of nitrogen in the air. For this reason, it is recommended to keep the nitrogen tanks in dedicated, controlled areas.

## 12. Cryopreservation of gametes, zygotes and embryos (2)

12.2 Several protocols for cryopreservation, including slow freezing protocols and vitrification protocols have been formulated depending on the embryo development stage, type of cryoprotectant, and speed of cooling.

12.3 As detailed in section 3.4, in order to minimize any risk of transmission of infection via liquid nitrogen, gametes, zygotes and embryos should be stored in specific receptacles (i.e. straws, vials etc.) that can be sealed effectively.

- Transfer of samples to receptacles should be by a method which avoids contamination of the external surface.
- Sealing should be carefully performed before freezing.

# 12. Cryopreservation of gametes, zygotes and embryos (3)

12.4 Patients whose gametes, zygotes or embryos are being processed or are to be cryopreserved must be tested according to the regulations in the Commission Directive 2006/17/EC Annex III, i.e. for HIV 1 and 2, and for Hepatitis B and C.

- When a patient is known to be a source of infection risk, a system of separate storage must be in place.
- Patients having transfer of thawed zygotes and embryos ideally should be screened for HIV 1 and 2, Hepatitis B and C.

12.5 Documentation on stored zygotes and embryos should includes:

- The method of freezing and thawing
- The type and batch number of cryoprotectant(s) used.
- The stage of embryo development.
- The number of zygotes or embryos in each straw/vial (should not exceed two).
- The number of straws/vials stored per patient.

12.6 Straws/vials containing samples must be clearly and permanently labelled with reference to patient details and their unique identification code.

## 12. Cryopreservation of gametes, zygotes and embryos (4)

- 12.7 All reproductive cells for application to the human body are subjected to the requirements about traceability and coding that have been established by the European Directive. These rules apply to fresh and frozen cells, but for frozen cells for non partner donation the unique European code has to be used (still to be established by the European Commission; implementation foreseen in 2008).
- 12.8 Storage records should be kept in both the patient's individual records and the storage records for individual nitrogen banks.
- 12.9 An annual audit of stored gametes, zygotes and embryos must be carried out, cross referencing contents with storage records.
- 12.10 Storage records must include precise details of the location of the vials/straws.
- 12.11 Documentation of thawing procedures should include morphological changes seen during thawing, number of cells, number of survived cells and the time period of culture prior to transfer.



# 13. Assisted hatching

This technique has been designed with the aim of helping embryo hatching and possibly implantation. However there are conflicting reports about its clinical efficacy and it should be regarded as an experimental procedure.

- 13.1 Three methods are being used; the mechanical technique that is partial zona dissection with glass microneedles, the chemical assisted hatching using acidic Tyrode's and the laser-assisted hatching.
- 13.2 Special care should be taken to avoid damage to the embryo during the procedure.
- 13.3 The operator, time of performance, stage of development and method used should be documented.

# 14. Preimplantation genetic diagnosis (1)

14.1 Genetic counselling should be available to all couples known to carry a hereditary disease.

14.2 The biopsy procedure may be carried out by:

- polar body removal;
- single or double blastomere biopsy at the Day 3 stage;
- trophoctoderm biopsy at the blastocyst stage

14.3 The cells destined to genetic investigation are removed in the IVF laboratory using glass microtools on a micromanipulation set. The embryology laboratory has the responsibility of providing unique identification between biopsied polar bodies, blastomeres or trophoctoderm cells and the corresponding oocyte or zygote, embryo or blastocyst, respectively, implying the implementation of single oocyte/zygote/embryo/blastocyst culture after biopsy. All cells and embryos for genetic investigation must be individually handled, carefully identified and labelled, and tracked during the whole procedure. During these steps, double identity checks are strongly recommended.

## 14. Preimplantation genetic diagnosis (2)

- 14.4 Special care must be taken to avoid damage to the embryo during the procedure. In addition, when blastomere biopsy is performed, integrity of the removed cell is extremely important for the correctness of the genetic analysis.
- 14.5 The biopsy sample should be subjected to diagnostic procedures in a genetic laboratory.
- 14.6 Pre-implantation aneuploidy screening (AS) is performed in the same way as PGD, and is sometimes used as a complement to ordinary morphological selection of embryos for transfer. It is a method used to find the chromosomally normal embryos when there is no hereditary genetic indication. Clinical efficiency of PGD-AS in randomized studies has not been proven.

# 15. Quality control and quality assurance (1)

15.1 Working in compliance with a Quality Management System is mandatory according to the European Union tissue directive. This implies:

- having validated and written procedures for each aspect of the process, including the occurrence of incidents or hazards;
- whenever possible, assuring that all media/reagents/disposables etc. are tested for quality using an appropriate assay;
- verifying conformance to the specifications;
- taking any corrective action to keep procedures under conformity;
- maintaining and calibrating equipment on a periodical basis (daily/weekly/monthly/yearly)

# 15. Quality control and quality assurance (2)

15.2 A systematic monitoring of the testing process can be performed under Quality Assurance, aimed at improving the entire process by identifying problems, errors or improvements that may have occurred. For this internal quality assurance, results should be evaluated on a regular basis, indicators should be objective and relevant, and adequate thresholds set up. In order to prevent bias due to patient variation, a representative number of procedures in relation of the total number of procedures performed should be selected to establish the corresponding thresholds. Critical levels of laboratory performance for each indicator should be defined.

The following indicators should be regularly reviewed, analysed and discussed:

- Numbers/rates of errors and adverse events
- Rates of normally fertilized oocytes
- Cleavage rates
- Rates of embryos of good quality
- Proportion of patients with failed fertilization
- Ongoing clinical pregnancy rates (fresh and frozen/thawed transfers)
- Multiple pregnancy rates
- Implantation rates
- Rate of survival of zygotes and embryos after thawing