**GHID DE PRACTICĂ MEDICALĂ**

 **IN BANCA DE CELULE SI TESUTURI REPRODUCTIVE**

**2024**

**INTRODUCERE**

Banca de celule si tesuturi reproductive este o parte esentiala a oricarei unitati sanitare acreditate pentru activitatea de banca si utilizator de celule reproductive. La acest nivel al structurii se asigura prelevarea, testarea, procesarea, stocarea , distributia, importul si exportul materialului biologic reproductiv in vederea utilizarii la om prin intermediul tehnicilor de reproducere umana asistata medical ( RUAM).

Normele generale de organizare si functionare ale bancii de celule si tesuturi reproductive sunt in conformitate cu legislatia europeana si nationala in vigoare, cu recomandarile Societatii Europene de Reproducere Umana Asistata si Embriologie ( ESHRE), privind bunele practici, managementul calitatii si criteriile de performanta ale activitatii bancii de celule si tesuturi reproductive.

METODOLOGIE DE ELBORARE

Prezentul ghid a fost elaborat, in cadrul proiectului SIPOCA 696 „Imbunatațirea procesului de reglementare in domeniul transplantului” COD SMIS 129166, de catre un grup de lucru iar odată finalizat, coordonatorul l-a trimis pentru revizie la Comisia pentru verificarea si recepția calitativă și cantitativă a livrabilelor, instituită prin Ordinul Ministrului Sanatatii nr. 312/09.02.2021. Această versiune a fost prezentată și supusă discuției în cadrul grupului de experți din cadrul Workshop-ului regional „Particularități privind elaborarea protocoalelor și standardizarea ghidurilor de practică medicală în domeniul transplantului de os tendon, piele, cornee și fertilizare in vitro și embriotransfer” organizat in perioada 14 – 16.01.2022 la Iasi. Ghidul a fost dezbătut și agreat prin consens din punct de vedere al conținutului tehnic, gradării recomandărilor și al formulării. Coordonatorul si grupul de lucru au luat în considerare și au încorporat, după caz, comentariile și propunerile de modificare făcute de evaluatorii externi și de pe site și au redactat versiunea finală a ghidului.

Grupul de lucru a fost compus din: Bechir Melihan, Butnaru Maria, Carstea Valer Bogdan, Coricovac Anca, Cumpata Simona-Diana, Gligor Monica, Hutanu Delia, Mustata Andreea Sandra, Naghi Petronela, Rugescu Ioana, Sandu Lacramioara, **coordonat de: Prof. Dr. Mircea Onofriescu** si integrator: Grosu Iulia-Alexandra.

În România nu a fost elaborat până în prezent nici un document oficial specific legat de activitatea de banca de celule si tesuturi reproductive, aceasta este prima versiune a unui ghid de specialitate referitor la acest subiect.

PRINCIPII

Prezentul Ghid a fost redactat pe baza dovezilor actuale care descriu managementul activitatilor din bancile de celule si tesuturi reproductive, a normelor legislative si a recomandărilor de bună practică din literatura de specialitate. Dovezile ştiinţifice care stau la baza ghidului sunt in conformitate cu literatura de stecialitate.

DATA REVIZIEI

Acest ghid va fi revizuit o data la trei ani sau în momentul în care apar dovezi științifice noi care modifică recomandările făcute.

**CAPITOLUL 1. PERSONAL (tip, criterii, responsabilitati , normare)**

Personalul medical calificat implicat în activitatea de Banca de celule reproductive (prelevare, testare, prelucrare,stocare, distributie, import/export) se poate incadra in doua categorii :

* implicat in activitatea de banca celule reproductive masculine – andrologie
* implicat in activitatea de banca celule reproductive feminine, masculine, cultura embrionara –embriologie

Personalul medical calificat implicat in cele doua tipuri de activitati in functie de responsabilitatile stabilite se poate incadra in urmatoarele categorii:

* persoană responsabilă pentru asigurarea calităţii ţesuturilor şi/sau celulelor de origine umană procesate şi/sau utilizate la om
* sef de laborator ( andrologie/embriologie)
* personal (embriologi/andrologi)
* personal auxiliar

In conformitate cu Ordinul 1763/2007 cu modificarile ulterioare **Persoana responsabila** si inlocuitorul acesteia trebuie sa indeplineasca cumulativ urmatoarele:

* Sa detina o diplomă universitară sau echivalentă în domeniul ştiinţelor medicale sau biologice;
* Sa dovedeasca experienţă practică de cel putin 2 ani în domenii pertinente pentru activitatea de bancă de ţesuturi/bancă de celule ;

Persoana responsabila pentru asigurarea calităţii ţesuturilor şi/sau celulelor de origine umană procesate şi/sau utilizate la om este responsabila cu coordonarea intregii activitati a bancii de tesuturi si celule si a implementării sistemului de management al calității serviciilor și siguranței pacientului la nivelul bancii de celule si tesuturi și are următoarele atribuții principale:

* planifică, organizează, coordonează și monitorizează întreaga activitate a bancii de celule si tesuturi prin supravegherea respectarii regulilor tehnice si administrative si punerea in practica si respectarea regulilor de igiena si securitate sanitara
* Aproba procedurile/protocoalele de lucru, coordoneaza actualizarea lor si verificarea aplicarii acestora
* coordonează și controlează funcționarea bancii de celule si tesuturi
* analizează ,avizează si aprobă procedurile interne ale bancii de celule si tesuturi
* elaborează impreuna cu seful de laborator și supune aprobării conducătorului unității sanitare planul anual de formare și perfecționare profesională a personalului din subordine;
* coordonează și monitorizează elaborarea documentelor calității la nivelul bancii de celule si tesuturi
* coordonează elaborarea și avizează planul de activitati al bancii de celule si tesuturi
* coordonează și monitorizează activitățile legate de asigurarea și îmbunătățirea calității serviciilor bancii desfășurate de către personalul din subordine;
* elaborează și înaintează spre aprobare conducătorului unității sanitare rapoarte periodice privind activitatea bancii de celule si tesuturi si raporteaza semestrial activitatea bancii de celule reproductive catre ANT sau ori de cate ori este necesar/solicitat.
* Valideaza evidenta scrisa si in sistem informatic a tuturor operatiunilor desfasurate in banca de celule si tesuturi, evidenta ce permite asigurarea trasabilitatii ascendente si descendente
* Raporteaza semestrial activitatea bancii de celule reproductive catre ANT
* Reprezinta banca de celule reproductive in fata forurilor competente si in relatii cu terti
* Propune conducerii unitatii sanitare incadrarea de personal calificat si selecteaza acest personal.
* Valideaza si aproba necesarul de materiale si medii de lucru necesare si comunica structurii administrative.
* Pastreaza inregistrarea activitatii, incluzind tipurile si cantitatile de celule si sau tesuturi prelevate, testate, procesate , conservate, stocate, distribuite , importate, exportate ori distruse la solicitarea pacientilor sau in conformitate cu standardele si a originii si sau destinatiei acestora
* Raspunde de raportarea, investigarea , inregistrarea si transmiterea informatiilor asupra efectelor si reactiilor adverse grave care pot influenta calitatea si siguranta tesuturilor si celulelor , precum si a donatorilor (autologi sau heterologi) sau a receptorilor , ce pot fi atribuite procurarii, testarii, procesarii , stocarii, distributiei transportului , precum si a oricaoror reactii adverse grave sau incidente observate in timpul sau dupa aplicarea clinica , ce pot fi legate de calitatea si sau siguranta celulelor si sau tesuturilor
* Raspunde de receptia, impachetarea si etichetarea celulelor si sau tesuturilor in conformitate cu prevederile legale
* Verifica si valideaza conditiile de stocare a celulelor si/ sau tesuturilor precum si a inscriptionarii, documentarii , impachetarii si etichetarii acestora, in conformitate cu standardele aprobate
* Face parte din comisia de distrrugere a materialului biologic efectuat la solicitarea pacientilor sau in conformitate cu legislatia in vigoare
* Pastreaza secretul profesional, securitatea si confidentialitatea fata de terti a datelor pacientilor precum si a informatiilor si documnetelor referitoare la activitatea bancii si a unitatii sanitare
* Respecta regulamentul intern
* Respecta si apara drepturile pacientilor
* Acorda servicii medicale in mod nediscriminatoriu
* Poarta echipament de protectie care va fi schimbat ori de cate ori este necesar
* Respecta normele de igiena, antiepidemice si de protectia muncii
* Se preocupa permanent de imbunatatirea calitatii serviciilor medicale
* Atributiile conform OMS 1226/2012 pentru aprobarea normelor tehnice priviond gestionarea deseurilor rezultate din activitati medicale sunt:
* Aplica procedurile stipulate in codul de procedura
* Responsabilitati privind sistemul de management al calitatii :
* Sa cunoasca si sa respecte documnetel;e sistemului de management de calitate
* Sa participe activ la realizarea obiectivelor generale de calitate stabilite si a obiectivelor specifice locului de munca
* Atributii si responsabilitati privind confidentialitatea datelor:
* Sa pastreze confidentialitatea tuturor datelor , informatiilor si documentelor de orice fel de la locul de munca si de la nivelul unitatii sanitare
* Sa nu foloseasca in interes personal sau pentru alte persoane datele, documnetele si faptele referitoare la activitatea unitatii sanitare , asupra carora detine informatii
* Sa apere integritatea patrimoniala de orice fel( materiala, morala etc) a unitatii sanitare

In conformitate cu ORDIN nr. 273 din 20 februarie 2020 privind modificarea și completarea Ordinului ministrului sănătății nr. 860/2013 pentru aprobarea criteriilor de acreditare în domeniul transplantului de organe, țesuturi și celule de origine umană **șef laborator/laboratoare** pentru efectuarea activităților din domeniul reproducerii umane asistate medical si inlocuitorul acestuia este necesar sa indeplineasca cumulativ urmatoarele:

• Sa detina o diplomă universitară sau echivalentă în domeniul ştiinţelor medicale sau biologice;

• Sa dovedeasca experienţă practică de minimum 5 ani, dobândită în entități acreditate pentru activitatea din domeniul reproducerii umane asistate medical, și poate fi:

1. medic în specialitatea obstetrică-ginecologie care deține atât atestat de studii complementare în tratamentul infertilității cuplului și reproducere umană asistată medical sau supraspecializare în fertilizare in vitro, cât și certificate de studii pe domeniul embriologie (de exemplu: certificat de Clinical/Senior Embriologist obținut în urma examenelor organizate de ESHRE);

2. medic în specialitatea medicină de laborator sau genetică medicală și care deține certificate de studii pe domeniul embriologie(de exemplu fara a se limita la - certificat de Clinical/Senior Embriologist obținut în urma examenelor organizate de ESHRE);

3. biolog sau biochimist sau chimist cu gradul profesional specialist sau principal în specialitățile: embriologie, genetică, genetică și biologie moleculară, genetică - chimia acizilor nucleici și care deține certificate de studii pe domeniul embriologie ( de exemplu fara a se limita la - certificat de Clinical/Senior Embriologist obținut în urma examenelor organizate de ESHRE)

Seful de laborator/laboratoare este responsabil cu coordonarea intregii activitati si a implementării sistemului de management al calității serviciilor și siguranței materialului biologic la nivelul bancii de celule si tesuturi și are următoarele atribuții principale:

* planifică, organizează, coordonează și monitorizează întreaga activitate.
* Coordoneaza si implementeaza respectarea regulilor tehnice si administrative, punerea in practica si respectarea regulilor de igiena si securitate sanitara
* Pune in practica sistemul de management al calitatii si de prevenire a riscurilor si monitorizeaza implementarea acestuia la nivelul structurii.
* Implementeaza și revizuieste indicatorii de performanță pentru toate procedurile/protocoalele de lucru, în scopul controlului și asigurării calității;
* Se preocupa permanent de ridicarea nivelului profesional propriu si al personalului din subordine prin propunerea unui program pentru instruirea personalului de laborator și acumularea continuă de cunoștințe în domeniul științific și medical
* Intocmeste și implementeaza procedurile/protocoalele de lucru ,coordoneaza actualizarea lor si verificarea aplicarii acestora, selecteaza cele mai adecvate materiale pentru asigurarea celor mai înalte standarde de activitate.
* Selecteaza echipamente de laborator sigure și adecvate, în conformitate cu reglementările europene și/sau naționale
* Coordoneaza si verifica activitatea personalului bancii de celule reproductive
* Repartizeaza adecvat sarcinile personalului din subordine în scopul eficientizării activităților si intocmeste fisele de post pe care le inainteaza spre verificare si aprobare.
* Se ocupa de orientarea și inițierea membrilor noi ai colectivului
* Controleaza evidenta scrisa si in sistem informatic a tuturor operatiunilor desfasurate in banca de celule reproductive, evidenta ce permite asigurarea trasabilitatii ascendente si descendente inclusiv in ceea ce priveste codificarea SEC sau aplicarea codului CUIANT.
* Intocmeste raportul semestrial referitor la activitatea bancii de celule reproductive
* Propune incadrarea de personal calificat
* Stabileste necesarul de materiale si medii de lucru necesare si propune planul de aprovizionare.
* Se ocupa de inregistrarea activitatii, incluzind tipurile si cantitatile de celule si sau tesuturi prelevate, testate, procesate , conservate, stocate, distribuite , importate, exportate ori distruse la solicitarea pacientilor si a originii si sau destinatiei acestora
* Se ocupa de raportarea, investigarea , inregistrarea si transmiterea informatiilor asupra efectelor si reactiilor adverse grave care pot influenta calitatea si siguranta tesuturilor si celulelor , precum si a donatorilor (autologi sau heterologi) sau a receptorilor , ce pot fi atribuite procurarii, testarii, procesarii , stocarii, distributiei transportului , precum si a oricaoror reactii adverse grave sau incidente observate in timpul sau dupa aplicarea clinica , ce pot fi legate de calitatea si sau siguranta celulelor si sau tesuturilor
* Coordoneaza si verifica receptia, impachetarea si etichetarea celulelor si sau tesuturilor in conformitate cu prevederile legale
* Verifica conditiile de stocare a celulelor si/ sau tesuturilor precum si a inscriptionarii, documentarii , impachetarii si etichetarii acestora, in conformitate cu standardele aprobate
* Face parte din comisia de distrugere a materialului biologic efectuat la solicitarea pacientilor sau in conformitate cu legislatia in vigoare privind siguranta materialului biologic.
* Pastreaza secretul profesional, securitatea si confidentialitatea fata de terti a datelor pacientilor precum si a informatiilor si documnetelor referitoare la activitatea bancii si a unitatii sanitare
* Asigura comunicarea cu toate structurile unitatii sanitare (medici, asistente, personal RUNOS)
* Asigura stabilirea și înaintarea obiectivelor de cercetare către autoritățile competente (acolo unde este cazul)
* Respecta regulamentul intern
* Respecta si apara drepturile pacientilor
* Acorda servicii medicale in mod nediscriminatoriu
* Poarta echipament de protectie care va fi schimbat ori de cate ori este necesar
* Respecta normele de igiena, antiepidemice si de protectia muncii
* Se preocupa permanent de imbunatatirea calitatii serviciilor medicale
* Atributiile conform OMS 1226/2012 pentru aprobarea normelor tehnice priviond gestionarea deseurilor rezultate din activitati medicale sunt:
* Aplica procedurile stipulate in codul de procedura
* Responsabilitati privind sistemul de management al calitatii :
* Sa cunoasca si sa respecte documnetel;e sistemului de management de calitate
* Sa participe activ la realizarea obiectivelor generale de calitate stabilite si a obiectivelor specifice locului de munca
* Atributii si responsabilitati privind confidentialitatea datelor:
* Sa pastreze confidentialitatea tuturor datelor , informatiilor si documentelor de orice fel de la locul de munca si de la nivelul unitatii sanitare
* Sa nu foloseasca in interes personal sau pentru alte persoane datele, documnetele si faptele referitoare la activitatea unitatii sanitare , asupra carora detine informatii
* Sa apere integritatea patrimoniala de orice fel( materiala, morala etc) a unitatii sanitare

Personalul de tip Embriolog/Androlog este necesar sa indeplineasca urmatoarele:

• Sa detina o diplomă universitară sau echivalentă în domeniul ştiinţelor medicale sau biologice;

• Sa dovedeasca experienţă practică de minimum 3 ani, dobândită în entități acreditate pentru activitatea din domeniul reproducerii umane asistate medical ( pana la implinirea celor trei ani lucreaza doar sub supravegherea si/sau indrumarea persoanei desemnate sa o supravegheze).

Embriologul/Andrologul este responsabil cu activitatea zilnica din banca de celule si tesuturi și are următoarele atribuții principale :

* respectarea regulilor tehnice si administrative, precum si respectarea regulilor de igiena si securitate sanitara
* respecta si implementeaza sistemul de management al calitatii si de prevenire a riscurilor
* respecta procedurile/protocoalele de lucru si participa la actualizarea lor
* utilizeaza echipamentele si materialele conform instructiunilor/protocoalelor de lucru/procedurilor implementate pentru asigurarea celor mai înalte standarde de activitate,
* Se ocupa de inregistrarea activitatii prestate, incluzind tipurile si cantitatile de celule si sau tesuturi prelevate, testate, procesate , conservate, stocate, distribuite , importate, exportate ori distruse la solicitarea pacientilor si a originii si sau destinatiei acestora
* Raporteaza orice suspiciune de reactii adverse grave care pot influenta calitatea si siguranta tesuturilor si celulelor , precum si a donatorilor (autologi sau heterologi) sau a receptorilor , ce pot fi atribuite procurarii, testarii, procesarii , stocarii, distributiei transportului , precum si a oricaror suspiciuni de reactii adverse grave sau incidente observate in timpul sau dupa aplicarea clinica , ce pot fi legate de calitatea si sau siguranta celulelor si sau tesuturilor
* Se preocupa permanent de ridicarea nivelului profesional propriu si al personalului din subordine
* Pastreaza secretul profesional, securitatea si confidentialitatea fata de terti a datelor pacientilor precum si a informatiilor si documnetelor referitoare la activitatea bancii si a unitatii sanitare
* Respecta regulamentul intern
* Respecta si apara drepturile pacientilor
* Acorda servicii medicale in mod nediscriminatoriu
* Poarta echipament de protectie care va fi schimbat ori de cate ori este necesar
* Respecta normele de igiena, antiepidemice si de protectia muncii
* Se preocupa permanent de imbunatatirea calitatii serviciilor medicale
* Atributiile conform OMS 1226/2012 pentru aprobarea normelor tehnice priviond gestionarea deseurilor rezultate din activitati medicale sunt:

• Aplica procedurile stipulate in codul de procedura

* Responsabilitati privind sistemul de management al calitatii :
* Sa cunoasca si sa respecte documnetel;e sistemului de management de calitate
* Sa participe activ la realizarea obiectivelor generale de calitate stabilite si a obiectivelor specifice locului de munca
* Atributii si responsabilitati privind confidentialitatea datelor:
* Sa pastreze confidentialitatea tuturor datelor , informatiilor si documentelor de orice fel de la locul de munca si de la nivelul unitatii sanitare
* Sa nu foloseasca in interes personal sau pentru alte persoane datele, documnetele si faptele referitoare la activitatea unitatii sanitare , asupra carora detine informatii
* Sa apere integritatea patrimoniala de orice fel( materiala, morala etc) a unitatii sanitare

Personalul auxiliar este necesar sa indeplineasca urmatoarele

* Pregătire în domeniul bio-medical ,
* să fie instruit în domeniul reproducerii umane asistate prin stagii, cursuri și programe de training interne sau externe

Principalele atribuții ale personalului auxiliar sunt:

* + Completarea documentației aferentă procedurilor zilnice (registre, baze de date)
	+ Supravegherea stocurilor de materiale consumabile și medii de cultură;
	+ Asigura continuitatea materialelor sanitare curente pentru buna functionare a structurii, controleaza modul in care materialele sanitare sunt preluate, pastrate , distribuite si administrate
	+ Asigura pastrarea secretuluim profesional, a anonimatului, confidentialitatii si securittatii datelor pacientilor si ofera informatii apartinatorilor , numai in interesul pacientilor si cu acordul acestora
	+ Se preocupa permanent de actualizarea cunostiintelor profesionale , prin studiu individual sau alte forme de educatie medicala continua si de cresterea calitatii ingrijiriilor medicale acordate pacientilor
	+ Coordoneaza si raspunde de aplicarea normelor tehnice privind gestionarea deseurilor rezultate din activitati medicale conform sarcinilor prevazute in OMS 1226/2012 pentru aprobarea normelor tehnice privind gestionarea deseurilor rezultate din activitati medicale:
* Raspunde de aplicarea codului de procedura
	+ Prezinta superiorului ierarhic planificarea necesarului de materiale pentru sistemul de gestionare a deseurilor medicale periculoase
	+ Isi desfasoara activitatea in mod responsabil, conform reglementarilor profesionale si cerintelor postului
	+ Respecta regulamentul intern al unitatii
	+ Pregateste echipamentul, instrumentarul si materialul steril necesar activitatilor
	+ Utilizeaza si pastreaza in bune conditiuni echipamentele si instrumentarul din dotare
	+ Mentine igiena conform politicilor unitatii sanitare si a practicilor stabilite
	+ Asigura neutralizarea materialelor si a instrumentarului si instrumentelor a caror conditie de sterilizare nu este sigura
	+ Participarea la activitățile de rutină de curatentie, dezinfectie si întreținere a calității aerului și a suprafețelor;
	+ Colecteaza materialul si instrumentarul de unica folosinta utilizate , le sorteaza si le colecteza , pe coduri de deseuri , invederea distrugerii/eliminarii
	+ Poarta echipamentul de protectie prevazut de regulamentul de ordine interioara care va fi schimbat ori de cate ori este necesar pentru pastrarea igienica si a aspectului estetic al personalului
	+ Pastreaza anonimatul, secretul profesional , securitatea si confidentialitatea fata de terti a datelor pacietilor , precum si a informatiilor si documentelor referitoare la activitatea unitatii sanitare
	+ Mentine comunicarea cu medicii și pacienții în vederea confirmării programărilor procedurilor zilnice;
	+ Sa apere integritatea patrimoniala de orice fel (materiala , morala etc) a unitatii sanitare

Necesarul de personal se realizeaza prin asigurarea evaluării și integrării personalului. Evaluarea în acest caz se face în funcție de numărul de ore de muncă necesare/procedură raportat la numărul de ore de muncă permise/salariat. Numărul persoanelor specializate din laborator se adaptează după cum urmează: la fiecare 800 de probe de prelucrare a spermei/an - 1 persoană; pentru ce depășește 300 de cicluri de transfer de embrioni (fie proaspeți, fie crioprezervați)/an se adaugă câte o persoană la fiecare 150 de cicluri/an;

Minimum protocoalelor de lucru/procedurilor :

1. recoltare;

2. recepție probe;

3. înregistrare probe;

4. acceptare probe;

5. stocare probe;

6. prelucrare, testare și interpretare probe;

7. eliberare și transmitere a rezultatelor testării;

8. respingere probe;

9. asigurarea trasabilității;

10. sistem de etichetare codificată care să permită stabilirea unei legături între proba primită, procesare, stocare și rezultatele eliberate;

11.pentru medii/reactivi/kituri (PTA-produse terapeutice anexe), care să cuprindă:

* recepție;
* stocare;
* utilizare;

l2. de utilizare și întreținere preventivă a echipamentelor, instrumentelor și a sistemelor de testare, precum și proceduri și înregistrări referitoare la calibrare și metrologie ( după caz);

13. de evaluare, corectare și monitorizare continuă a activității, precum, dar fără a se limita la:

* temperatura în incubatoare (continuu și la 3 luni măsurare cu un echipament separat), temperatura pe suprafețe încălzite (zilnic și la 6 luni măsurare cu un echipament separat), temperatura aerului în laborator și zona de crioconservare și/sau stocare celule/țesuturi reproductive (continuu și la 3 luni măsurare cu un echipament separat), temperatura în frigidere (zilnic și o dată pe lună măsurare cu un echipament separat), temperatura din containerele de azot lichid (sau nivelul de azot), în funcție de procedura operațională de control din cadrul unității sanitare (săptămânal sau mai des, în funcție de rata de evaporare a fiecărui container);
* determinarea nivelului de CO\_2 (sau amestec, după caz) din incubatoare prin măsurare directă sau indirectă - continuu și la 3 luni măsurare cu un echipament separat;
* determinarea presiunii pozitive (continuu și la 12 luni măsurare cu un echipament separat).

**CAPITOLUL 2. MANAGEMENTUL CALITATII**

Conceptul de “calitate” a fost definit de-a lungul timpului in foarte multe feluri si privit din foarte multe unghiuri si puncte de vedere, probabil tocmai pentru ca a fost si continua sa fie un subiect de mare importanta si de actualitate.

Orice organizatie care se respecta si care doreste sa faca parte din schemele de acreditare moderne are intreaga activitate bazata pe principiile unui sistem de calitate.

In 1979 Crosby defineste cinci etape ale gradului de dezvoltare a managementului calitatii. Garven in 1988 propune un model cu patru etape de dezvoltare.

Ca si definitie desi pare simplista pot propune pentru managementul calitatii; activitati coordonate pentru a conduce si controla o organizatie in domeniul calitatii.

**Principiile managementului calitatii**

Initial au fost propuse ca si abordare opt principii dupa cum urmeaza:

1. Abordarea bazata pe proces
2. Leadership
3. Implicarea personalului
4. Orientarea catre client
5. Abordarea managementului ca sistem
6. Abordarea pe baza de fapte in luarea deciziilor
7. Imbunatatirea continua a performantelor
8. Relatii reciproc avantajoase cu furnizorii

In clinicile de reproducere umana asistata medical,dar mai ales in ceea ce priveste partea de testare, procesare, cryoprezervare, stocare, distributie ce celule si tesuturi reproductive (embriologie si/sau andrologie) este imperios necesar ca organizarea sa aiba la baza principiile familie de standarde ISO 9000 si a celorlalte standarde relationale. In particular pentru partea de embriologie este deosebit de important mai ales managementul riscului si al minimizarii erorilor.

Ca rezultat al acestei expansiuni si deasemenea tinand cont de globalizarea ce are loc in sectorul serviciilor medicale managementul calitatii si al riscului a devenit o necesitate in ceea ce priveste procesarea celulelor reproductive. In contextul in care pentru a putea oferi servicii medicale ce se doresc sa aiba rezultatul scontat in conditii de maxima siguranta s-a impus ca toate unitatile sanitare acreditate ce ofera astfel de servicii sa opereze in acord cu standardele internationale ca ISO 9001 ( Alper si colaboratorii 2002, International Standards Organisation, 2000) reflectand astfel constientizarea actuala a acestor servicii nu numai din punct de vedere medical cat si din punct de vedere comercial.

Structura si organizarea unei unitati sanitare acreditata ca banca de celule si tesuturi reproductive si utilizator ( reproducere umana asistata medical) poate varia in fuctie de o serie de factori cum ar fi marimea acesteia etc, iar diverse tipuri de structuri organizationale au fost descrise in literatura de catre Daled si Mc Quarter, 1998; Heller si Hindle, 2003.

**Legislatie , licentiere, acreditare**

Legislatia, licentierea si acreditarea sunt adeseori confundate intre ele sau sunt privite ca si puncte de vedere in cadrul conducerii unei banci de celule si tesuturi. De fapt sunt concepte complet diferite si toate trei impreuna conlucreaza pentru un sistem integrat de management.

Ca si definitie vom avea:

Legislatie – sau cerintele legislative cu care o organizatie sau un individ trebuie sa se conformeze pentru a putea functiona. Respectarea cerintelor legislative se verifica prin inspectie individuala si este confirmata prin licentiere.

In general cerintele legislative sunt de tipul restrictiv orientativ si ofera indicatii precise in legatura cu ceea ce o organizatie sau un individ trebuie sa faca pentru a fi in concordanta cu legislatia in vigoare.

Acreditarea este reprezentata de ansamblul cerintelor pe care organizatiile trebuie sa le indeplineasca pentru a fi acreditate si pe care trebuie sa le mentina pe toata perioada acreditarii. In cazul bancilor de celule si tesuturi reproductive autoritatea competenta este Ministerul Sanatatii prin ANT ( Agentia Nationala de Transplant ).

Licentierea este procesul prin care o organizatie sau un individ este identificat ca se conformeaza cerintelor legale in vigoare.Licentierea in cazul unitatilor sanitare ce activeaza in domeniul reproducerii umane asistate este data de catre Ministerul Sanatatii prin Directia de Sanatate Publica.

In plus exista si certificarea ce poate fi definita ca un proces prin care o organizatie este identificata ca respecta si indeplineste criteriile unor anume standarde. In cazul bancilor de celule si tesuturi reproductive se aplica familia standardelor ISO 9000. ( ISO 9001: 1994, ISO 9002: 1994, ISO 9003: 1994) cu editiile revizuite spre exemplu ISO 9001: 2002 .

Deasemenea se poate avea in vedere ISO 19011: 2002 precum si ISO 15189: 2003 si nu in ultimul rand standardului ISO 17025:2005.

Se poate avea in vedere deasemenea sistemul de certificare implementat de catre ESHRE (Societatea Europeana de reproducere Umana asistata si Embriologie – ARTCC.

In ceea ce priveste cerintele legislative trebuie avute in vedere Directivele Europene pentru Celule si Tesuturi si implementarea acestora in legislatia romanesca. Din acest punct de vedere in cazul clinicilor de reproducere umana asistata trebuie sa avem in vedere urmatoarele:

* EUTCD directiva 2004 23 EC
* EUTCD directiva 2006 17 EC
* EUTCD directiva 2006 86 EC

si transpunerea acestora in legislatia romaneasca.

Legea nr 588/ 2004 cu modificarile si completarile ulterioare. Titlul V din Legea 95 / 2006cu modificarile si completarile ulterioare si OG 79/ 2004.

Desi domeniul reproducerii umane asistate medical este foarte bine cunoscut, managementul calitatii se bazeaza pe monitorizarea activitatii celulare in conditiile monitorizarii unor parametri din spatiul de lucru, echipamente etc,

Se cunoaste foarte bine faptul ca in urma actiunii unor agenti fizico-chimici embrionii sunt afectati in mare masura astfel incat pentru o corecta implementare a unui sistem de calitate trebuiesc monitorizati toti parametri ce pot aduce/ produce modificari in ceea ce priveste dezvoltarea embrionara.

In cadrul unui sistem de management al calitatii eficient se stie ca un rol important il au indicatorii de performanta ai sistemului, in cazul nostru indicatorii de performanta ai activitatii.

In cadrul managementului calitatii in bancile de celule si tesuturi reproductive ( embriologie/andrologie) este foarte important sa constientizam instrumentele proactive in ceea ce priveste managementul riscului si sa le utilizam in proiectarea sistemului pentru optimizarea procesului.

Trebuie deasemenea sa standardizam pe cat posibil evaluarea ovocitelor, spermatozoizilor si embrionilor deoarece acestea sunt considerate a fi componentele esentiale in cadrul monitorizarii calitative ale proceselor din banca de celule si tesuturi.

In fiecare moment trebuie sa tinem seama de ciclul PDCA ( Plan Do Check Act ) Managementul calitatii se sintetizeaza ca si:

* Controlul calitatii
* Asigurarea calitatii
* Imbunatatirea calitatii

Din punctul de vedere al managementului riscului cele mai importante aspecte de avut in vedere sunt :

* Eliminarea riscului
* Evitarea riscurilor
* Minimizarea riscului
* Trasferul riscului
* Acceptarea riscului,

In ceea ce priveste sistemul de management:

* Schematizarea proceselor
* Sistemele de analiza
* Indicatorii si criteriile de referinta.

In acest moment managementul riscului este considerat a fi parte integranta dintr-un management de calitate proactiv. ( L. L. Leape, 1997) ( David Mortimer, 2005 )

**Indicatorii si criteriile de referinta**

Indicatorii: ( nu putem controla ceva ce nu putem masura)

De aceea indicatorii trebuie sa fie:

* De incredere sa masoare ceva util ce este definitoriu pentru procesul ce urmeaza a fi monitorizat;
* Robusti pentru minimizarea efectelor straine in ideea de a masura doar procesul la care se refera;
* De rutina – colectarea datelor nu trebuie sa fie dificila, fara sa implice o multime de munca suplimentara.

Pentru optimizarea activitatii si rezultatelor trebuie sa se tina seama de faptul ca intregul proces proces este guvernat de biologia gametilor si embrionilor si de aceea trebuie sa:

* Asiguram conditii optime pentru gameti si embrioni;
* Protejam gametii si embrionii de stresul fiziologic;
* Protejam gametii si embrionii de factorii externi adversi;
* Stresul celular este mare consumator energetic si deasemenea poate duce la alterarea expresiei genice si/ sau spre exemplu a imprintingului;
* Cultura embrionara suboptimala poate duce la modificari iremediabile care pot afecta viitorul produs de conceptie.

O alta etapa importanta in cadrul managementului de calitate este recunoasterea tuturor factorilor sursa de influenta ce afecteaza procesele din banca de celule si tesuturi reproductive(embriologie/andrologie).



Sursele de influenta identificate:

* Derivate de la pacient
* Clinice: stimularea ovariana, punctia ovariana, embriotransfer, suportul luteal;
* De mediu ( macro ): constructia spatiului, designul spatiului , amplasarea echipamentelor,circuitul de lucru, aer, etc
* De mediu ( micro ): temperatura, pCo 2/ ph
* Echipament: calibrare, fuctionare defectuoasa;
* Materiale: sa fie potrivit ca utilizare, sa nu fie citotoxice, sa fie manufacturate de un producator certificat din punct de vedere al calitatii ( marcaj CE)etc.
* Metodele: sa fie potrivite scopului, corect alese,SOP (documentate )
* Personal: training, indemanare si conceptie
* Erori

Din punctul de vedere al surselor de influenta, optimizarea sistemului din banca de celule si tesuturi reproductive (embriologie/andrologie) pentru fiecare componenta a procesului, trebuie sa aiba in vedere urmatoarele:

* Identificarea proceselor cu exactitate;
* Identificarea profactorilor necesari pentru a asigura operabilitatea proceselor in parametri optimi;
* Asigurarea tuturor acestora precum si un control optim al acestori factori;
* Identificarea tuturor factorilor ce pot influenta negativ procesele;
* Asigurarea ca toate aceste posibile interferente sunt controlate, minimizate si daca este posibil eliminate;
* Monitorizarea tuturor proceselor si a rezultatelor( outcome ).

Exemplificare pe un proces din banca de celule si tesuturi reproductive (embriologie/andrologie).

Procesul de fertilizare in cazul unui FIV clasic (identificarea procesului):



Fertilizarea : un ovocit matur (atat maturitate nucleara M II cat si maturitate citoplasmatica ) ce are capacitatea de a produce un zigot noormal ce se va dezvolta intr-un embrion normal si competent.

Procesul de fertilizare in vitro: abilitatea de preparare a spermei si de cultura a acesteia de a capacita spermatozoizii si de a fertiliza ovocitele mature.

Surse de influenta negativa: ( identificare)

* Disfunctii spermatice
* Fragmentarea ADN la nivelul spermatozoidului
* Anticorpi antispermatici
* Defecte ale zonei pellucida (eg ZP3)
* Maturarea ovocitara incompleta sau anormala ( defecte de ooplasma)

Selectia indicatorilor cheie pentru procesul de reproducere umana asistata medical. In acest caz trebuie avut in vedere Consensul de la Viena in ceea ce priveste indicaorii de performanta din cadrul laboratoarelor de reproducere umana asistata medical.

Indicatorii de performanță (IP) reprezintă măsuri obiective pentru evaluarea domeniilor critice (siguranța pacienților, eficacitatea, echitatea, corectitudinea fata de pacient, oportunitatea și eficiența tratamentelor medicale) (Kohn et al., 2000). În activitatea de reproducere umana asistata medical sunt necesari indicatori de calitate pentru monitorizarea și evaluarea sistematică a contribuției acestuia la îngrijirea pacientului (ISO15189-2012) și reprezintă un element vital în cadrul sistemului de management al calității (QMS) (Mortimer și Mortimer, 2015; ESHRE – Guidelines for Good practice in IVF lab, 2016).

Orice indicator de performanta trebuie să fie fiabil și robust, iar colectarea datelor pentru urmarirea indicatorul ar trebui să fie simpla. În plus,trebuie definit cu certitudine procesul biologic sau tehnic pe care dorim sa-l monitorizam. Indicatorii de performanta cheie (KPI) sunt indicatori considerați esențiali pentru evaluarea introducerii a unei tehnici sau a unui proces; stabilirea unor standarde minime de competență; monitorizarea performanțelor permanente în cadrul unui sistem de managementul calitatii (pentru controlul calității (IQC), asigurarea externă a calității (EQA)); analiza comparativă și îmbunătățirea calității.

În general, rezultatele unei serii de indicatori de performanță de tip cheie (KPI) va vor oferi o imagine de ansamblu adecvată a celor mai importanți pași din Procesul activitatii de reproducere umana asistata medical. (Salinas et al., 2010).

Definirea procesului in cadrul managementului de calitate:-cerinte:

1. Definirea procesului ce urmeaza a fi monitorizat;
2. Masurarea doar a procesului dorit;
3. Minimizarea influentelor externe;

 *Exemplu definire proces :*

*Includerea in monitorizare a urmatoarelor criterii:*

* *Doar punctiile ovariene cu raspuns normal (exemplu 4-15 ovocite)*
* *Excluderea probelor nonejaculate sau cu sperma crioconservata (pot exista alterari functionale)*
* *Excluderea cazurilor cu donare de sperma ( sperma de la donatori nu poate fi considerata cu functionabilitate medie ci ridicata)*
* *Includerea zigotilor > 2PN ca fiind fertilizati*

*Nota: Criteriile sunt in concordanta cu limitele de control ce utilizeaza aceleasi criterii. Deoarece variatia procesului este redusa, limitele de avertizare si control vor fi mai stricte pentru o mai mare relevanta.*

**Pentru un sistem de management al calitatii performant s-au identificat 3 tipuri de indicatori ce pot fi monitorizati:**

1. **Indicatori de referinta ( IR)** – se refera la indicatorii de intrare pentru activitatea de reproducere umana asistata si reprezinta conexiunea dintre indicatorii clinici si cei de laborator (ovocite)
2. **Indicatori de performanta ( IP) –** aceste date ar trebui documentate si stocate chiar daca nu sunt raportate in mod curent in diagramele de control
3. **Indicatori de performanta cheie –** se refera la activitatea de baza a bancii de celule si tesuturi reproductive si apar intotdeauna in diagramele de control.

**Indicatorii de referinta :**

1. **Procentul de ovocite recuperate/ ciclu de stimulare**

Numarul de ovocite recuperate/ nr foliculi in ziua de declansare x100 - interval de referinta : 80-95% din numarul foliculilor masurati

1. **Procentul de ovocite in MII ( mature) utilizate la ICSI**

Numarul de ovocite in MII ( mature) / numarul de CCO ( complex cumulus-ovocit) x100- interval de referinta 75-90%

**Indicatori de performanta:**

1. Motilitatea spermei dupa preparare ( pentru fertilizare in vitro si/sau inseminare intrauterina) spematozoizi cu miscari prograsive / total spermatozoizi numarati x 100 – interval de competenta : 90% ; interval de referinta ≥ 95%.
2. Frecventa polispermiei pentru fertilizarea in vitro : numarul de ovocite fertilizate cu > 2PN / numar de CCO ( complex cumulus –ovocit) inseminat x100 - interval de competenta si/sau referinta :<6
3. Rata de PN pentru fertilizare in vitro : numarul de I ovocite PN / numar de CCO ( complex cumulus –ovocit) inseminat x100 – interval de referinta si/sau competenta : < 5
4. Rata de PN pentru ICSI ( injectie intracitoplasmatica a spermei) : numarul de I ovocite PN / numarul de ovocite mature ( MII) injectate x100: interval de referinta si/sau competenta : < 3
5. Procentul de blastocisti de buna calitate ( ziua 5): numarul de blastocisti de buna calitate in ziua 5 / numarul de ovocite 2PN ( pronuclei)/2PB ( globul polar) in ziua 1 x 100 - interval de competenta ≥ 30 ; interval de referinta ≥ 40.

**Indicatori cheie de performanta :**

Mai jos regasiti minimul de indicatori de performanta – cheie din punct de vedere al activitatii bancii de celule si tesuturi ; evident acoperind toate procedurile posibile. Exista o serie mult mai mare de indicatori cheie de performanta , fiecare banca, in functie de specific , de serviciile prestate , de echipamente , de personal isi poate adapta setul de indicatori pentru o mai buna masurare a eficientei , sigurantei si calitatii serviciilor prestate. ( conform The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators ; ESHRE Special Interest Group of Embryology1,\* and Alpha Scientists in Reproductive Medicine2,)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **KPI** | **Interval de competenta** | **Interval de referinta** |
| Rata de degenerare ICSI | ≤10 | ≤5 |
| Rata de fertilizare normala ICSI | ≥65 | ≥80 |
| Rata de fertilizare normala la FIV | ≥60 | ≥75 |
| Rata de nefertilizare la FIV | <5 | <5 |
| Rata de clivaj | ≥95 | ≥99 |
| Rata de embrioni de ziua 2 | ≥50 | ≥80 |
| Rata de embrioni de ziua 3 | ≥45 | ≥70 |
| Rata de blastulatie | ≥40 | ≥60 |
| Rata de biopsiere | ≥90 | ≥95 |
| Rata de supravietuire la decongelare pt blastocisti | ≥90 | ≥99 |
| Rata de implantare ( stadiu de clivaj) | ≥25 | ≥35 |
| Rata de implantare ( stadiu de blastocist) | ≥35 | ≥60 |

In ceea ce priveste indicatorii de performanta pentru cryoprezervare avem prin consensul Alpha urmatorii:

O. Pentru ovocite cryoprezervate

O1. Indicator :Supraviețuirea morfologică

Acest KPI a fost definit ca: proporția de ovocite intacte din punct de vedere morfologic, pe baza intenției de injectare, la momentul ICSI. Adică, dacă ovocitul este considerat a fi adecvat pentru injectare, atunci este considerat a fi normal din punct de vedere morfologic în sensul acestui KPI. Ovocitele cu oolemă sau ooplasmă anormală la momentul ICSI nu ar trebui excluse.

Deoarece acest KPI ar putea fi afectat de numărul de cazuri și/sau de experiența practicianului, au fost atribuite diferite valori pentru atingerea competenței atât pentru congelarea lentă, cât și pentru vitrificare. Valorile competenței sunt cele care ar trebui atinse de orice practician considerat competent să efectueze crioprezervare, în timp ce intervalele de referinta sunt ținte aspiraționale.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| KPI |  | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Supraviețuirea morfologică (O1) | Congelare lenta | ≥50% | 75% |
| vitrificare | 70% | 85% (95% pentru ovocite provenite de la donatoare sub 30 de ani) |

O2. Indicator:Rata de fertilizare

 Indicatorul rata de fertilizare a fost definit ca proporția de ovocite cu 2 pronuclei în momentul verificării fertilizării (17 ± 1h după inseminare).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de fertilizare (O2) | Nu mai mult de10% (adică 10 puncte procentuale) mai mica decât cea pentru populația comparabilă de ovocite proaspete din banca de celule si tesuturi |

O3.Indicator: rata de dezvoltare embrionara

Indicatorul rata de dezvoltarea embrionara a fost definit ca proporția de embrioni în stadiul de dezvoltare la care ar fi trebuit sa fie și gradul de dezvoltare la care se regaseau la momentul observației (adică stadiul de 2 celule la 26±1h după ICSI, stadiul de 4 celule la 44±1h după inseminare). , stadiul de 8 celule la 68±1h post inseminare, stadiul morula la 92±2h post inseminare si stadiul blastocist la 116±2h post inseminare.

Rata de dezvoltare embrionara,pentru embrioni proveniti din ovocite vitrificate ar trebui să fie aceeași ca și pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive. Pentru embrionii proveniti din ovocite crioconservate prin înghețare lentă, pot aparea oarecare întârzieri în rata de dezvoltare. Astfel au fost atribuite urmatoarele valori pentru atingerea competenței și pentru intervalul de referinta.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| KPI |  | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de dezvoltare embrionara (O3) | Congelare lenta | Nu mai mult de 10-30% mai mica decat rata pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive | Aceeasi rata ca pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |
| vitrificare | Aceeasi rata ca pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

O4: Indicatorul rata de implantare

Indicatorul rata de implantare a fost definit ca proporția de sarcini confirmate ecografic cu batai de cord fetal în raport cu numărul de embrioni transferați .Rata de implantare in cazul embrionilor proveniti din ovocite cryoprezervate ar trebui să fie cu cel mult 10-30% mai mică decât populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de implantare (O4) | Nu mai mult de 10-30% mai mica decat rata pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

Z. Pentru zigoti crioconservati

Valorile KPI de mai jos sunt considerate in conditiile in care nu a existat o altă preselecție a zigoților sau nu s-au crioconservat zigoți anormali și că nu există cerințe pentru transferul ulterior al oricăror embrioni anormali după decongelare/devitrificare.

Pentru zigoții proveniti dupa utilizarea ICSI, observațiile făcute în timpul procedurii de ICSI privind calitatea ovocitelor ar trebui întotdeauna înregistrate. Acest lucru ar permite o posibilă analiză ulterioară a prevalenței anomaliilor oolemei/ooplasmei care ar fi putut fi cauzate de procedura de crioprezervare.

Z1. Indicator rata de supravietuire morfologica

Acest KPI a fost definit ca proporția de zigoți intacți din punct de vedere morfologic imediat după decongelare/devitrificare în raport cu numărul de zigoți normali din punct de vedere morfologic crioconservați înainte de defalcarea anvelopei nucleare . Un zigot intact din punct de vedere morfologic este unul care este similar ca aspect cu un zigot proaspăt. Aceeași rată de supraviețuire ar trebui atinsă prin congelare lentă ca și prin vitrificare.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de supravietuire norfologica (Z1) | 70%\* | 85%\* |

\*Valoarea KPI este calculată ca proporție de zigoți normali din punct de vedere morfologic crioconservați

Valorile competenței sunt cele care ar trebui atinse de orice practician considerat competent să efectueze crioprezervare, în timp ce punctul intervalului de referință este o țintă aspirațională.

Z2. Indicator rata de clivaj

Acest KPI a fost definit ca proporția de zigoți decongelati/devitrificati care se divid pentru a forma un embrion in stadiul de dezvoltare/clivaj . Rata de diviziune ar trebui să fie aceeași ca și pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de clivaj (Z2) | Aceeasi rata ca pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

Z3.Indicator rata de dezvoltare embrionara

Indicatorul rata de dezvoltarea embrionara a fost definit ca proporția de embrioni în stadiul de dezvoltare la care ar fi trebuit sa fie și gradul de dezvoltare la care se regaseau la momentul observației (adică stadiul de 2 celule la 26±1h după ICSI, stadiul de 4 celule la 44±1h după inseminare). ,stadiul de 8 celule la 68±1h după inseminare, stadiul de morula la 92±2h după inseminare și stadiul de blastocist la 116±2h după inseminare

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de dezvoltare embrionara (Z3) | Aceeasi rata ca pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

Z4 Indicator rata de implantare

Indicatorul rata de implantare a fost definit ca proporția de sarcini confirmate ecografic cu batai de cord fetal în raport cu numărul de embrioni transferați .Rata de implantare in cazul embrionilor proveniti din zigoti cryoprezervati ar trebui să fie cu cel mult 10-30% mai mică decât populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de implantare (Z4) | Nu mai mult de 10-30% mai mica decat rata pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

E.Pentru embrioni crioconservati

 Pentru calculul KPI trebuie considerati embrionii selectați pentru crioprezervare ce trebuie să îndeplinească criteriile pentru un embrion optim in stadiul de dezvoltare/clivaj (adică stadiul de 4 celule la 44±1h post inseminare, stadiul de 8 celule la 68±1h post inseminare cu fragmentare <10%, dimensiune specifică a celulei și fără multinucleatie.

Valorile KPI sunt considerate atât pentru embrionii din ziua 2, cât și pentru ziua 3.

Valorile KPI recomandate se bazează pe metodologia standard actuală pentru înghețarea embrionilor. Daca utilizati metode alternative de crioprezervare, atunci ar trebui sa utilizati valori alternative ale KPI. În mod similar, deoarece valorile KPI de vitrificare se bazează pe o experiență mai recentă și relativ limitată, este posibil să fie nevoie să fie revizuite în viitor.

E1 și E2: Indicatorii- rata de supraviețuire post congelare din punct de vedere morfologic

KPI-urile care evalueaza rata de supravietuire post congelare pentru embrioni se bazează pe proporția de embrioni decongelati/devitrificati cu (i) 100% și (ii) ⩾50% din total embrioni intacti.Competența și valorile KPI de referință pentru rata de supraviețuirea post cryoprezervare din punct de vedere morfologic s-au bazat pe evaluarea proporției de embrioni in stadiul de dezvoltare/clivaj congelati prin metoda lenta și vitrificati în care acestia sunt intacți și respectiv pentru embrionii cu cel puțin 50% structura intacta (E2).

Trebuie subliniat faptul că valorile KPI nu împiedică transferul de embrioni cu morfologie suboptimala, deoarece acest lucru poate fi unica oportunitate a pacientilor.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| KPI |  |  | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de supravietuire post cryoprezervare dpdv morfologic(E1) | 100%intacti | Congelare lenta | 40% | 55% |
| vitrificare | 70% | 85% |
| Rata de supravietuire post cryoprezervare dpdv morfologic(E2) | ≥50% intacti | Congelare lenta | 60% | 85% |
| vitrificare | 85% | 95% |

E3 Indicator rata de dezvoltare post decongelare/devitrificare

Pentru calcului acestui indicator cheie de performanta se vor considera doar embrionii cu 100% structura morfologica intacta post decongelare, respectiv devitrificare

Dezvoltarea post-cryoprezervare include clivarea și dezvoltarea ulterioară la stadiul de blastocist, precum și rata de implantare, definită ca proporția de sarcini confirmate ecografic cu batai de cord fetal în raport cu numărul de embrionii transferați

Rata de dezvoltare a embrionilor după decongelare/devitrificare ar trebui să fie cu cel mult 10% (relativ) mai mică decât populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| KPI |  | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de dezvoltare post decongelare/devitrificare (inclusiv rata de implantare)(E3) | 100%intacti | ≤ 10% (adică 10 puncte procentuale) mai mica decât cea pentru populația comparabilă de embrioni proaspeti din banca de celule si tesuturi | Aceeasi rata ca pentru populația comparabilă de embrioni proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

B. Pentru blastocisti cryoprezervati

Deoarece rata de dezvoltare in vitro este afectată în mod substanțial de tipul și parametrii sistemului de cultură, pentru indicatorii cheie de performanta ai blastocistilor post congelare/vitrificare nu s-au facut diferențieri între stadiile de blastocist (precoce, blastocist expandat, eclozat etc) sau regate de ziua post-inseminare.

În mod similar, nu exista nicio recomandare cu privire la colapsul blastocelului, deoarece acesta este dependent de protocol și va fi luat în considerare în fiecare banca de celule si tesuturi reproductive prin referire la rezultatele cu blastocisti proaspeti echivalente.

In ceea ce priveste rezultatele raportate pentru embrionii biopsiați crioconservați în stadiul de blastocist acestea sunt substanțial mai bune după vitrificare decât dupa congelare lentă.

B1 – indicator rata de supravietuire

 Indicatorul rata de supravietuire a blastocistului dupa crioprezervare este definit ca proportia de blastocisti supravietuitori in raport cu numarul total de blastocisti decongelati/devitrificati si se aplica la blastocistii cu cel puțin 75% morfologie intacta.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| KPI |  |  | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de supravietuire post cryoprezervare (B1) | 75%intacte | Congelare lenta | 70% | 85% |
| vitrificare | 80% | 95% |

B2.- Indicator rata de transfer

Acest KPI a fost definit ca proporția de blastocisti decongelati/devitrificati care sunt de o calitate suficientă pentru a fi transferati. Acest parametru presupune că decizia de transfer nu este supusă limitarilor legislative din punct de vedere al numarului de embriotransferuri efectuate/ pacient si nu ia in calcul deciziile de transfer al unor blastocisti suboptimali. Nu conteaza tipul de embryotransfer (singular, dublu sau multiplu)(SET/DET)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| KPI |  | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de transfer (B2) | Congelare lenta | 70% | 85% |
| vitrificare | 80% | 95% |

B3 –indicator rata de implantare

Indicatorul rata de implantare a fost definit ca proporția de sarcini confirmate ecografic cu batai de cord fetal în raport cu numărul de blastocisti transferați

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KPI | Interval de Competență | Interval de referinta |
| Rata de implantare (B3) | ≤ 10% (adică 10 puncte procentuale) mai mica decât cea pentru populația comparabilă de blastocisti proaspeti din banca de celule si tesuturi | Aceeasi rata ca pentru populația comparabilă de blastocisti proaspeți din banca de celule si tesuturi reproductive |

**Optimizarea sistemului pentru embrioni**

1. Imbunatatirea colectarii si culturii ovocitelor la punctia ovocitara. Imbunatatirea procedurilor trebuie sa tina cont nu doar de partea de cultura celulara cat si de partea de manipulare si observatie. Este deosebit de important sa avem un timp de manipulare cat mai mic si astfel scoringuul sa nu influenteze parametrii optimi de cultura;
2. O temperatura optima si stabila, deasemenea controlata;
3. Un ph optim si stabil, obtinut in cadrul echilibrarii mediilor de cultura. In acest mod se evita stresul de ph.
4. O presiune redusa a O2 protejeaza impotriva stresului oxidativ.
5. Protectia impotriva substantelor toxice spre exemplu VOC-urile ( volatil organic compounds = substante organice volatile)
6. Alegerea unor medii de cultura potrivite pentru un suport optim al metabolismului si homeostaziei embrionare.

Toate acestea pot fi obtinute prin urmatoarele:

* Design adecvat al spatiului;
* Alegerea potrivita a materialelor de constructie si amenajare;
* Designul si alegerea potrivita a hotei;
* Alegerea potrivita a incubatorului si mai ales a sistemului de incubare;
* Designul corect al sistemului de alimentare cu gaze si deasemenea alegerea corecta a tipurilor si amestecurilor de gaze;
* Alegerea corecta a mediilor e cultura si mai ales a tipului de cultura.

Un rol deosebit de important in succesul activitatii bancii de celule si tesuturi reproductive il au echipamentele.

In continuare voi face cateva precizari referitoare la acest subiect.

**Echipamentul: selectie, validare si control de calitate.**

In ceeace priveste selectia echipamentelor trebuie sa avem in vedere in primul rand care sunt caracteristicile tehnice ale acestora, care mai ales daca aceste caracteristici si performante sunt cele necesare.

Trebuie verificat cat de bine se potrivesc caracteristicile si performantele echipamentului, necesitatilor particulare ale unei anumite banci de celule si tesuturi reproductive.

Trebuie avut in vedere, la momentul selectiei echipamentului si o serie de alti parametri cum ar fi:

* Fiabilitatea
* Reputatia producatorului
* Longevitatea functionarii
* Piese de schimb si service
* Consumabile
* Mentenanta
* Usurinta in utilizare si mentenanta
* Instalarea si calibrarea
* Posibilitatea calibrarii la nivel intern
* Calibrarea operationala si dupa instalare sau la repunerea in functiune
* Verificarea operationala (posibilitatea de monitorizare a parametrilor echipamentului in timp real)
* Rezultatele procesului ce se doreste de la fiecare echipament in parte
* Interconectivitatea tuturor echipamentelor necesare
* Dimensionarea echipamentului in functie de necesitati.

Orice banca de celule si tesuturi reproductive trebuie sa monitorizeze si echipamentele pentru a putea observa daca apare la un moment dat necesitatea de a optimiza echipamentele si astefel procesele desfasurate in banca.

Scopul, dupa cum se stie nu este intotdeauna comun. Fiecare proces in parte are scopul sau care cumulativ la nivelul intregii organizatii defineste scopul final. Este foarte important sa putem identifica si stabili scopul fiecarui proces in parte pentru a putea atinge scopul final. Spre exemplu: scopul centrifugarii din cadrul tehnicii de preparare a spermei este o mai buna separare a spermatozoizilor de lichidul seminal. Scopul activitatii este crearea unor embrioni de calitate superioara,iar scopul final al organizatiei este o rata cat mai mare de copii nascuti.

Fiecare scop si fiecare rezultat al fiecarei etape de proces este interconectat la scopul si rezultatul final si de aceea trebuie monitorizat si verificat continuu.

**Schema de evaluare embrionara in ziua 3.**

In decursul timpului schema de evaluare embrionara in ziua a 3-a, a evoluat.

Sumarizarea modului de evaluare.

1. Descriptiva ( buna, acceptabila, slaba si necunoscuta SART )
2. Simpla
3. Evaluare numerica:- de la 1-4 ( Dawson et al, 1987)
* de la 1-5 (Veeck, 1988)
1. Revers numerica: - de la 4-1 ( Steer et al, 1992, UK ACE)
2. Alfabetica : de la A-D ( Torello ; ASEBIR, 2007)
3. Alfa simbolica: de la I-V (Alikani & Cohen, )
4. Calificativ simbolica: +/-; +/++/+++.
5. Complexa : evaluarea multiparametru ceea ce permite caracterizarea utilizand scoruri partitionale.
6. Scoringul consensual Istanbul ( Alpha, ESMRE SIG-E, 2011 ), este reprezentat de scoringul stabilit prin consens la nivel international si este de tipul: FORMAT= numar celule, evaluare, motivare. Spre exemplu: 4 celule, gradul 2, fragmentare.

Din pacate o monitorizare doar in ceea ce priveste scoringul embrionar nu este suficienta pentru a putea realiza de ce la un moment dat rezultatele dorite nu sunt cele obtinute, deoarece nu putem sti daca scoringul slab apare in urma unei dezvoltari celulare incetinite sau a unor anomalii a blastomerelor sau in urma aparitiei fragmentarilor sau a unei citoplasme cu variatii de la normal.

Deasemenea in cazul scoringului poate interveni subiectivitatea operatorului si de aceea fara informatii aditionale legate de embrioni si de alti factori ce pot influenta dezvoltarea si calitatea acestora, simpla monitorizare a scoringului nu este suficienta. Este insa importanta deoarece nu semnaleaza imediat aparitia unei eventuale probleme in conditiile de mediu sau de lucru.

Model de schema de evaluare embrionara in ziua 3.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Parametru | 1 | 2 | 3 |
| Fragmente citoplasmatice | >10% (% volum embrionar) | <10% (volum embrionar) | fara fragmente |
| Forma blastomerelor | neregulata | usor neregulata |  |
| Numarul blastomerelor | inegal | egal |  |
| Marimea blastomerelor | inegala | egala |  |
| Membrana blastomerelor | nedistincta | Distincta, neteda/ stralucitoare |  |
| Acoperirea embrionara | neacoperita | acoperita |  |
| Rata de dezvoltare | <6 celule (la 68 ± 1h) | 6-8 celule (la 68 ± 1h) |  |
| Vacuole  | prezente | absente |  |
| Aspectul citoplasmatic | Granulat si/ sau intunecat | Usor granulat | Uniform, translucid |

Interpretarea acestui tip de scoring multi parametru.

Maxim 20

Excelent 19-20

Bun 17-18

Normal 15-16

Slab <15

Un tip de scoring similar este folosit si propus de Oozoa Biomedical (2012 ).

Pentru un sistem bine pus la punct in ceea ce priveste managementul calitatii in banca de celule si tesuturi reproductive (embriologie/andrologie) trebuie avut in vedere si momentul in care in urma monitorizarii si evaluarii proceselor constatam ca exista probleme.

De aceea trebuie identificat si pus la punct un proces de evaluare si corectie. Un exemplu de proces schematizat mai jos:



Pentru o buna administrare a unei scheme de evaluare si solutionare a unui neconformitati este absolut necesara analiza cauzei radacina (RCA- root cause analysis).

O asemenea analiza este la baza unui proces ce trebuie sa aiba loc dupa aparitia unei probleme.

In acest caz este necesar sa identificam factorii ce au dus la aparitia unei neconformitati si de aceea vom clasifica factorii dupa cum urmeaza:

1. Fara contributie
2. Contributori
3. Nu exista date suficiente pentru a stabili.

In acest din urma caz apare necesitatea de a crea sau accesa datele necesare pentru a putea rula o noua clasificare.

In cazul in care identificam o serie de factori este necesara ierarhizarea acestora pentru a putea construi o matrita de risc.

Ulterior identificarii si ierarhizarii factorilor contributori trebuie dezvoltat si implementat un plan de actiune.

In general la nivelul unei banci de celule si tesuturi reproductive aparitia unor neconformitati este datorata unui cumul de factori contributori si mai putin unei cauze unice.

Deasemenea, literatura de specialitate recomanda ca termenul “cauza” sa nu fie folosit in rapoartele intocmite datorita imposibilului impact psihologic si / sau legal.

Pentru ca un proces de rezolvare a unei neconformitati sa fie eficient trebuie ca aceasta sa

1. Duca la normalizarea operatiunilor in cel mai scurt timp.
2. Duca la o mai buna intelegere a proceselor inclusiv in ceea ce priveste performantele pe care le dorim in cadrul acestora.
3. Ne ofere informatii atat anterioare cat si curente in legatura cu aceste procese, trebuie sa putem stabili cel putin un indicator cheie de performanta, daca nu mai multi si sa putem realiza grafice de control.
4. Ne ofere posibilitatea analizarii proceselor in adancime, utilizand ( la modul ideal ) si date aditionale pe care deja le avem.
5. Duca la minimizarea posibilitatii aparitiei in viitor a unor situatii similare.

Datorita dezvoltarilor tehnologice aparute si a dezvoltarii unor tehnici noi si mult mai performante a fost posibil ca in patru decade sa ajungem de la primele culturi de embrioni de animale pana la cultura si transferul unor embrioni umani testati din punct de vedere genetic.

Toate aceste progrese si mai ales importanta acestor tehnici necesita un control de calitate si deasemenea metode de asigurare a calitatii in laboratoarele de reproducere umana asistata tocmai pentru a asigura procese repetabile.

Daca progresele sunt constante toti specialistii recomanda introducerea unui sistem total de management al calitatii (TQM).

Controlul calitatii (QC) in ceea ce priveste activitatile din banca de celule si tesute reproductive este esential pentru bunul mers al acestuia. Controlul calitatii trebuie sa functioneze in paralel cu activitatile specifice din banca. Inregistrarea temperaturii unui echipament este un exemplu de activitate de control al calitatii. Toate aceste activitati de control au fost special planificate pentru a putea demonstra si verifica daca spre exemplu acel echipament produce aceleasi rezultate de fiecare data.

In ceea ce priveste asigurarea calitatii (QA), aceasta consta in metode complexe de monitorizare si evaluare a tuturor proceselor dintr-o banca.

In timp ce controlul calitatii este concomitent activitatilor de banca, asigurarea calitatii este un proces retrospectiv.

Mayer et al in 2003 a definit asigurarea calitatii si a inclus ( pentru cazul particular al laboratoarelor de embriologie) toate activitatile ce trebuie avute in vedere.

Deasemenea trebuie, pentru un bun management al calitatii sa tinem seama si de imbunatatirile calitative (QI) prin intermediul acestora ridicam performantele activitatilor din banca de celule si tesuturi reproductive.

QI este diferit de QA si QC si este special facut pentru a identifica problemele sau erorile din cadrul proceselor si activitatilor din bamca de celule si tesuturi reproductive si de a le corecta.

Un exemplu de QI este acela de a adapta procedurile bancii la noile tehnologii de evaluare a zigotilor tocmai pentru a imbunatati criteriile de selectie a embrionilor destinati transferului.

Managementul calitatii totale ( TQM) este o combinatie a tuturor acestor trei subiecte puse in discutie.

Această orientare nu schimbă structura autorităţii în organizatie şi nici nu diminuează rolul esenţial al managementului de vârf. Ierarhia inversată pune accent pe relaţiile de tip “oferire de servicii” şi pe importanţa consumatorului pentru organizatie , de aceea este modelul perfect pentru organizatiile din domeniul sanatatii.



O parte importanta a MQ este mediul ambiant din spatiul de procesare.

Personalul bancii trebuie sa inspecteze echipamentul pentru a se asigura ca este in buna stare de functionare.

Instrumentele utilizate pentru determinarea temperaturii, concentratiei de gaze, umiditatii relative trebuie recalibrate cel mai tarziu la interval de un an.

In cazul in care producatorul recomanda un alt interval se va respecta recomandarea producatorului. Deasemenea trebuie avuta in vedere mentenanta tuturor echipamentelor ( dupa indicatiile producatorului si in concordanta cu politica organizatiei).

In conformitate cu legislatia in vigoare parametrii de monitorizare sunt urmatorii:

măsuri documentate de evaluare, corectare și monitorizare continuă a activității, precum, dar fără a se limita la:

1. temperatura în incubatoare (continuu și la 3 luni măsurare cu un echipament separat), temperatura pe suprafețe încălzite (zilnic și la 6 luni măsurare cu un echipament separat), temperatura aerului din zona de procesare și zona de crioprezervare și/sau stocare celule/țesuturi reproductive (continuu și la 3 luni măsurare cu un echipament separat), temperatura în frigidere (zilnic și o dată pe lună măsurare cu un echipament separat), temperatura din containerele de azot lichid (sau nivelul de azot), în funcție de procedura operațională de control din cadrul unității sanitare (săptămânal sau mai des, în funcție de rata de evaporare a fiecărui container);

2. determinarea nivelului de CO\_2 (sau amestec, după caz) din incubatoare prin măsurare directă sau indirectă - continuu și la 3 luni măsurare cu un echipament separat;

3. determinarea presiunii pozitive (continuu și la 12 luni măsurare cu un echipament separat);

Calitatea aerului din bancile de celule si tesuturi reproductive.

Primele referiri legate de acest subiect au aparut in anii ’90 cand au fost raportate primele corelatii dinte diversi agenti toxici ( de exemplu : bacterii, praf, VOC= componente organice volatile) si dezvoltarea embrionara.

Johnson et al, 1993 a publicat un studiu in legatura cu influenta VOC-urilor asupra culturii embrionare, iar Boone et al in 1999 si 2007 a publicat studii referitoare la acest subiect.

Cohen et al, 1998 au raportat efecte similare, precum si Van Wyl si Bersinger in 2004.

Pana la acest moment studiile fac referire doar la declinul culturii embrionare.

Kao et al in 2009 publica un studiu ce demonstreaza imbunatatirea rezultatelor in functie de calitatea aerului din zona de procesare.

La ora actuala este obligatoriu ca in banca de celule si tesuturi reproductive (embriologie/andrologie) sa existe aer purificat. Majoritatea laboratoarelor folosesc sisteme de ventilatie si purificare de tip MEPA (0.3 µm este o medie a particulelor aeropurtate gasite la masuratorile efectuate).

Unele dintre bancile ce prelucreaza celule reproductive, din strainatate, si-au adaugat filtre ULPA ceea ce aduce imbunatatiri calitatii aerului.

In ceea ce priveste normele in vigoare se recomanda sa avem ISO clasa V in ceea ce priveste numarul particulelor aeropurtate ( grad A).

|  |  |
| --- | --- |
| ISO nr de clasificare | Concentratia limita de particule ( particule /m³ de aer) |
| 0,1 µm | 0,2 µm | 0,3 µm | 0,5 µm | 1 µm | 5 µm |
| ISO clasa 1 | 10 | 2 |  |  |  |  |
| ISO clasa 2 | 100 | 24 | 10 | 4 |  |  |
| ISO clasa 3 | 1000 | 237 | 102 | 35 | 8 |  |
| ISO clasa 4 | 10.000 | 2370 | 1020 | 352 | 83 |  |
| ISO clasa 5 | 100.000 | 23.700 | 10.200 | 3520 | 832 | 29 |
| ISO clasa 6 | 1.000.000 | 237.000 | 102.000 | 35.200 | 8320 | 293 |
| ISO clasa 7 |  |  |  | 352.000 | 83.200 | 2930 |
| ISO clasa 8 |  |  |  | 3.520.000 | 832.000 | 29.300 |
| ISO clasa 9 |  |  |  | 35.200.000 | 8.320.000 | 293.000 |

Desi normele legislative actuale nu fac referinta decat la numarul particulelor aeropurtate este important de monitorizat si nivelul VOC-urilor atat din aerul din spatiul de procesare celule cat si nivelul acestora din interiorul incubatorului.(Worrilow et al,2001)

In ceea ce priveste incubarea, la acest moment se utilizeaza fie sistemul cu CO2 ( 5% CO2 + aer , 36.7 C si umiditate relativa >90%) sau sistemul trigaz (6%CO2, 5%O2, 89% N2, 36.7 C si umiditate relativa >90%).

In orice caz sistemul de filtrare HEPA/ULPA nu exclud aparitia VOC-urilor nici in aerul din zona de procesare nici in mediul incubatoarelor.

La masuratorile efectuate in diverse laboratoare s-au gasit hidrocarburi aromate de tipul (benzen, toluen, xilen) probabil provenite din vopselele folosite la zugraveli precum si isofluran datorita faptului ca spatiul de procesare celule reproductive se gaseste in imediata apropiere a salii de punctie si respectiv embriotransfer(ET utilizat pentru anestezie).

S-a remarcat deasemenea aparitia si existenta unor alcooli precum (etanol, propanol, fenol) provenititi cel mai probabil din materialele de curatenie.

Alte VOC-uri gasite au fost propani si hexan precum si aldehide (nonanol si decanol) provenite probabil de la parfum si /sau deodorantele folosite de personal.

VOC-urile similare au fost raportate si de Geisthovel et al,in 2001.

Monitorizarile gazelor de incubare au relevat (Merton et al,2007) benzen in cilindrii de CO2 ceea ce duce la recomandarea de a folosi filtre speciale pe sistemul de trasport de gaze.

Richardson et al in 1997 a raportat etilbenzen si benzaldehide provenite de la consumabilele de plastic.In acest moment se utilizeaza consumabile speciale ce nu elimina VOC-uri.

Tot in 1997 Cohen a raportat vapori de isopropil proveniti de la frigidere, de aceea la ora actuala stocarea refrigerata se realizeaza intr-o zona separata de cea operationala in cadrul bancilor de celule si tesuturi reproductive din unitatile sanitare acreditate pentru activitati de reproducere umana asista.

Gong si Dubin ,1998 au raportat VOC-uri provenite din instrumentele de scris.

Avand in vedere ca VOC-urile sunt solubile in ulei, nici sistemul inchis de cultura (sub ulei)nu protejeaza embrionii de aceste substante toxice.

Deaorece in decursul timpului s-au raportat o serie de VOC-uri ce provin din aerul exterior, preluate de sitemul de ventilatie HEPA / ULPA (Lichtenfels et al, 2007) la ora actuala este reglementat ca aerul exterior sa fie minim clasa D (clasa 8), sau aerul sa fie partial recirculat in cazul in care aerul exterior nu corespunde normelor.( aport de aer proaspat 30%)

În orice organizaţie există un sistem de management al calităţii, care funcţionează eficace sau nu funcţie de modul în care conducerea organizaţiei a stabilit şi organizat elementele care compun structura sistemului, relaţiile care există între elemente, mecanismul de autoreglare internă şi pentru relaţiile cu mediul socio-economic şi politic în care organizaţia îşi desfăşoară activitatea.

Sistemul calităţii din banca de celule si tesuturi reproductive este parte componentă a sistemului de management  calităţii total (TQM). Sistemul asigurării calităţii la efectuarea încercărilor este formulat în manualul calităţii  şi poate fi elaborat conform prevederilor SR EN ISO/CEI 17025:2002.

ISO 17025 este standardul care specifica cerintele privind competenta de a realiza teste si/sau calibrari. În cadrul acestui standard sunt incluse 15 cerinte privind managementul calitatii si 10 cerinte tehnice. Aceste cerinte arata ceea ce trebuie sa faca o banca de celule si tesuturi pentru a fi acreditata.

Standardul ISO 17025 cuprinde 5 elemente:

|  |  |
| --- | --- |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Domeniul; |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Referintele normative; |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Termeni si definitii; |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Cerintele managementului calitatii |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Cerintele tehnice |

Cerintele de acreditare privind managementul calitatii:

|  |  |
| --- | --- |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Organizatia |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Sistemul calitatii |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Controlul documentelor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Revederea cerintelor, ofertelor si a contractelor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Subcontractarea testelor si calibrarilor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Achizitia privind serviciile si furnizorii |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Subcontractarea testelor si calibrarilor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Achizitia privind serviciile si furnizorii |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Serviciul catre client |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Plângerile |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Controlul testelor necomforme si/sau al calibrarilor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Actiunea de prevenire |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Controlul înregistrarilor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Auditurile interne |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Revederea sistemului de management al calitatii |

Cerintele de acreditare privind tehnica

|  |  |
| --- | --- |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Generalitati |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Personalul si conditiile de mediu si de lucru |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Metodele de testare si calibrare precum si metoda de validare |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Echipamentul |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Înregistrarea masuratorilor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Luarea probelor |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Mânuirea produselor de test si calibrarea |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Asigurarea calitatii testelor si a rezultatelor de calibrare |
| http://aviconsulting.ro/images/bullet.gif | Raportarea rezultatelor |

Pentru documentarea si implementarea standardului ISO 17025:2005 este necasar sa fie elaborat un Manual al Calităţii.

Acesta răspunde la fiecare capitol din standard.

DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

.1 SR EN ISO/ CEI 17025: 2005 – „Cerinţe generale pentru competenţa laboratoarelor de încercări şi etalonări.”

2 SR EN ISO 9000: 2001 – „Sisteme de management al calităţii.” Principii fundamentale şi vocabular.

3. SR EN 30012–1:1995 – „Condiţii de asigurare a calităţii pentru echipamente de măsurare.” Partea 1: Sisteme de confirmare metrologică a echipamentelor.

4. SR EN ISO 19011: 2003 – Ghid pentru auditarea sistemelor de management al calităţii si /sau de mediu.

5. TERMENI, DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

5.1. Termeni si definiţii

In textul Manualului Calităţii sunt utilizaţi termeni şi definiţii in conformitate cu documentele de referinţă prezentate la subcapitolul 1.4.

5.1.1. Organizaţie

Grup de persoane şi facilităţi cu un ansamblu de responsabilităţi, autorităţi şi relaţii determinate.

[3.3.1 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.2. ProcedurăMod specificat de efectuare a unei activităţi sau a unui proces.[3.4.5 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.3. Calitate Măsura în care un ansamblu de caracteristici intrinseci îndeplineşte cerinţele. [3.1.1 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.4. Cerinţă

Nevoie sau aşteptare care este declarată, în general implicită sau obligatorie.[3.1.2 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.5. Caracteristică Trăsătură distinctivă. [3.5.1 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.6. Politica referitoare la calitate. Intenţii şi orientări generale ale unei organizaţii referitoare la calitate aşa cum sunt exprimate oficial de managementul de la cel mai înalt nivel. [3.2.4 SR EN ISO 9000]

5.1.7. Managementul calităţii. Activităţi coordonate pentru a se orienta şi a controla o organizaţie în ceea ce priveşte calitatea. [3.2.8 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.8. Sistem de management al calităţii. Sistem de management prin care se orientează şi se controlează o organizaţie în ceea ce priveşte calitatea. [3.2.3 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.9. Controlul calităţii. Parte a managementului calităţii concentrată pe îndeplinirea cerinţelor referitoare la calitate.[3.2.10 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.10 Asigurarea calităţii.Parte a managementului calităţii, concentrată pe furnizarea încrederii că cerinţele referitoare la calitate vor fi îndeplinite. [3.2.11 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.11. Planul calităţii .Document care specifică ce proceduri şi resurse asociate trebuie aplicate, de cine şi când pentru un anumit proiect, produs, proces sau contract. [3.7.5 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.12. Acţiune preventivă .Acţiune de eliminare a cauzei unei neconformităţi potenţiale sau a altei posibile situaţii nedorite. [3.6.4 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.13 Acţiune corectivă. Acţiune de eliminare a cauzei unei neconformităţi detectate sau a altei situaţii nedorite. [3.6.5 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.14. Înregistrarea.Document prin care se declară rezultatele obţinute sau furnizează dovezi ale activităţilor. [3.7.6 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.15 Conformitatea .Îndeplinirea unei cerinţe. [3.6.1 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.16 Neconformitate. Neîndeplinirea unei cerinţe. [3.6.2 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.17 Defect. Neîndeplinirea unei cerinţe referitoare la o utilizare intenţionată sau specifică. [3.6.3 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.18 Audit. Proces sistematic, independent şi documentat în scopul obţinerii de dovezi de audit şi evaluarea lor cu obiectivitate pentru a determina măsura în care sunt îndeplinite criteriile de audit. [3.9.1.SR EN ISO 9000:2001]

5.1.19 Mediu de lucru. Ansamblu de condiţii în care se desfăşoară activitatea. [3.3.4 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.20 Trasabilitatea.Abilitatea de a reconstitui istoricul, aplicarea sau localizarea a ceea ce este luat în considerare. [3.5.4 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.21 Încercare.Determinare a uneia sau mai multor caracteristici în conformitate cu o procedură.[3.8.3. SR EN ISO 9000:2001]

5.1.22 Verificare.Confirmare, prin furnizare de dovezi obiective, că au fost îndeplinite cerinţele specificate.[3.8.4 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.23 Validare.Confirmare, prin furnizare de dovezi obiective, că au fost îndeplinite cerinţele pentru o anumită utilizare sau o aplicare intenţionată.[3.8.5 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.24 Manualul Calităţii.Document care descrie sistemul de management al calităţii al unei organizaţii. [3.7.4 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.25 Revizia. Introducerea tuturor modificărilor considerate necesare în conţinutul lor şi în prezentarea unui document normativ.

Notă: revizia conduce la publicarea unei noi ediţii a documentului normativ.

5.1.26 Ediţie nouă. Retipărirea unui document normativ în care sunt încorporate modificările aduse ediţiei precedente.

5.1.27 Echipament de măsurare.Mijloc de măsurare, software, etalon, material de referinţă sau aparatură auxiliară sau combinaţii ale acestora necesare pentru a realiza un proces de măsurare. [3.10.4 SR EN ISO 9000:2001]

5.1.28 Etalonare.Ansamblu de operaţii care stabilesc în condiţii specificate, relaţia dintre valorile indicate de un mijloc de măsurare sau un sistem de măsurare şi valorile reprezentate de o măsura materializată sau de un material de referinţă şi valorile corespunzătoare ale unei mărimi, stabilite cu un etalon de referinţă. [3.2.3 SR EN 30012-1: 1995]

5.1.29 Etalon.O măsura materializată, un aparat de măsurare, un material de referinţă sau un sistem destinat pentru definirea, realizarea, conservarea sau reproducerea unei unităţi sau a uneia sau mai multor valori ale unei mărimi în scopul de a transmite (prin comparare) altor mijloace de măsurare.[3.1.8 SR EN 30012-1: 1995]

5.1.30 Material de referinţă.Un material sau o substanţă având (unul sau mai multe) proprietăţi suficient de bine definite pentru a fi utilizate la etalonarea unui aparat, la evaluarea unei metode de măsurare sau la atribuirea de valori materialelor. [3.1.9 SR EN 30012-1:1995]

5.2. Abrevieri

 MQ - Manualul Calităţii

 H.G. - Hotărâre de Guvern

 MRC - Responsabil cu asigurarea calităţii

 BRML - Biroul român de metrologie legală

 PG - Procedură generală

 PSL - Procedură specifică de lucru

 ISL - Instrucţiune specifică de lucru

 IPM - Instrucţiuni de protecţia muncii

 Rap - Raport de încercare

 PSI - Paza şi Stingerea Incendiilor

 SL - Şef laborator

 F - Formular

 R - Registru

 PL - Plan

* BTC Banca celule si tesuturi

**Analiza riscului**

Analiza riscului este un proces care încorporează trei componente:

Evaluare a riscurilor

Managementul riscurilor

Comunicarea riscurilor

Persoana responsabila de banca de celule si tesuturi reproductive are printre alte responsabilitati si cea legata de implementarea unei politici de management și prevenire a riscurilor.

Conform directivelor și recomandărilor europene (Comisia Europeană, 2006a, c, 2012; Consiliul Europei, 2013), lucrul în conformitate cu un sistem de management al calitatii (SMC) este obligatoriu. Cerințele acoperă organizarea, managementul, personalul, echipamentele și materialele, instalațiile/localurile, documentația, înregistrările și evaluarea calității. Acesta include, fara a se limita la:

* furnizarea de analize de evaluare a riscurilor pentru toate activitățile din banca.
* evaluări proactive de risc și trebuie luate măsuri preventive pentru a minimiza neconformitățile.
* Organizarea spatiului de lucru cu atentie pe confortul operatorului pentru a oferi un mediu de lucru sigur, care să minimizeze riscul de distragere a atenției, oboseală și, prin urmare, de aparitie a unei erori.
* Informarea personalului referitor la pacienti viral pozitivi ce urmează a fi tratati și conștientizarea riscurilor manipulării materialului biologic infectat.
* Asigurarea unei usoare identificari a tuturor PTA-urilor( produselor terapeutice anexe) pentru evitarea utilizarii eronate- analiza de risc
* minimizarea oricui risc de transmitere a unei posibile contaminari prin LN2:

Evaluarea riscurilor se utilizeaza pentru a descrie procesul sau metoda generală în care: se identifica pericolele și factorii de risc care au potențialul de a provoca vătămări (identificarea pericolelor) precum si analiza și evaluarea riscul asociat cu acel pericol (analiza riscului și evaluarea riscului).

Un pericol este orice lucru care poate provoca vătămări; acestea pot fi pericole pentru sănătatea fizică, cum ar fi substanțele chimice, electricitatea, lucrul pe scări, un sertar deschis sau pentru sănătatea mintală

Riscul este șansa, mare sau scăzută, ca cineva să fie rănit de acesteacestea sau alte pericole, împreună cu o indicație a cât de grav ar putea fi prejudiciul.

Exista cinci etape in evaluarea riscului:

1. identificarea pericolului
2. identificarea receptorului posibilei vatamari (ex: personal, pacient, embrioni, echipamente vizitatori, apartinatori, etc)
3. evaluarea riscului ( care este probabilitatea ca fiecare pericol identificat să provoace prejudicii. Deasemenea determinare necesitatii de reducere sau nu a nivelul de risc. Chiar și după ce au fost luate toate măsurile de precauție, un anumit risc rămâne de obicei. Trebuie evaluat pentru fiecare pericol rămas dacă riscul rămâne ridicat, mediu sau scăzut
4. inregistrarea tuturor pasilor efectuati
5. reevaluarea regulata a tuturor pericolelor/riscurilor si/sau a unor posibile noi pericole/riscuri

Pentru usurinta in utilizare pentru materialul biologic reproductiv a fost creat Ghidul Euro-GTP II ce oferă îndrumări structurate cu privire la modul de utilizare a instrumentelor și metodologiilor dezvoltate de proiectul EuroGTP II, și anume utilizarea unui mecanism sistematic, bazat pe analiza riscului din punct de vedere al gradului de noutate astfel:

* evaluarea daca un proces, serviciu sau produs nou sau modificat are un grad noutate semnificativ
* Determinarea riscul general care decurge din noutate
* Determinarea unui nivel adecvat de evaluări preclinice și clinice pentru a aborda și evalua riscul
* Implementarea rezultatul evaluării riscurilor în practica de rutină și urmărirea rezultatelor

Procesul general necesită :

* Identificarea riscurilor specifice legate de potențialii factori de risc și consecințele riscurilor. Fiecare dintre acestea trebuie evaluate individual pentru a determina riscul rezidual al implementării schimbării.Evaluarea luând în considerare:

i) Probabilitatea apariţiei riscului.

ii) Severitatea consecințelor în cazul în care riscul apare.

iii) Probabilitatea ca sursa pericolului pentru consecințele riscului să fie detectată înainte de utilizarea produsului/prestarea serviciului.

Instrumentul nu se referă la detectarea consecințelor riscului după implantarea embrionara.

iv) Orice dovezi existente care pot fi utilizate pentru a atenua riscul.

Instrumentul ia în considerare numărul de riscuri individuale evaluate pentru calcularea procentuala avalorii riscului general

Rezultatul acestei analize de risc va fi un singur scor global derisc (într-o scară de la 0 la 100) – Scorul de risc final – care poate fi utilizat pentru a defini amploarea si/sau necesitatea evaluării preclinice și clinice, necesare pentru a susține propunerea de schimbare sau introducere a unui nou tip de produs sau serviciu., etc

<https://tool.goodtissuepractices.site/>

Responsabilul pentru managementul calitatii (RMC) in bancile de celule si tesuturi reproductive .

RMC este responsabil cu coordonarea implementării sistemului de management al calității și siguranței pacientului la nivelul bancii și are următoarele atribuții principale:

a) planifică, organizează, coordonează și monitorizează întreaga activitate privind implementarea sistemului de management al calității serviciilor și siguranței pacientului la nivelul unității sanitare acreditate;

b) coordonează și controlează funcționarea structurii de management al calității serviciilor;

c) analizează și avizează procedurile interne ale structurii de management al calității, care se aprobă potrivit reglementărilor legale în vigoare;

d) elaborează și supune aprobării conducătorului unității sanitare planul anual de formare și perfecționare profesională a personalului din subordine;

e) coordonează și monitorizează elaborarea documentelor calității la nivelul bancii;

f) coordonează elaborarea și avizează planul de management al calității;

g) coordonează și monitorizează activitățile legate de asigurarea și îmbunătățirea calității serviciilor ,desfășurate de către responsabilii desemnați la nivelul fiecăreia dintre structurile unității sanitare acreditate;

h) monitorizează activitățile legate de asigurarea și îmbunătățirea calității serviciilor desfășurate de către comisiile, consiliile și comitetele constituite la nivelul unității sanitare, în colaborare cu coordonatorii acestora;

i) elaborează și înaintează spre aprobare conducătorului unității sanitare rapoarte periodice privind activitatea structurii de management al calității;

j) coordonează și monitorizează activitățile privind raportarea și monitorizarea evenimentelor adverse asociate activitatii specifice;

k) colaborează cu șefii celorlalte structuri din cadrul unității sanitare în vederea implementării sistemului de management al calității serviciilor și siguranței pacientului;

l) asigură comunicarea permanentă cu persoana responsabila a bancii.

**CAPITOLUL 3.** **SECURITATEA BANCII DE CELULE REPRODUCTIVE (embriologie, andrologie)**

 **3.1 Designul spatiului in conformitate cu ordinul 273/2020**

 3.1.1 Schita spatiului depinde in mare masura de spatiul alocat special pentru acest aspect,si este necesar a fi proiectat luand in considerare fluxul de lucru in spatiul de lucru, orientat dupa conceptul clasic triangular de design, cu distanta minima intre cele 3 componente principale ale spatiului, microscopul inversat, hota(hotele), incubatorul(incubatoarele), unde se desfasoara fazele de lucru.

 3.1.2 Dimensiunea spatiului - se anticipeaza in functie de numarul estimat de pacienti, si se considera o zona curata, situata intr-o arie securizata a cladirii, cu trafic redus, situat in proximitatea salii de proceduri.

a. cameră pentru recoltarea spermei, prevăzută cu chiuvetă;

b. cameră pentru crioconservare și/sau stocare de celule/țesuturi reproductive, prin păstrarea în azot lichid la o temperatură de –196˚C;

c. spațiu pentru testarea și prelucrarea celulelor/țesuturilor reproductive masculine (andrologie), cu suprafața de minimum 9 mp;

d. spatiu pentru testarea și prelucrarea celulelor/țesuturilor reproductive feminine (embriologie - FIV), cu suprafața de minimum 15 mp;

3.13. Materialele folosite la constructie,si amenajare, sa corespunda standardului de camera curata, cu eliminare minima de VOC (styrene, formaldehida,glutaraldehida,toluene,etc), si alte substante chimice din aer, cu specificatii embriotoxice.

3.1.4. Este necesar un circuit de acces in spatiul de testare si prelucrare celule, a materialelor curate, sterile si a personalului.

 3.1.5. Spatiul de testare si prelucrare celule este un spatiu non-public, cu acces interzis pentru pacienti.

3.1.6. Accesul este restrictionat, si este permis doar personalului autorizat.

3.1.7. Necesitatea unei camere separata de spatiul de testare si prelucrare - model filtru pentru schimbarea hainelor,

3.1.8 Lavoar pentru spalat mainile situat in afara spatiului de prelucrare celule.

3.1.8 Spatiul necesar pentru munca de birou, amenajat in afara spatiului de prelucrare celule.

3.1.9. Un laborator diagnostic, unde se folosesc fixative si reactivi, coloratii speciale, in alta zona a cladirii.

3.1. 10 Camera de sterilizare materiale, instrumente in alta zona a cladirii.

 **3.2 Calitatea aerului in spatiul de testare si prelucrare celule**

 3.2.1. Pentru a mentine o contaminare minima a aerului in spatiul de testare si prelucrare celule, este vital mentinerea unui flux de aer cu presiune pozitiva, presiunea din interior fiind mai mare decat cea din exteriorul spatiului de prelucrare celule. presiune pozitivă 5-20 Pa (recomandat 15 Pa), în spatiul de prelucrare și sala de mici intervenții, puncții și/sau embriotransfer;

 3.2.2 Fluxul de aer controlat (condițiile de aerare: reînnoirea întregului volum de 6-20 ori/oră, fie integral cu aport exterior, fie mixt cu aport exterior și recircularea aerului interior, în proporție de 30%-70%; filtrare prin filtre HEPA (H13); flux de aer unidirecțional de sus în jos; velocitatea aerului 0,36-0,54 m/s; filtre de cărbune activ și/sau permanganat de potasiu pentru eliminarea compușilor organici volatili;

3.2.3. Schimburile de aer. Cincisprezece schimburi totale de aer pe oră, inclusiv trei schimburi cu aer proaspat, Schimburile de aer pe oră, adică 20% aer exterior.

Tipul filtrării VOC –se respecta instrucțiunile producătorului filtrelor referitoare la ACH ar trebui luate în considerare și la stabilirea raportului de aer proaspăt la cel recirculat.

3.2.4 Control aeromicroflora. (Microorganisme. Mai puțin de 10 ufc / m cub și mai puțin de doi spori /M cub ‘în repaus’. Controlul periodic pentru aeromicroflora se realizeaza intern sau externalizat.

**3.2.5** temperatura aerului 20-24˚C (recomandat 22˚C); în zona de crioconservare și/sau stocare celule/țesuturi reproductive (14-20˚C - recomandat 18˚C)

**3.2.6.** umiditatea aerului 45% ± 15%;

**3.2.7.** sistem de avertizare sonoră și luminoasă în ceea ce privește cantitatea de oxigen din aer și cu sistem de suport al vieții (butelii de oxigen pentru personalul care are acces) prevăzute în zona de crioprezervare celule/țesuturi reproductive, care trebuie ventilate, cu posibilitatea de ventilare directă către afară;

**3.2.8.** sistem automat de rezervă pentru alimentarea cu energie electrică, precum și sursă neîntreruptibilă pentru echipamentul critic HVAC;

3.2.9 Monitorizarea zilnica a temperaturii si umiditatii in spatiul de testare celule reproductive,si spatiul de crioprezervare.

3.2.10 Evitarea luminii puternice in spatiul de testare si prelucrare celule reproductive.

 **3.3 Echipamente minime obligatorii in conformitate cu ordinul 273/2020 (incubatoare, hote, microscoape,centrifuga )**

Dotări minim necesare:

**a)** frigidere, incubatoare cu sisteme de monitorizare zilnică a temperaturii;

**b)** în cazul testării și prelucrării de celule reproductive feminine - FIV: hotă cu flux laminar minim clasa I cu recomandare clasa II, stereomicroscop, incubatoare cu CO\_2 sau trigaz, centrifugă, microscop inversat cu micromanipulator ;

**c)** dacă se oferă servicii de diagnostic genetic: laser, frigider care să asigure temperatura de –20 grade Celsius;

**d)** în cazul în care se oferă servicii de crioprezervare: sistem de vitrificare sau slow freezing;

**e)** alte echipamente și consumabile (după caz);

f) în cazul prelucrării și testării de celule reproductive masculine în laboratorul de andrologie: hotă (cel puțin un cabinet steril), microscop, centrifugă, cameră de numărare celule, alte echipamente și consumabile (după caz).

3.3.1 Echipamentele necesare sa fie in numar adecvat, speciale pentru compartimentul prelucrare celule reproducatoare, usor de folosit, de curatat, si sa evite contaminarea. Toate echipamentele, validate si functionale pentru scopul lor, performanta verificata prin calibrare. Preferabil sa fie marcate CE.

3.3.2 Sunt necesare - existenta inregistrarilor pentru mentenanta, validarea, instalarea, calibrarea echipamentelor.

3.3.3. Intervalele de referinta pentru parametrii de functionare , bine determinate de furnizor, producator si existenta inregistrarilor. Daca masuratorile pe diferiti parametri sunt in afara intervalelor de referinta , aplicarea masurilor corective, procedura care trebuie inregistrata.

3.3.4. Echipamentele critice-incubatoare, tancurile pentru crioprezervare , frigidere, micromanipulatorul, echipate cu sisteme de alarma, si monitorizate continuu.

3.3.5 Existenta unui sistem energetic de urgenta, neintreruptibila, de back-up.

Echipamente critice continue conecate la o sursa- ups, plus generator-incubatoarele,tancurile de crioprezervare Echipamente critice necontinue –cu furnizarea energiei electrice pana la terminarea procedurii in curs-micromanipulatorul cu microscop, calculatoarele, centrifuga.

3.3.6. Incubatoare,

 Numarul incubatoarelor raportat la numarul de cicluri si durata culturilor de embrioni. Dispozitia embrionilor in interiorul incubatorului , astfel realizata incat sa permita deschiderea usilor incubatorului in conditii minime de siguranta a temperaturii.

Incubatoarele tip big box, de capacitate mare, prezinta dezavantajul consumului mare de gaze, recuperare inceata de temperatura si CO2, dupa deschiderea usilor, si variatii mari de temperatura de la raft la raft.

Incubatoarele benchtop, au avantajul ca ocupa spatiu putin, distributia temperaturii direct pe suprafata de depozitare a vaselor de cultura cu mediu, realizand un contact cu temperatura si in partea superioara si pe partea inferioara a vasului de cultura. (A se vedea capitolul 11-cultura embrionara)

3.3.7 Hota in flux laminar- asigurare monitorizare pentru temperatura suprafata calda de lucru, temperatura incubator hota, schimbarea filtrului conform numarului de ore de functionare, stereomicroscop. Distanta scurta intre hota si incubator pentru un workflow correct.

3.3.8 Microscoape, - pentru microscopul inversat- recomandat sa se asigurare monitorizare suprafata calda pentru temperatura , revizia sistemului de micromanipulare, mentenanta microscopului ; microscopul binocular- revizia microscopului si mentenanta.

Pentru a proteja gametii si embrionii de efectele razelor de lumina ultraviolet, se utilizeaza filtre pentru blocarea ultraviolet. Ovocitele sunt mai sensibile decat embrionii, la luminozitate, se recomanda manipularea lor la intensitate luminoasa mica.

 **3.4 Facilitati crioprezervare**

3.4.1 Compartimentul crioprezervare –este situat in afara laboratorului, dar in apropierea acestuia, cu necesitatea monitorizarii in interior cu camera video.

3.4.2 Dotare- ventilatie adecvata, echipament cu sensor de oxigen, alarma exterioara luminoasa si Sonora la scaderea nivelului de oxigen.

3.4.3. Tancurile cu azot echipate cu sistem de monitorizare a temperaturii azotului din tancuri, si a nivelului de azot lichid.

3.4.4. Numarul de tancuri : tanc pentru embrioni si ovocite, tanc pentru celule reproductive masculine,tanc pentru carantina, tanc pentru transport.

3.4.4 Existenta echipamentului de protectie, sort, manusi, ochelari, monitorizare video.

3.4.5. Instructajul personalului cu privire la manipularea azotului lichid, masurile de protective in caz de accident.

**Managementul accidentelor care implică azotul lichid**

Activitatea desfășurată în spațiul de stocare a produsului în azot lichid trebuie monitorizată video permanent (prin vizorul prevăzut prin construcție sau cu ajutorul unei camere de luat vederi) de către o a doua persoană, precum și electronic, cu ajutorul unui monitor de concentrație de oxigen prevăzut cu sistem de alarmare sonoră și optică în caz de pericol.

In cazul accidentelor care implică o creștere periculoasă a concentrației de azot din camera de stocare, datorită unor manevre greșite sau a unor defecțiuni ale echipamentului, se procedează astfel:

* Se dă alarma și se apelează personalul medical de urgență
* Salvatorul își pune masca de oxigen și activează sistemul portabil de alimentare cu oxigen
* Salvatorul intră în zona de stocare, administrează victimei oxigen cu ajutorul sistemului aflat în incintă și o scoate de zona periculoasă
* Salvatorul acționează sistemele de aerisire ale incintei și, dacă este posibil, oprește sursa de vapori de azot
* Personalul tehnic (protejat cu maca de oxigen) intervine, dacă este cazul, pentru remedierea echipamentului

 **3.5 Agenti infectiosi, raportari IAS, RAS**

 **IAS-** incident advers sever - orice eveniment inoportun legat de procurarea, controlul, procesarea, conservarea şi distribuţia de ţesuturi şi celule umane, susceptibil de a transmite o boală contagioasă, de a provoca decesul sau condiţii ameninţătoare pentru viaţă, de a produce o invaliditate sau o incapacitate la primitori ori de a provoca sau a prelungi o spitalizare ori o morbiditate;

 **RAS** -reacţie adversă gravă - reacţia neprevăzută, inclusiv boala contagioasă, ameninţătoare pentru viaţă, la donator sau la primitor, asociată cu procurarea ori cu utilizarea terapeutică umană de ţesuturi sau celule, care este mortală sau pune viaţa în pericol, care determină o invaliditate sau o incapacitate, provoacă ori prelungeşte spitalizarea sau morbiditatea;

 Toate procedurile si tehnicile de reproducere asistata implica manipularea materialului biologic cu un potential risc de transmitere infectioasa la personalul medical, sau cross-contaminarea (contaminarea materialului biologic a altor pacienti).

 3.5.1. Proceduri de prevenire a contaminarii personalului, sau crosscontaminarea.

- vaccinarea personalului contra hepatita B, sau alte boli virale pentru care exista vaccinuri disponibile.

- pentru pacienti –screening serologic conform ghidurilor nationale pentru proceduri chirurgicale, soc nat de ob-gyn, transplant ( HIV. hep B, C, sifilis, CMV IgG,IgM)

- Informarea personalului despre pacientii infectati, si constientizarea riscurilor manipularii produselor biologice cu potential infectios,

- instruirea personalului in cazul accidentelor neprevazute, (intepare cu ac folosit la un pacient seropozitiv cu diverse virusuri, stropire cu diferite lichide biologice care apartin pacientilor seropozitivi) ,

**Profilaxia post expunere la virus hepatitic B (VHB)**

Se face în funcţie de statusul vaccinal antihepatită B şi statusul imunitar al persoanei expuse (nevaccinat, vaccinat responder sau vaccinat nonresponder, răspuns necunoscut la vaccin).

1.    Dacă  pacientul sursă este VHB pozitiv :

-       şi **persoana accidentată a fost vaccinată complet**, se recomandă testarea Ac HBs ; dacă titrul Ac HBs este peste 10 mUI/ml, persoana accidentată este protejată şi nu este la risc ;

-       şi **persoana accidentată nu a fost vaccinată sau a fost vaccinată incomplet**sau dacă nu se poate determina rapid titrul Ac HBs, se administrează o doză de vaccin, stabilindu-se ulterior titrul Ac HBs.

a.     Dacă titrul Ac HBs este mai mare de 10 mIU/ml se întrerupe vaccinarea.

b.    Dacă titrul Ac HBs este mai mic de 10 mIU/ml se continuă  vaccinarea cu schema de urgenţă (0,1,2 luni şi rapel la 12 luni).

2.    Dacă  pacientul sursă este VHB negativ :

-       şi **persoana accidentată a fost vaccinată complet**, se recomandă testarea Ac HBs ;

-       şi **persoana accidentată nu a fost vaccinată** se recomandă vaccinarea împotriva hepatitei B după schema obişnuită (0,1,6 luni).

**Consiliere postexpunere VHB**

* Persoana expusă nu va dona sânge, plasmă, organe, ţesuturi sau spermă .

Nu sunt necesare:

* modificarea practicilor sexuale,
* precauţii speciale pentru prevenirea transmiterii secundare,
* modificarea responsabilităţilor de serviciu,
* în caz de infecţie acută se aplică profilaxia secundară.

**Managementul postexpunere la virus hepatitic C (VHC)**

**Atitudinea în cazul expunerii accidentale la produse biologice**constă în stabilirea statusului VHC al pacientului sursă şi a persoanei expuse:

1.    Dacă anticorpii anti-VHC negativi la pacientul sursă, riscul de transmirtere a VHC trebuie considerat nul.

Excepţiile constau în existenţa

 infecţiei în perioadă de incubaţie (1-3 luni) şi în cazul  imunosupresiei întâlnită la dializaţii cronici, precum şi la transplantaţii renali.

În aceste două  situaţii se poate infecţia VHC doar prin  detectarea ARN-ul viral circulant.

2.    Dacă anticorpii anti-VHC sunt pozitivi la pacientul sursă (sau ARN-ul viral este  pozitiv), risc posibil de transmitere a infecţiei este între 1 şi 7%.

Se recomandă testarea periodică şi luarea în evidenţă de serviciul de specialitate.

**Profilaxia postexpunere la VHC**

Nu este recomandată, deoarece imunoglobulinele nu sunt eficiente.

De asemenea, nu există dovezi privind utilitatea antiviralelor (interferon), care pot fi eficiente doar în cazul infecţiei manifeste.

**Monitorizare postexpunere VHC**

Se recomandă testarea ARN-ului viral la 4-6 săptămâni, pentru un diagnostic precoce al infecţiei cu virusul hepatitic C

Testarea anticorpilor anti-VHC  prin ELISA, precum şi ALAT la 4-6 luni după expunere.

Confirmarea reacţiei ELISA pozitive printr-un alt test.

Nu există recomandari pentru terapia infecţiei acute.

**Consiliere postexpunere VHC**

Persoana expusă nu va dona sânge, plasmă, organe, ţesuturi sau spermă

Nu sunt necesare:

* modificarea practicilor sexuale,
* precauţii speciale pentru prevenirea transmiterii secundare,
* modificarea responsabilităţilor de serviciu.

**Managementul postexpunere  la virusul imunodeficienţei umane (HIV)**

Implică:

* evaluarea şi testarea preliminară a persoanei expuse si a sursei,
* consideraţii asupra conduitei terapeutice (când, ce, încărcătura virală,
* monitorizare şi consiliere.

**Profilaxia postexpunere la HIV**

Principii:

* se începe cât mai curând posibil, deoarece expunerea trebuie privită ca şi urgenţă şi trebuie gândită în termen de ore şi nu de zile;
* nu se cunoaşte intervalul de timp după care profilaxia  este ineficientă;
* profilaxia se va reevalua după 72 de ore când se pot  obţine date suplimentare despre sursă. Dacă sursa este HIV negativă, profilaxia se va opri.

**Chimioprofilaxia postexpunere –HIV**

Se aplică în concordanţă

cu evaluarea statusului serologic a pacientului sursă:

* persoana sursă este infectată cu HIV ;
* persoana sursă este HIV necunoscut;
* persoana sursă este HIV negativă.

**A. Dacă persoana sursă este infectată cu HIV decizia de începere a profilaxiei se bazează pe:**

1.      Date clinice : riscul de transmitere a HIV este mult mai ridicat dacă pacientul sursă se găseşte într-un stadiu avansat de boală,  SIDA declarată, (CD4<200mm3),

2.      Natura lichidului biologic incriminat:

contactul cu sângele sau lichide biologice hemoragice defineşte un accident prin expunere la sânge şi implicit riscul expunerii la HIV. Pe de altă parte, HIV a putut fi izolat în alte lichide biologice: spermă, secreţii vaginale, lapte matern, lichid amniotic, pericardic, peritoneal, pleural, sinovial, cefalo-rahidian, dar nici un caz dovedit de transmitere profesională prin aceste lichide nu a fost raportat până acum.

3.      Criteriile de severitate ale rănii

**a. Expunere masivă, cu risc crescut:**

* + înţepăturile profunde , cu dispozitive intravasculare sau ace cu lumen folosite pe cale intravenoasă sau intraarterială şi
	+ toate expunerile la HIV  “concentrat“ .

În acest caz **chimioprofilaxia** este recomandată.

**b. Expunere cu risc intermediar:**

* + tăieturile cu bisturiu prin mănuşi,
	+ înţepăturile superficiale cu ac cu lumen utilizate pe cale intravenoasă sau intraarterială,

**Recomandarea chimioprofilaxiei** depinde de bilanţul persoanei sursă şi anume este  recomandată dacă aceasta are o încărcătură virală crescută sau o patologie oportunistă în curs de evoluţie.

Chimioprofilaxia este discutabilă în cazul în care pacientul sursă este în stadiul asimptomatic sau prezintă o încărcătură virală scăzută sau indetectabilă.

**c. Expunere cu risc scazut**

* + eroziunile simple epidermice superficiale cu un ac plin (ac de sutură) sau cu lumen de mic calibru (intramuscular sau subcutanat),
	+ un contact cutaneo-mucos.

În acest caz **tratamentul trebuie discutat ţinând** cont de natura exactă a expunerii şi de statusul pacientului sursă.

**B. Dacă persoana sursă este HIV necunoscut**:

Se analizează riscul de infecţie HIV în funcţie de statusul clinic, biologic şi epidemiologic:

* dacă expunerea este de mare risc, tratamentul este recomandat,
* în cazul riscului intermediar şi scăzut, tratamentul trebuie discutat.

**C. În cazul în care nu există nici un argument care să sugereze o infecţie** HIV la persoana sursă (sursa negativă), tratamentul nu este recomandat şi se discută numai în caz de expunere la risc crescut.

**Consiliere postexpunere HIV**

Este necesară:

* la apariţia efectelor secundare ale profilaxiei postexpunere,
* la apariţia semnelor şi simptomelor infecţiei acute (febra, rash, infecţii respiratorii),
* pentru prevenirea transmiterii secundare,
* abstinenţa sexuală sau folosirea prezervativelor,
* interzicerea donării de sânge, organe sau ţesuturi.

**Sistemul de supraveghere şi control**

Are drept scop implementarea programului de prevenire a accidentelor prin expunere la sânge, stabilirea  mijloacelor tehnice de punere în aplicare (formare, materiale, proceduri, etc.) şi a criteriilor de evaluare a acţiunilor întreprinse, şi evaluare cauzele accidentului şi a riscului noilor dispozitive introduce.

**Unitatea sanitară** acreditata în care s-a produs accidentul

* asigură prelevarea şi trimiterea eşantioanelor de sânge provenite de la pacientul sursă, pentru testare, la unitatea desemnată sau asigură efectuarea lor în unitate;
* prelevarea şi trimiterea probelor biologice se va face conform legislaţiei (standardelor) în vigoare;
* trimite persoana accidentată către serviciul de supraveghere a infecţiilor nosocomiale;
* asigură trimiterea persoanei accidentate către spitalul de boli infectioase în oricare dintre următoarele situaţii:
	+ sursa HIV pozitiv cunoscută,
	+ sursa HIV cu test rapid pozitiv,
	+ sursa cu status biologic necunoscut şi cu risc epidemiologic crescut,
	+ sursa Ag HBs pozitiv/Ac HBs prezenţi,
	+ sursa Ac HCV pozitiv,
* Asigură trimiterea accidentatului la Autoritatea de Sănătate Publică Judeţeană, în vederea vaccinării antihepatită B, în cazul în care spitalul/secţia de boli infectioase nu a putut asigura vaccinarea

**Persoana accidentată :**

* aplică imediat protocolul din "Ghid practic de management al expunerii accidentale la produse biologice",
* în prima oră de la accident se prezintă la medicul responsabil cu expunerea accidentala la produse biologice,
* în termen de 24 de ore se prezintă la medicul responsabil cu expunerea accidentala la produse biologice.
* anunţă medicul de medicina muncii pentru luarea în evidenţă.

**Medicul responsabil cu expunerea accidental la produse biologice :**

* înregistrează accidentul într-un registru de evidenţă a accidentelor cu expunere la produse biologice;
* raportează accidentul în maxim 24 de ore de la producerea accidentului;
* asigură recoltarea eşantioanelor de sânge de la pacientul sursă, respectând legislaţia privind testarea voluntară cu consiliere;
* asigură transportul eşantioanelor de sânge provenite de la pacientul sursă, la un laborator pentru testare
* asigură recoltarea eşantioanelor de sânge de la personalul accidentat, respectând legislaţia privind testarea voluntară cu consiliere.
* efectuează în toate cazurile testul rapid HIV, dacă acest test este disponibil. Acest test se va efectua pentru pacientul sursă, în termen de 2 ore, cu transmiterea rezultatului medicului căruia i s-a raportat evenimentul.
* primeşte şi trimite eşantioanele de sânge provenite de la pacientul sursa către laboratorul desemnat pentru efectuarea testelor ELISA de identificare a: Ac anti-HIV, Ac anti-VHC, AgHBs şi Ac HBs sau efectuează testele respective, dacă este autorizat.

**Laboratorul desemnat pentru testare**

Efectuează:

* pentru pacientul sursă: Ac HIV (ELISA), AgHBs, Ac VHC;
* pentru personalul accidentat: Ac HIV (ELISA), AgHBs, AcHBs, Ac VHC.

Rezultatele vor fi comunicate solicitantului (unitatea sanitară în care s-a produs accidentul) în maximum o saptămână şi la Autoritatea de Sănătate Publică judeţeană lunar/trimestrial conform normelor legale .

**Serviciul de supraveghere şi control al infectiilor asociate activității medicale din unitatea în care a avut loc accidentul**

* răspunde de aplicarea programului de supraveghere:
	+ epidemiologul va evalua riscul de infectie cu HIV, VHC, VHB;
	+ epidemiologul va asigura consilierea personalului expus şi recoltarea esantioanelor de sânge, cu respectarea legislaţiei privind testarea voluntară, în cazul în care acestea nu au fost efectuate de către medicul şef de secţie sau medicul şef de gardă;
	+ în cazul în care riscul de infectie cu HIV şi/sau VHC este absent, iar riscul de infectie cu VHB este prezent, persoana accidentată va fi indrumata către Autoritatea de Sănătate Publica judeteana, la cabinetele de vaccinare desemnate, pentru vaccinarea anti hepatită B;
	+ în cazul în care riscul de infectie cu HIV şi/sau VHC este prezent, indiferent de riscul VHB, persoana accidentată va fi indrumata către spitalul de boli infectioase ;
	+ persoanele accidentate care sunt deja cunoscute cu infectie cronica cu VHB şi/sau VHC, vor fi indrumate către spitalul de boli infectioase pentru a se stabili o conduita adecvată ;
	+ anunta medicul de medicina muncii despre evenimentul înregistrat;
	+ completează şi trimite lunar, la Autoritatea de Sănătate Publica judeteana, fişele de supraveghere ;
	+ completează şi trimite semestrial la Autoritatea de Sănătate Publica judeteana, fişele unităţii sanitare;
* va face analiza semestriala a cazurilor de expunere accidentală profesională şi de seroconversie înregistrate în unitate ;
* anuntă medicul de medicina muncii al unităţii sanitare în care s-a produs accidentul despre seroconversia pentru HIV şi/sau VHB şi/sau VHC.

Raportatea IAS si RAS se face catre ANT , DSP, care raporteaza mai departe la Inspectoratul de Stat in sanatate, daca exista IAS si RAS pe dispositivele medicale se raporteaza ANMDM.

Obligativitatea pentru unitatile acredite pentru forma de spitalizare de zi, a raportarii RAS si IAS la ANMCSM, cu desemnarea unei personae responsabile pentru problema aparuta.,

 3.5.2. Pentru pacientii infectati, se recomanda alocarea unui timp specific in program, si dupa manipularea produselor lor biologice, dezinfectia spatiului si echipamentelor.

Se recomanda crioprezervarea in tancuri diferite a produselor biologice cu inalt risc infectios.

 3.5.3 Materialul biologic importat de la alta clinica, trebuie sa fie insotit de rezultatele screeningului viral.

 **3.6. Masuri preventive si de protectie a materialului biologic si a personalului**

3.6.1 Toate fluidele biologice obligatoriu trebuie tratate ca potential contaminate.

 3.6.2 Tesuturile, celulele reproducatoare, embrionii, trebuie manipulate in conditii aseptice. Pentru a asigura aceste conditii aseptice, personalul este ogligat sa :

 - sa –si insuseasca regulile de igiena personala si asepsia tehnicilor.

 - sa foloseasca echipamente de laborator, cu eliminare redusa de particule VOC,

 - mastile, capeline, din material non-toxic,

 - folosirea manusilor nepudrate cu talc

 - folosirea hotei in flux laminar in momentul manipularii materialelor biologice

 - folosirea pipetoarelor mecanice,

 - consumabilele de unica utilizare se arunca in cutiile galbene pentru deseuri periculoase biologice, de maniera de a proteja personalul din laborator, si de a proteja restul personalului. Deseurile viral positive, se arunca separat, in cutiile marcate corespunzator.

 - Acele, obiectele de sticla, obiectele ascutite se manevreaza cu grija, si se arunca in cutia galbena pentru taietoare-intepatoare.

 - dezinfectantele folosite, compatibile cu compartimentul FIV

 - mancatul, fumatul, bauturile, strict interzise in laborator.

 - Folosirea cosmeticelor redusa la minim, parfumurile evitate.

 - restul personalului imbracat corespunzator pentru a evita contaminarea.

3.6.3 Managementul riscului pentru materialul biologic, validarea consumabilelor si produselor terapeutice anexe si instruirea personalului.

**Managementul accidentelor care implică produsul biologic**

In cazul în care, pe parcursul ciclului de prelevare-transport-recepție-procesare-stocare-distribuție are loc un accident (datorat unor manevre greșite, unor defecțiuni sau funcționări defectuoase ale echipamentului, sau altor cauze) care poate compromite calitatea produsului, **Persoana Responsabilă** procedează în felul următor:.

* Formulează neconformitatea
* Analizează efectul acestei neconformități asupra calității produsului
* Decide validarea pentru distribuție, plasarea în carantină sau eliminarea acestuia.

**CAPITOLUL 4. IDENTIFICAREA PACIENȚILOR, AMBALAREA, ETICHETAREA ȘI TRASABILITATEA CELULELOR/ȚESUTURILOR REPRODUCTIVE**

Identificarea pacienților și trasabilitatea celulelor/țesuturilor în unitățile sanitare acreditate ca bănci de celule și țesuturi reproductive, au ca scop asigurarea calității și siguranței în manipularea, prelucrarea, procurarea, stocarea, transportul și utilizarea celulelor/țesuturilor reproductive pentru obținerea sarcinii și nașterii unui copil prin proceduri medicale de reproducere asistată. Materialul biologic reproductiv se referă la următoarele celule și țesuturi: ovocite, spermatozoizi, embrioni, țesut ovarian și țesut testicular. Materialul biologic reproductiv donat în scopul reproducerii poate fi proaspăt colectate sau crioprezervat, poate proveni de la donarea între partenerii unui cuplu sau de la donatori terță.

Procedurile de identificare a pacienților și trasabilitatea celulelor/țesuturilor în unitățile sanitare acreditate ca bănci de celule și țesuturi reproductive sunt reglementate de directive europene, transpuse în legislația românească prin Ordin de Ministru al Sănătății (1-9).

* 1. **Identificarea pacienților**

4.1.1 Identificarea pacienților/donatorilor de celule/țesuturi reproductive se va face după obținerea unui consimțământ informat individual sau de cuplu (după caz), semnat de ambii parteneri și reprezentanții unității medicale acreditate/băncii de celule și țesuturi reproductive.

4.1.2. Pacientului/Cuplului/donatorului i se va atribui un cod de identificare, precum şi ţesuturilor şi celulelor donate de acesta, pentru a asigura identificării corecte a pacientului/cuplului şi trasabilitatea ţesuturilor şi celulelor acestora. Codul de identificare se va regăsi în toate documentele medicale elaborate, registrele unității medicale acreditate, bazele de date electronice ale unității medicale, precum și în Registrul Național al donatorilor. Datele codificate vor fi introduse într-un registru cu regim special, cu asigurarea securizării datelor cu caracter personal, care vor include:

a) numele, prenumele, data naşterii şi codul numeric personal;

b) vârsta, sexul, antecedentele medicale relevante pentru funcția de reproducere;

c) rezultatele analizelor de laborator relevante pentru siguranța pacienturlui și al personalului medical;

d) formularul de consimţământ/autorizare;

e) numerele de identificare ale loturilor de reactivi şi soluţii utilizate la prelevarea probelor

f) data şi ora prelevării

Toate înregistrările trebuie să fie clare şi lizibile, protejate de modificări neautorizate şi păstrate pentru o perioadă de cel puţin 30 de ani după utilizarea clinică, într-o arhivă aprobată de către Agenţia Naţională de Transplant

4.1.3. Fiecare procedură de prelevare a ovocitelor/spermei/țesut reproductiv va fi precedată de verificarea datelor personale ale pacientului și confruntarea acestora cu codul de identificare și de procedură atribuit.

4.1.4 Codul de identificare pacient/procedură trebuie să asigure urmărirea localizării celulelor reproductive în timpul fiecărei etape procedurale, caracteristicilor pacienților (sau donatorilor) și datele relevante privind produsele și materialele care au intrat în contact cu acestea.

4.1.5. Este obligatorie o pregătire și instruire adecvată privind procedurile de identifcare și trasabilitate, a întregului personal al unității sanitare acreditate ca bancă de celule și țesuturi reproductive

**4.2. Identificarea celulelor reproductive distribuite în Uniunea Europeană prin Codul unic european (SEC, *Single European Code*))**

Un cod unic de identificare este repartizat donatorului, precum şi ţesuturilor şi celulelor donate de acesta, în timpul recoltării sau la banca de ţesuturi/celule, pentru a asigura identificarea corectă a donatorului şi trasabilitatea ţesuturilor şi celulelor donate de acesta. Informațiile codificate vor fi introduse într-un registru cu regim special, cu asigurarea securizării datelor cu caracter personal. Cod european unic, SEC, este alcătuit din secventa de identificare a donării, alături de secvența de identificare a produsului.

1. **Secvența de identificare a donării** este formată din:
	1. ***codul țării***, în cazul României, Codul țării este ***RO*** (2 caractere)
	2. ***codul centrului****,* care este alocat de catre Compendiul European, este eliberat la cererea unității sanitare acreditate de către Agentia Nationala de Transplant și este alcătuit din 6 caractere.
	3. ***numarul unic al donarii***, numărul unic atribuit unei donări specifice de țesuturi și de celule (13 caractere)
2. **Secventa de identificare a produsului** este formată din 19 caractere și conține:
	1. codul produsului, care identifică tipul specific de țesut/celulă (țesut ovarian, ovocite, embrioni, spermă, etc.) si este alcătuit dintr-o literă identificatoare (***E*** în sistemul EUTC; ***A*** în sistemul ISBT128 sau ***B*,**  EuroCode) și 7 cifre (total 8 caractere)
	2. numărul sublotului (3 caractere)
	3. data expirării materialului biologic (8 caractere). Țesuturile și celulele pentru care nu este definită data de expirare, aceasta va fi notată cu 00000000

In cazul in care spațiul de etichetare nu permite etichetarea conform cerintelor SEC, secvența de identificare a donării trebuie se apara obligatoriu în documentele însoțitoare.



4.2.1. Identificarea donării de către banca de cellule/țesuturi va conţine cel puţin următoarele informaţii:

a. identificarea instituţiei de prelevare şi a băncii de ţesuturi sau celule;

b. numărul (unic) de identificare al donării;

c. data prelevării;

d. locul prelevării;

e. tipul donării (multiţesut/uniţesut; autolog/alogenic; viu/decedat).

4.2.2. Identificarea produsului terapeutic va conţine cel puţin următoarele informaţii:

a. identificarea băncii de ţesuturi sau celule;

b. tipul de ţesut/celule;

c. numărul de identificare a regrupării de ţesuturi sau celule (dacă este cazul);

d. numărul de identificare a unui segment din acelaşi ţesut sau lot celular (dacă este cazul);

e. data de expirare a validităţii terapeutice;

f. statusul ţesutului/celulelor (în carantină/apt pentru utilizarea terapeutică)

g. descrierea şi originea produselor terapeutice, etapele de procesare parcurse, materialele şi produsele terapeutice aditive care au intrat în contact cu ţesuturile şi celulele şi care au efect asupra calităţii şi/sau securităţii acestora;

h. identificarea instituţiei care a emis eticheta finală

4.2.3. Identificarea utilizării umane va conţine cel puţin următoarele informaţii:

a. data distribuirii sau, respectiv, data distrugerii în caz de neutilizare;

b. identificarea medicului utilizator şi a instituţiei utilizatoare finale.

4.2.4 Instituţia sanitară utilizatoare de ţesuturi şi celule umane în scop therapeutic va realiza:

a. Identificarea băncii de ţesuturi sau celule furnizoare

b. Identificarea instituţiei utilizatoare acreditate şi a medicului responsabil de procedură

c. Tipul de ţesuturi şi celule

d. Identificarea produsului terapeutic

e. Identificarea primitorului/primitorilor

f. Data utilizării terapeutice umane

4.2.5. Sunt exceptate de la atribuirea codului SEC următoarele categorii:

a. celulele reproducătoare provenite din donări între parteneri;

b. țesuturile și celulele distribuite direct pentru transplantare imediată la primitor;

c. țesuturile și celulele importate în Uniunea Europeană în caz de urgență, autorizate direct de către Agenţia Naţională de Transplant.

**4.3 Ambalarea celulelor/țesuturilor reproductive/embrioni**

4.3.1. După prelevare, celulele și ţesuturile trebuie manipulate astfel încât să se minimalizeze riscul contaminării și deteriorării. Se vor utiliza recipiente de prelucrare/ambalare de unică folosință, sterile și noncitotoxice, recomandat marcate CE. Ambalarea trebuie să prevină, de asemenea, contaminarea persoanelor responsabile cu ambalarea şi transportul celulelor și ţesuturilor, acestea fiind manevrate în condții de siguranță biologică (hotă microbiologice clasa II, cu flux de aer steril);

4.3.2. Celulele/țesutul destinate stocării/distribuirii trebuie să fie ambalate în recipiente adaptate fiecărui tip de produs (paiete pentru ovocite/embrioni, paiete pentru spermă, criotuburi pentru țesut testicular etc., de preferat în sistem închis), și păstrate la o temperatură care să asigure caracteristicile şi funcţia biologică.

4.3.3. Celulele/ţesuturile ambalate trebuie depozitate într-un container potrivit pentru transportul materialelor biologice şi care păstrează securitatea şi calitatea ţesuturilor sau celulelor pe care le conţine.

**4.4. Etichetarea celulelor/țesuturilor reproductive/embrioni**

Recipientele care conțin materialul biologic în toate etapele de prelucrare, ambalare și transport trebuie etichetate corect, pentru a se asigura identificarea cu pacientul/donatorul

4.4.1. Etichetarea recipientelor de prelevare care conţine celule sau ţesut.

Dacă mărimea recipientului ce conţine ţesuturi şi/sau celule umane permite, pe eticheta acestuia, se vor preciza următoarele informaţii:

a. tipul ţesuturilor/celulelor, numărul unic de identificare, codul ţesutului/celulelor, precum şi numărul lotului/procedurii, dacă este cazul;

b. identitatea băncii de ţesuturi/celule;

c. data prelevării (şi ora dacă este posibil);

d. precauţii;

e. natura tuturor aditivilor/mediilor de păstrare (dacă este cazul);

f. în cazul donărilor directe/în cuplu, eticheta trebuie să specifice primitorul;

g. atunci când anumite ţesuturi şi celule sunt identificate ca fiind pozitive pentru un marker relevant de boală infecţioasă, acesta trebuie marcate corespunzător și păstrate în compartimente destinate celulelor/țesuturilor, identificate cu sintagma: "RISC BIOLOGIC".

Dacă mărimea recipiențului nu permite înregistrarea tuturor informațiilo, acestea vor fi notate pe o fișă adițională

4.4.2. Etichetarea documentaţiei însoţitoare a recipientelor ce conțin celule/țesuturi trebuie să conţină următoarele informaţii:

a. tipul de ţesut şi/sau celule şi, dacă este cazul, mărimea acestuia (număr de ovocite/embrioni/volum spermă/număr fragmente țesut testicular/mărime);

b. morfologia şi caracteristicile funcţionale (calitate ovocite, calitate/vârstă embrioni, calitate produs testicular, mobilitate spermatozoizi etc.);

c. data distribuirii ţesutului/celulelor;

d. testele biologice efectuate la donator şi rezultatele acestora;

e. recomandări de stocare;

f. instrucţiuni pentru deschiderea containerului, a pachetului, precum şi pentru manipularea sau reconstituirea necesară;

g. date de expirare/ data limită de deschidere/manipulare;

4.4.3. Etichetarea containerului de transport

Atunci când ţesuturile/celulele sunt transportate de către un intermediar, orice container de transport trebuie etichetat cel puţin cu:

a. mențiunea "ŢESUTURI ŞI CELULE UMANE" şi "MANEVRAŢI CU GRIJĂ";

b. identificarea băncii de ţesuturi/celule de provenienţă, inclusiv adresă şi număr de telefon, precum şi o persoană de contact;

c. identificarea băncii de ţesuturi/celule de destinaţie, inclusiv adresă şi număr de telefon, precum şi o persoană de contact care să preia containerul;

d. data şi ora începutului transportului; menţiuni privitoare la condiţiile de transport relevante pentru calitatea şi securitatea ţesuturilor şi celulelor;

e. condiţii recomandate de transport (a se păstra la rece containerul în poziţie verticală etc.);

f. instrucţiuni de securitate şi metode de răcire (dacă este cazul);

g. în cazul tuturor produselor celulare, trebuie făcută următoarea menţiune: "NU IRADIAŢI";

h. atunci când un produs este cunoscut ca fiind pozitiv pentru markerul unei boli infecţioase, trebuie făcută următoarea menţiune: "RISC BIOLOGIC";

i. în cazul donatorilor autologi, trebuie făcută următoarea menţiune: "NUMAI PENTRU UTILIZARE AUTOLOGĂ";

j. menţiuni privitoare la condiţiile de stocare (cum ar fi "NU CONGELAŢI").

k. containerul intern este securizat prin introducerea acestuia într-un container extern sigilat

4.4.4 Unitățile sanitare sunt responsabile cu asigurarea unei etichete securizate, care să conțină toate datele de identificare a conținutului specific;

4.4.5. documentația care însoțește probele biologice transportate se plasează fie într-o locație destinată în mod special documentației, fie între containerele extern și intern;

4.4.6. documentația care însoțește probele biologice include: sursă de celule, rezultatele testărilor pentru boli infecțioase, fișa de stocare, metodele folosite pentru prelucrarea materialului biologic, precum și informații privitoare la calitatea probelor biologice, conform reglementărilor în vigoare;

4.4.7. procedură scrisă pentru verificarea etichetării și a documentației care însoțește probele biologice, elaborată, implementată de către structura care trimite materialele biologice, celulele/țesuturile reproductive și aplicată de către o persoană, alta decât persoana care îndeplinește cerințele cu privire la etichetare și documentație; structura în care se desfășoară una sau mai multe activități de transplant de celule și/sau țesuturi reproductive păstrează documentația privind efectuarea verificărilor în format electronic și/sau în format hârtie) pentru o perioadă de 30 de ani și pune la dispoziție documentația în vederea verificării;

4.4.8. procedură scrisă pentru verificarea informațiilor cu privire la primirea materialelor biologice, celulelor/țesuturilor reproductive; structura în care se desfășoară una sau mai multe activități de transplant de celule și/sau țesuturi reproductive păstrează documentația privind efectuarea verificărilor în format electronic și/sau în format hârtie, pentru o perioadă de 30 de ani și pune la dispoziție documentația în vederea verificării;

4.4.9. Se aplică codificarea europeană pentru gameții și embrionii din donare non-parteneră, în conformitate cu Directivele Comisiei Europene 2006c și 2016 (cod SEC, cap.4.2). Transportul celulelor și țesuturilor reproductive necesită identificarea instituțiilor importatoare și exportatoare, precum și identificarea materialului biologic și a conformității acestuia pentru uz clinic. La ambele instituții, documentația însoțitoare și identificarea eșantionului de pe dispozitivul de stocare trebuie verificate pentru a corespunde cu fișa pacientului.

**4.5 Trasabilitatea**

Trasabilitatea, ansamblul informaţiilor şi al măsurilor, documentate şi înregistrate, care permit: 1) stabilirea legăturilor dintre donator şi banca furnizoare de ţesuturi şi celule procesate, pe de o parte, şi primitor şi unitatea sanitară acreditată care utilizează ţesuturile sau celulele, pe de altă parte; 2) urmărirea şi identificarea ţesuturilor sau celulelor pe parcursul fiecărei etape, de la procurare, procesare, control şi conservare până la distribuţia la primitor sau până la distrugerea lor; 3) identificarea tuturor datelor relevante legate de produsele terapeutice anexe şi materialele care vin în contact, în timpul procesării, cu ţesuturile şi celulele umane, în scopul asigurării unui nivel înalt al calității și securității actului medical. Un sistem documentat de trasabilitate va permite:

a) trasabilitate descendentă, de la donator la primitor/primitori;

b) trasabilitate ascendentă, de la primitor/primitori la donator/donatori.

Trasabilitatea celulelor/țesuturilor/embrionilor în bancile de celule și țesuturi reproductive este asigurată prin implementarea unor proceduri standardizate pentru prelevarea și prelucrarea probelor biologice, care să cuprindă:

4.5.1. folosirea echipamentelor de etichetare codificată, care să permită stabilirea unei legături între proba primită, procesare, stocare și rezultatele eliberate;

4.5.2. înregistrarea pe hârtie, într-o formă lizibilă, care să cuprindă localizarea și identificarea informațiilor fără caracter personal relevante, privind procedurile de prelucrare, produsele și materialele care intră în contact cu probele prelucrate (date referitoare la număr de ovocite prelevate, gradul de maturitate a ovocitelor, rezultatul evaluării spermei/materialului testicular prelevat, procedura de prelucrare/inseminare a ovocitelor, eficiența de fertilizare, numărul de zigoți obținuți, durata culturii de embrioni, evaluările periodice ale calității embrionilor, metode de evaluare, embrioni transferati intrauterin, embrioni crioprezervati, localizarea foarte precisă a coordonatelor și condițiilor de stocare, reactivii și tehnicile utilizate, testele realizate, data testărilor, persoanele implicate în prelucrarea, testarea și evaluarea materialului biologic);

4.5.3. Stocarea înregistrărilor și evidența activității în baze de date electronice pentru cel puțin 30 de ani.

**CAPITOLUL 5. CONSUMANILE/PRODUSE TERAPEUTICE ANEXE**

*Acest capitol este destinat să servească drept ghid în selectarea produselor terapeutice anexe(PTA) de unică folosință necesare spatiului de prelucrare a celulelor reproductive si cultura embrionară.* Consumabilele de unică folosință (produse terapeutice anexe(PTA) (placi Petri, tuburi de cultură / centrifugă, flacoane, pipete serologice) sunt utilizate pe scară largă, de la cultura de ovocite / embrioni până la depozitarea diferitelor soluții sau prelucrarea celulelor reproductive masculine. Dimensiunea sticlelor și a altor ambalaje trebuie să fie adecvată pentru a minimiza deschiderile și timpul dintre prima și ultima utilizare.

1. **Alegerea produselor terapeutice anexe(PTA) in functie de specificațiile reactivilor și materialelor critice**

*Toate consumabilele de unică folosinta si mediile utilizate în spațiu de prelucrare a celuler reproductive feminine si cultura embrionară ( embriologie/FIV ) sau a spațiului de prelucrare a celulelor reproductive masculine (andrologie)*  *trebuie să fie în conformitate cu normele europene și / sau naționale si de preferință, marcate CE.* Există multe produse fabricate special pentru FIV care sunt comercializate ca „testate”, ceea ce înseamnă că au trecut cel putin printr-o testare biologica în ceea ce privește embriotoxicitatea. Cu toate acestea, analizele în sine și criteriile lor de promovare ar trebui revizuite. Este posibil să nu îndeplinească liniile directoare stabilite într-un anumit laborator ca fiind acceptabile pentru utilizare. În plus, aceleași materiale „pre-testate” pot deveni toxice dacă sunt depozitate sau expediate în condiții suboptime *[De los Santos M.,2016; Swain JE, 2015]*. Majoritatea companiilor și băncilor de celule si țesuturi reproductive folosesc fie testul embrionului de șoarece, fie testul de supraviețuire a spermatozoizilor 24 de ore (sau o combinație a celor două) pentru a testa mediile și produsele de unică folosință. În timp ce testul embrionilor de două celule de șoarece a fost standardul, a devenit evident că testul cu embrionii de o singură celulă este mult mai sensibil în detectarea unei probleme [*Davidson A, 1988; Tucker K., 2002 ].* Dintre aceste teste biologice, MEA pare să fie alegerea predominantă a specialistilor, chiar dacă este departede la a fi un test perfect. Există multe variații în acest sens - etapa celulară de început și etapa de celulă finală a bioanalizei, linia de șoarece utilizată, numărul de embrioni amestecati în cultură, volumul de medii utilizate și utilizarea proteinelor în mediile utilizate - toate acestea contribuind la sensibilitatea și precizia bioanalizei. În timp ce MEA este poate cea mai populară bioanaliză, alți factori care pot afecta testul includ prezența aminoacizilor și concentrația de proteine în mediul de cultură. Ambele sunt capabile să detecteze toxinele și eventual, să le amelioreze efectul *[George MA, 1989].* ***Serul pacientului sau al donatorului și lichidul folicular nu trebuie utilizate ca supliment proteic.Furnizorii comerciali de albumine serice umane sau medii care conțin o sursă de proteine derivate din ser ar trebui să furnizeze dovezi de screening conform reglementărilor europene și / sau naționale****.*

***Un aspect important în ceea ce privește placile sau tuburilor din plastic este acela că ar trebui să fie îndepărtate din ambalaj pentru a permite degazarea VOC-urilor timp de cel puțin 24 de ore și, de preferință, mai mult, înainte de utilizare*.** VOC-uri precum stirenul și toluenul sunt prezente în placile Petri sau alte consumabile de unica folosinta [*Cohen J, 1998; De los Santos M., 2016*] pentru o perioadă de timp după scoaterea din ambalaj. Acești compuși sunt foarte solubili în ulei și pot afecta calitatea celulelor reproductive si ulterior, dezvoltarea embrionilor. Nivelurile de substante organice volatile din orice incubator sunt direct proporționale cu numărul de placi găzduite în incubator [*Karagouga G, 2014*; *Gilligan A, 1997*]. În cazul anumitor placi Petri, tuburi și baloane, pot exista și reziduuri din oxizii de etilenă folosiți în procesul de sterilizare [*Cohen J, 1998; Karagouga G., 2014].* În plus față de degazare, se recomandă clătirea placilor sau a materialelor utilizate pentru depozitarea produselor, cum ar fi medii sau proteine pentru cultura embrionară, pentru a îndepărta resturile și contaminanții (mai ales din procesul de fabricație). Cateterele de embriotransfer- de unică folosința se spala în mediu de cultură pentru o perioadă scurtă de timp înainte de utilizare. Consumabile necesare spatiilor de prelucrare a celulelor reproductive si cultura embrionara sunt disponibile de la mulți producători mari și mai recent de la unele companii de specialitate și este o chestiune de alegere personală bazată pe tipul de sistem de cultură din banca **[seful de laborator selectioneaza si valideaza PTA-urile in functie de procedurile operationale specifice]. Majoritatea sistemelor de cultură de ovocite și embrioni utilizate în prezent sunt sisteme sub ulei și micropicaturi. Exista o serie mare de tipuri si marci de placi de cultura**.

 **2. Toate consumabilele și materialele trebuie să fie adecvate scopului lor, de calitate si de preferință cu Marcaj CE.**

Materialele din plastic pot fi clasificate în categorii în funcție de funcție și scop.

Se recomandă utilizarea de medii de cultura controlate, de calitate, ulei și alte produse terapeutice anexe controlate (vârfuri de pipeta , ace de injectie, catetere de embriotransfer sau inseminare etc). Dacă aceste materiale nu fac dovada unei testari de calitate si a unei declaratii de conformitate, aceasta trebuie să fie efectuată in cadrul bancii sau de o companie terta desemnată. În plus, ar trebui verificată integritatea ambalajului și condițiile de livrare corespunzătoare. Documentația testării controlului calității trebuie să fie furnizată pentru orice suport comercial și aceasta trebuie să corespundă lotului livrat. Alegerea tipului de consumabilele de unică folosință (placi Petri, tuburi de cultură / centrifugă, flacoane, pipete serologice) depide de utilizarea acestora: cultura de ovocite / embrioni. Dimensiunea sticlelor și a altor ambalaje trebuie să fie adecvată pentru a minimiza deschiderile și timpul dintre prima și ultima utilizare [*De los Santos M., 2016*].

De exemplu, placutele din plastic utilizate pentru identificarea ovocitelor tind să aibă o suprafață mai mare pentru a accelera identificarea maselor cumulus-ovocite. Aceste placi au o dimensiune cuprinsă între 60 și 100 mm în diametru. Placile pentru cultura ovocitelor tind să aibă dimensiunea de aproximativ 60 mm. Aceaste dimensiuni permite picături mai mari pentru a găzdui masele cumulus-ovocite înainte și după inseminare folosind fie mijloace convenționale, fie ICSI. O placuta de 60 mm poate găzdui cu ușurință majoritatea, dacă nu chiar toate ovocitele pacientului.

Principala problemă care trebuie luată în considerare la selectarea unui producător de placi pentru cultura in micropicaturi este modul în care se va prezenta forma picăturii. De multe ori, picăturile se vor aplatiza în timp. Acest lucru este determinat în principal de prezența sau absența unei încărcături electrice pe vas. Tipul de ulei utilizat poate avea, de asemenea, un efect asupra integrității picăturilor. Placile pentru cultura embrionilor tind să fie mai mici și au dimensiuni cuprinse între 35 și 60 mm. Deasemenea, se pot uiliza placute multiwell și microdrop pentru cultura embrionilor și există multe modele noi disponibile.

Acele de punctie/recuperare a ovocitelor: Tipul (lumenul simplu sau dublu) și dimensiunea (16 g sau 17 g) ale acelor de recuperare a ovocitelor utilizate astăzi sunt o chestiune de alegere și acea decizie va fi luată probabil după consultarea medicului. Toate funcționează foarte bine, iar incidența deteriorării ovocitelor cauzate de ace este îndepărtată atunci când sunt utilizate corespunzător. Presiunea utilizată pentru evacuarea foliculilor este critică, iar deteriorarea complexului cumulus-ovocit este mai probabil să apară odată cu creșterea presiunii.

Una dintre cele mai importante decizii care trebuie luate în ceea ce privește produsele de unică folosință este instrumentul care va fi utilizat pentru manipularea ovocitelor și embrionilor. Există multe instrumente oferite pe piață astăzi dar au și un preț mare.. Alte materiale necesare pentru ca o banca de celule si tesuturi reproductive să funcționeze eficient sunt articole precum catetere pentru transferul embrionilor, acele de injectie pentru ICSI și biopsie embrionară, pipete serologice, filtre pentru soluții și consumabile pentru crioconservare. Alegerea acestor materiale depinde foarte mult de modul în care seful **laboratorului administrează procedurile de lucru, numărul de cazuri, numărul de personal disponibil pentru efectuarea procedurilor, precum și de buget.**

**Privind prelucrarea materialului reproductiv masculin.**

Mediile care urmează să fie utilizate pentru prepararea spermatozoizilor trebuie să fie fabricate în condiții care respectă bunele practici de fabricație (GMP). Orice reactiv sau mediu suplimentar trebuie să fie de puritate adecvată scopului prevăzut.

d. Orice echipament de laborator sau accesoriu care este utilizat fie ca parte a unui proces de diagnostic sau terapeutic trebuie să fie complet validat și marcat CE în conformitate cu reglementările UE.

e Orice echipament sau reactivi care au fost modificați în vreun fel și utilizati în afara recomandărilor producătorului trebuie să aibă dovezi documentate de conformitate cu reglementările pentru fabricarea in vitro. Aceasta ar trebui să respecte Directiva privind dispozitivele medicale de diagnostic in vitro (IVD).

1. **Gestionare stocurilor pentru medii, ulei și consumabile(produse terapeutice anexe).**

Ar trebui să fie disponibil un sistem adecvat pentru gestionarea stocurilor pentru medii, ulei și consumabile, inclusiv numărul lotului, data de intrare și data de expirare. Prea des, la proiectarea unui nou laborator, este alocat spațiu inadecvat pentru depozitarea placilor din plastic și a altor consumabile de unică folosință. Este benefic să aveți o cameră de depozitare considerabilă, adiacentă laboratorului. **Trebuie să fie disponibile instalații frigorifice adecvate pentru depozitarea mediilor și reactivilor. Corect, trebuie verificată temperatura în timpul expedierii lor la clinică. Schimbările repetate de temperatură ar trebui evitate în timpul manipulării în spatiul de prelucrare**. Cand are loc receptia, acestea trebuie scoase din orice ambalaj din carton maro.

În mod ideal, ambalajele individuale din plastic sunt ușor deschise pentru a începe procesul de degazare în zona de depozitare. Cantitatea fiecărui articol stocat depinde de buget, de numărul de pacienți preconizati și de spațiul de stocare disponibil.

Dacă este posibil, este practic să achiziționați mai multe cutii cu același număr de lot, deoarece economisiti timp și bani în măsura în care QC este necesar pentru fiecare articol nou.

***Reactivii, materialele și consumabilele trebuie utilizate întotdeauna înainte de data de expirare a producătorului***. Fiecare laborator trebuie să dezvolte o bază de date de inventar pentru a asigura o aprovizionare adecvată cu toate materialele necesare și pentru a crea un sistem de rotație în care se folosește mai întâi stocul mai vechi. Pe măsură ce se primesc loturi noi, acestea sunt introduse in baza de date cu data primirii, numărul specific al lotului, data expirării produsului (dacă este cazul) și starea testării. Pe măsură ce fiecare lot nou este pus în funcțiune, data de începere este, de asemenea, introdusa in baza de date..Evaluările riscurilor ar trebui efectuate pentru a se asigura că toate consumabilele și mijloacele media sunt ușor identificate pentru a fi evitate orice utilizare abuzivă. Conform ordinului OMS1763/2007 fiecare unitate FIV trebuie sa aiba o lista produselor terapeutice anexe (PTA) şi a ambalajelor intrând în contact cu produsele.

Utilizată în acest mod, baza de date poate fi un instrument util in:

- identificarea tuturor datelor relevante legate de produsele terapeutice anexe şi materialele care vin în contact, în timpul prelevarii, testarii ,procesării sau crioprezervarii cu ţesuturile şi celulele umane;

- validare - stabilirea dovezii prin care utilizarea oricăror proceduri, materiale, materii prime sau produse, activităţi sau sisteme permite în mod real atingerea rezultatelor aşteptate şi a specificaţiilor definite;

- identificare unor posibile activităţi critice - activităţile cu potenţial efect negativ asupra calităţii şi/sau securităţii ţesuturilor şi/sau celulelor.

- descrierea şi originea produselor terapeutice, etapele de procesare parcurse, materialele şi produsele terapeutice aditive care au intrat în contact cu ţesuturile şi celulele şi care au efect asupra calităţii şi/sau securităţii acestora;

- trasabilitatea ascendenta si respectiv descendenta.

**CAPITOLUL 6. MANIPULAREA MATERIALULUI BIOLOGIC (conditii de biosiguranta)**

**6.1. Norme specifice de securitate a muncii pentru activitati in domeniul sanatatii**

6.1.1 La locurile de munca in care se desfasoara activitati din domeniul sanatatii vor fi repartizate numai persoane care cunosc echipamentele tehnice, instalatiile si procedeele de lucru, au calificarea si autorizarea necesara si au fost instruite din punct de vedere al securitatii muncii.

6.1.2. Controlul medical periodic este obligatoriu si se va desfasura potrivit reglementarilor Ministerului Sanatatii.

6.1.3. Organizarea si desfasurarea activitatii de instruire a salariatilor in domeniul securitatii si sanatatii muncii se vor desfasura conform Legii nr. 319 din 14.07.2006 a securitatii si sanatatii in munca; cap. III; sectiunea a 7-a; art.20 si Hotararii nr.1425/2006 pentru aprobarea Normelor metodologice de aplicare a prevederilor Legii securitatii si sanatatii in munca; sect.a 8-a; cap.V.

6.1.4. Orice accident sau incident care implica manipularea unui agent biologic va fi semnalat de catre salariat conducatorului locului de munca. (2) Conducerea persoanei juridice sau fizice va informa salariatii si/sau reprezentantii acestora despre:

-producerea oricarui accident sau incident care conduce la diseminarea unui agent biologic si care poate provoca o infectie sau o imbolnavire umana grava;

-producerea unor accidente sau incidente grave, cauzele si masurile adoptate sau cele ce trebuie adoptate pentru remedierea situatiei.

6.1.5. Vestiarele destinate echipamentului individual de protectie vor fi separate de cele pentru imbracaminte personala de exterior.

6.1.6 Se interzice salariatilor sa poarte imbracamintea proprie in spatiile de testare si prelucrare celule.

6.1.7. Salariatii vor fi purta, dupa caz,cu echipament individual de protectie corespunzator

6.1.8. In spatiile in care se desfasoara activitati se va mentine permanent curatenia si se va efectua dezinfectia.

6.1.9. In incaperile de lucru sunt interzise depozitarea alimentelor si servirea mesei, precum si fumatul.

**6.2. Recomandări de bază privind biosiguranţa în banca de celule si tesuturi**

**6.2.1. Puncte cheie**

**-** Fiecare banca de celule si tesuturi trebuie să evalueze riscurile locale pentru a se asigura că se pot efectua testările în condiţii de siguranţă.

- Prelucrarea probelor biologice trebuie efectuată respectând regulile de bune practice , conform procedurilor locale.

- Se va avea o atenţie sporită pentru reducerea riscului formării de aerosoli şi picături.

- Personalul trebuie să poarte echipament de protecţie personală conform riscului estimat.

**6.2.2** Competenţa personalului şi (re)instruirea lui

Asiguraţi-vă că personalul care lucrează în spatiul de lucur a fost instruit corespunzător, cunoaşte şi

aplică procedurile în condiţii de biosiguranţă, înţelege importanţa măsurilor de biosiguranţă.

6.2.3 **Echipamentul de protecţie personală**

-Halatele se poartă închise. Preferabil, materialul trebuie să fie impermeabil. Halatele se poartă doar în zonele de lucru, după utilizare acestea se păstrează corespunzător, într-o zonă dedicată.

- A nu se agăţa halatele unul peste celălalt sau în dulapuri alături de lucrurile personale. A

nu se purta halatele cu care se lucrează în spatiul de prelucrare celule si tesuturi reproductive în afara zonei de lucru, cum ar fi în sala de mese, de repaos, în afara zonei de lucur

- Se vor purta mănuşi de fiecare dată când se lucrează cu probe şi alte probe potenţial infecţioase). Mănuşile nu se dezinfectează şi nu se refolosesc, Integritatea manuşilor se vor verifica înainte de folosire.

- Nu se părăseşte zona de lucru cu mănuşile. Acestea se scot, respectând regulile de îndepărtare a lor, pentru a se evita contaminarea mâinilor. Mănuşile se aruncă în recipiente speciale. După îndepărtarea mănuşilor se igienizează mâinile.

- Ochelarii de protecţie, vizierele se vor purta de fiecare dată când trebuie protejati de stropi ochii sau faţa .

- Protecţia respiratorie este necesară de obicei. Cu toate acestea, trebuie evaluate riscurile locale în vederea stabilirii nevoii protecţiei respiratorii. Este vorba în special de proceduri care se efectuează în afara hotei de biosiguranţă, cele generatoare de aerosoli: centrifugarea, manevrarea unor probe scurse sau proceduri care pot genera stropi (deschiderea tuburilor de centrifugă, mixare, vortexare, agitare energică, deschiderea unor recipiente cu presiune crescută în interior).

**6.2.4 Bune practici**

- A nu se aduce în zona spaţiilor de lucru obiecte personale, mâncare sau băuturi.

- A nu se pune în gură diverse obiecte (de ex. instrumente de scris), nici in cazul purtării de manuşi

- A se spăla mâinile după manevrarea probelor biologice, de fiecare dată când se suspicionează contaminarea mâinilor şi înainte de părăsirea spaţiului de lucru.

- Leziunile cutanate trebuie acoperite, pansate.

- Înainte de a intra în zona de lucru, să se convingă de existenţa tuturor consumabilelor, echipamentelor de lucru şi de protecţie personală, dezinfectante şi antiseptice suficiente pentru munca ce urmează a fi desfăşurată.

- A se proteja documentele în care se fac înregistrări. Documentele în care se fac înregistrări nu se introduce in spatiul de prelucrare celule, acestea au un loc de păstrare bine stabilit..

- Toate manevrele se fac cu grjiă şi fără grabă. A se evita lucrul de către persoane obosite.

- Suprafaţa de lucru trebuie pastrată curată, ordonată şi neaglomerată cu lucruri inutile.

- A se interzice folosirea de căşti, acestea ar putea distrage atenţia persoanei şi împiedică auzirea semnalelor de alarmă din instituţie sau ale echipamentelor.

- A se indepărta bijuteriile (inele, brăţări). Cele care nu pot fi îndepărtate, trebuie acoperite pentru a preveni ruperea mănuşilor şi trebuie decontaminate în mod regulat.

- A nu se utiliza echipamente electronice mobile (telefon, tablete, laptop, stick de memorie, cameră foto) cand acestea nu sunt strict necesare în cadrul unei proceduri.

- Echipamentele electronice trebuie păstrate în locuri unde sunt ferite de contaminare. Dacă acest lucru nu este posibil, trebuie decontaminate înainte de a fi introduse in zona spatiului de lucru.

**6.2.5 Proceduri tehnice**

- În cadrul prelucrării probelor biologice trebuie utilizate tehnici corecte, cu minimalizarea formării de aerosoli şi picături.

- A se evita ingerarea agentilor biologici si contactul cu ochii şi tegumente.

- A se purta manuşi pe toată durata lucrului cu probe biologice.

- A nu se atinge faţa cu mâinile (cu sau fara manusi).

- De câte ori este posibil să se înlocuiasca echipamentele din sticlă cu plastice.

- A se acoperi faţa, gura in cazul unor manevre care pot genera stropi.

- In cazul în care se folosesc foarfeci, acestea să fie cu capătul rotunjit.

- Tăietoarele şi întepătoarele trebuie manipulate cu grijă, descărcarea acestora se face conform reglementărilor în vigoare (recipiente speciale).

- A nu se recapişona acele.

- Se interzice ca la pipetarea lichidelor sa se foloseasca aspiratia cu gura.

- La inceputul si la finalul programului de lucru, suprafetele vor fi curatate si libere de consumabilele folosite.

- **Pentru prevenirea răspândirii agenţilor biologici**:

o Probele biologice şi culturile se vor arunca în recipiente etanşe şi cu capac pentru a se preveni scurgerea;

o Aria de lucru se va decontamina la terminarea lucrului şi ori de câte ori se stropeşte sau survine o contaminare evidentă conform procedurilor locale;

o Asigurati-vă că tipul de dezinfectant folosit este adecvat materialului biologic cu care se lucrează şi că procesul de dezinfecţie respectă timpul de contact prevăzut de producător.

**6.2.6 Preluarea si păstrarea probelor biologice**

- Probele preluate de laborator trebuie să fie insoţite de suficiente informaţii pentru a putea identifica tipul probei, când şi unde a fost colectat.

- Personalul care preia probele trebuie să fie instruit adecvat şi să fie conştient de pericolele implicate. Trebuie să cunoască procedura aplicată în caz de probe scurse sau recipiente sparte, să ştie cum să aplice dezinfectanţii în caz de contaminare.

- Păstrarea probelor se face în recipiente adecvate, inscripţionate pentru a înlesni identificarea lor. Materialul recipientului să fie corespunzător modului de pastrare.

**6.2.7. Utilizarea hotelor de biosiguranţă**

- Toate probele biologice care se prelucrează în spatiul de testare si prelucrare celule, de pot avea Încărcătură virala,bacteriana etc , de aceea deschiderea probelor şi prelucrarea acestora trebuie efectuată sub hote de biosiguranţă clasa II certificate, cu mentenanţa şi reviziile efectuate la zi.

- Pentru a lucra în siguranţă, trebuie respectate regulile de funcţionare ale acestuia: pornire conform instrucţiunilor, aşteptarea stabilizării fluxului. A nu se încărca excesiv spaţiul de lucru, a nu se acoperi (cu hârtii, obiecte) fantele prin care circulă fluxul de aer, a se evita

mişcările excesive din jurul hotei care îi perturbă fluxul.

- Persoana care lucrează la hotă să efectueze mişcări lente, introducerea mâinilor sub hotă se face perpendicular faţă de planul ferestrei frontale. După introducerea mâinilor se aşteaptă cca 1 minut nemişcat pentru asigurarea stabilizării fluxului de aer. Pentru a reduce numărul intrărilor/ieşirilor să fie pregătite prealabil la îndemână toate lucrurile necesare.

- Obiectele necesare pentru activitatea sub hotă trebuie puse cât mai în spate. Dacă este nevoie de vortex, acesta se pune cât mai în spate. Recipientul pentru deşeuri mici (vârfuri, anse de plastic) prevazute cu saci se pune într-o parte a hotei (dreapta pentru dreptaci). Aceste recipiente pentru colectarea deşeurilor să nu se pună în afara hotei, deorece scoaterea şi introducerea repetată a mâinilor în hotă perturbă fluxul de aer.

- Se recomandă ca hota să fie pornită cu cca 5 minute înainte de începerea şi la 5 minute după terminarea lucrului pentru a permite evacuarea aerului contaminat.

- Utilizarea lampii UV nu se impune. Dacă se foloseşte, să se şteargă praful de pe tub cel puţin odată pe săptămână.

- În cazul unui incident prin stropire în incinta hotei, trebuie dezinfectată imediat în timp ce hota rămâne în funcţiune.

- După terminarea lucrului toate obiectele se scot din hotă. Echipamentele se decontaminează. Nu se lasă medii de cultură în interior. Hota se dezinfectează înaintea începerii şi după terminarea lucrului.

- Pentru dezinfectarea hotei se va folosi dezinfectant potrivit,special pentru spatiile de lucru cu celule reproductive. În cadrul decontaminării de la terminarea lucrului se vor şterge inclusiv pereţii hotei, partea interioară şi exterioară a geamului

**6.2.8. Manevre care implică risc de contaminare**

- Pipetare cu pipete automate poate genera aerosoli când din vârf cade o picătură pe suprafaţa de lucru, când se amestecă în lichid prin aspirare-dispersare, când se elimină ultimele picături din vârf , pentru evitarea formării aerosolilor se va pipeta lent, nu se vor amesteca materialele infecţioase prin aspirare-dispersare.

**6.2. 9- Centrifugarea**

o Centrifuga trebuie supravegheată – în eventualitatea spargerii unui tub, trebuie oprită – se deschide doar după 30 de minute de la oprire, cu echipament de protecţie inclusiv respiratorie şi se dezinfectează interiorul centrifugii.

o Dacă spargerea unui tub se observă numai după oprirea centrifugii, capacul se reînchide imediat şi se lasă închis 30 de minute. După aceea se procedează conform celor descrise mai sus.

o În cazul în care nu au loc incidente, centrifuga se deschide după o pauză de 10 minute

- Deschiderea recipientelor cu material biologic se face strict în hotă.

**6.2.10 Incidente:**

- În caz de stropire: recipientele sparte, materialul scurs se acoperă cu prosop de hârtie, dezinfectantul se aplică peste acesta şi se lasă durata timpului de contact, în funcţie de tipul dezinfectantului. Se îndepărtează prosopul de hârtie, rămăşiţele. Se poartă mănuşi pe toată durata procesului.

**6.2.11. Igiena mâinilor în laborator**

- se va respecta procedura descrisă în documentul Institutului Naţional de Sănătate Publică:

- Este absolut interzisă folosirea prosoapelor textile în laboratoare!

- Pentru efectuarea corectă a igienei mâinilor se interzice:o purtarea inelelor, brăţărilor, ceasurilor tip brăţară sau a altor bijuterii în timpul activităţii;

o purtarea unghiilor lungi sau lăcuite, indiferent de tipul sau vechimea lacului de unghii; unghiile artificiale

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  **6.3 Menținerea condițiilor curate în spatiul de prelucrare si testare celule respectand urmatoarele:** 1.         Numai personalul autorizat poate intra în zona de laborator.2.         Orice persoană care intră în zona de laborator trebuie să fie îmbrăcată în mod corespunzător în costumul specific de interior sau halat de unica folosinta.3          Trebuie purtată incălțămintea adecvată, de ex. încălțăminte folosita doar pentru interior sau papuci de unica folosinta.4.         Embriologii trebuie să poarte boneta și mănuși în orice moment.5.         Trebuie să fie efectuată spălarea mâinilor oricand este necesar.6.         Documentele în laboratorul FIV se păstrează la un nivel minim.7.         Laboratorul este curățat zi de zi.**6.3.2       Programul de decontaminare și igienizare al incubatoarelor**1. Incubatoarele trebuie curățate și dezinfectate la aproximativ 90 de zile de utilizare, sau după o posibila contaminare.a. Se vor consulta manualele de utilizare ale incubatoarelor.b. Opriți senzorul sistemului de monitorizare pentru temperatură și CO2 pe perioada cat incubatorul este inchis.c. Opriți incubatorul si deconectati tubulatura gazelor CO2 si O2 de la priza din perete.2. Se sterge întreaga suprafață interioară a incubatorului cu solutia de dezinfectare Oosafe (Sparmed), se lasa sa actioneze 15 minute, apoi se șterge cu apa distilata sterila.3. Porniți incubator. Daca manualul indica realizarea unui ciclu de decontaminare acesta se efectueaza conform instructiunilor.**6.3.3       Igienizarea centrifugilor**6.3.3.1 Centrifuga este curățată o dată la 3 luni, sau dacă este necesar ca urmare a unei scurgeri.6.3.3.2 Camera interioară, suprafețele centrifugii si suporturile pentru tuburi se șterg cu solutie Oosafe (Sparmed). Centrifuga este lăsată să se usuce timp de 30 minute.**6.3.4. Igienizarea hotelor si suprafețelor de lucru din laborator**1. Toate hotele/suprafețele de lucru sunt șterse, la sfârșitul zilei, cu solutie Oosafe (Sparmed) si cu servetele dezinfectante sterile Oosafe.2. Toate suprafețele trebuie să fie șterse pe parcursul zilei de lucru cu apa distilata, după fiecare utilizare, de ex. stergerea hotei dupa fiecare recoltare de ovocite sau dacă se produc scurgeri.3. Utilizarea solutiei Oosafe se va face doar la finalul programului de lucru, cand nu mai sunt medii sau probe biologice in afara incubatoarelor, sau in situatii deosebite, de ex. lucrul cu probe contaminate sau inainte de tubarea celulelor embrionare biopsiate.**6.3.5       Monitorizarea mediului** **Monitorizarea particulelor viabile**1.1. Testarea particulelor viabile trebuie să includa bacterii, drojdii, mucegaiuri și E.coli.1.2. Programul de monitorizare al mediului va cuprinde următoarele modalitati de prelevare:• Expunerea plăcilor cu mediu de cultura la mediul din spatiul testare si prelucrar• Prelevarea de probe din incubatoare si de pe suprafetele critice din laborator cu ajutorul tampoanelor de prelevare.**6.3.6.**  **Alte proceduri de igienizare**1. O data pe saptamana se vor sterge toate celelalte suprafete din laborator: mese, exterior incubatoare, exterior hote, micromanipulator, interior frigider.
2. O data la 3 luni se vor sterge peretii laboratorului.
3. Curatarea si decontaminarea pardoselei din laborator se va realiza doar la sfarsitul programului de lucru, cand nu mai sunt medii sau probe biologice expuse.
4. Curatarea se va realiza de cate ori este posibil, dar minim o data pe saptamana.
 |  |

**CAPITOLUL 7. RECEPTIONAREA OVOCITELOR DUPA PRELEVARE**

**Definitie:** prelevarea de ovocite reprezinta prima etapa a procedurii de fertilizare in vitro. Ea consta in punctionarea foliculilor ovarieni si aspirarea lichidului folicular de catre medicul ginecolog, urmata de identificarea, colectarea si cultivarea complexelor cumulus oophorus-ovocit de catre embriolog, pana la momentul inseminarii ovocitelor.

**Timpul optim de prelevare** este intre 34-38 ore de la administrarea hCG-ului, cel mai frecvent se face la 35-36 de ore de la hCG. Prelevarea mai precoce va duce la cresterea proportiei de ovocite imature, iar cea tardiva este insotita de riscul de ovulatie si imposibilitatea recuperarii ovocitelor mature.

**Obiectivele** sunt urmatoarele:

* Recuperarea tuturor ovocitelor in cel mai scurt timp
* Evaluarea aspectului celulelor granuloase din cumulus si corona radiata pentru a aprecia gradul de maturare a ovocitelor
* Evaluarea maturitatii si a calitatii ovocitelor inainte de fertilizare
* Examinarea lichidului folicular pentru semne cu potentiala semnificatie patologica (de ex: luteinizare prematura sau endometrioza) sau sugestive pentru administrarea eronata a declansatorului de ovulatie, pentru a informa clinicianul.

**1).Pregatirea prelevarii ovocitelor** incepe in spatiul de prelucrare celule reproductive feminine cu o zi inainte de procedura (ziua -1), adica la o zi dupa administrarea hCG-ului.

**a) Verificarea documentelor medicale**

- personalul bancii trebuie sa se asigure ca ambii parteneri au semnat toate consimtamintele necesare procedurilor care urmeaza.

- verificarea testelor de screening pentru infectii in cazul ambilor parteneri (markeri pentru hepatita B, C, pentru HIV si sifilis)

- evaluarea informatiilor unor eventuale cicluri anterioare de FIV, si anume: raspunsul la tratamentul de stimulare, numarul, gradul de maturitate si calitatea ovocitelor, timpul pana la inseminare, rata de fertilizare, detalii despre parametri spermatici, metode anterioare de fertilizare a ovocitelor, informatii despre embrioni si evolutia acestora. Toate acestea pot fi utilizate pentru a lua masuri necesare pentru a imbunatati rezultatul procedurii ce urmeaza sa se desfasoare. Instructiunile detaliate se vor nota pe fisa de documentare a procedurii atribuita cuplului in cauza.

- evaluarea ciclului curent (numarul de foliculi, parametri hormonali, prezenta patologiei ovariene sau tubare - endometrioza, hidrosalpinx etc) este necesara pentru pregatirea unei cantitati suficiente de medii si consumabile utilizate in timpul procedurii.

**b)**. **Pregatirea mediilor si consumabilelor** pentru prelevarea de ovocite

Trebuie sa existe proceduri scrise referitoare la modul de pregatire a placilor de cultura si a tuburilor de prelevare, care sa contina informatii detaliate despre:

-tipurile de medii, cantitatea utilizata in functie de numarul de foliculi ovarieni, modul de echilibrare (cu sau fara expunere la CO2), timpul necesar echilibrarii, daca se acopera sau nu cu parafina lichida/ulei mineral, in atmosfera umeda/nu, daca se lucreaza in picatura/godeu, modalitatea de etichetare, etc.

De exemplu:

- tipurile de medii: fie cele care necesita echilibrare in CO2 (sistem tampon cu bicarbonat), fie cele care necesita doar incalzire la 37 de grade (sistem tampon cu HEPES/MOPS). Se aleg dupa preferinte si experienta anterioara a bancii.

Medii necesare:

* mediu de aspirare a foliculilor (nu trebuie sa contina heparina pentru previne coagularea sangelui si creste riscul de hemoragie dupa punctie) si de spalare a acului de prelevare (contine heparina)
* mediu de spalare a ovocitelor pentru indepartarea lichidului folicular, a sangelui si a mediului de aspirare
* mediu de cultura a ovocitelor spalate pana la momentul inseminarii/injectarii.

- timpul de echilibrare: mediilor care necesita expunerea la CO2 se echilibreaza cu minim 4 ore inainte de procedura, preferabil peste noapte

- etichetarea tuturor consumabilelor care sunt utilizate pentru pregatirea, manipularea si cultura ovocitelor (placi de cultura, tuburi etc) cel putin cu: nume, prenume, CNP, si un alt cod unic de identificare (de ex.: numarul de registru sau codul CUIANT), data. Verificarea ca informatiile sa coincida cu cele notate pe fisa de documentare a procedurii atribuita cuplului respectiv. Etichetarea trebuie facuta cu un marker permanent sau etichete pretiparite(pentru a evita stergerea informatiilor) si care sa nu elibereze compusi organici volatili (a se vedea Capitolul 4 -Identificarea pacienților, ambalarea, etichetarea și trasabilitatea celulelor/țesuturilor reproductive)

**2).Prelevarea de ovocite (ziua 0)**

Prelevarea de ovocite este o procedura sensibila si necesita o atentie deosebita pentru mentinerea constanta a temperaturii, pH-ului si osmolaritatii mediilor si o manipulare rapida si eficienta a ovocitelor.

Scaderea temperaturii sub 35 de grade duce la dezasamblarea fusului de diviziune si poate induce aneuplodii in ovocite.

Timpul scurs de la prelevare pana la cultivarea ovocitelor spalate trebuie sa fie cat mai scurt, contactul prelungit dintre ovocite si lichidul folicular uneori contaminat cu sange este de evitat. Pentru aceasta spatiul de prelucrare celule reproductive feminine trebuie sa se afle in imediata proximitate a spatiului de prelevare de ovocite si sa comunice direct cu aceasta, pentru a reduce la maxim timpul in care recipientele cu lichidul folicular ajung in spatiul de prelucrare. Daca acest lucru nu e posibil, transportul recipientelor cu lichid folicular se va face in conditii speciale, care asigura pastrarea temperaturii si pH-ului corespunzatoare, pana cand sunt predate embriologului, si anume: un mini laborator mobil, o izoleta modificata etc

Procedura trebuie sa se desfasoare in conditii sterile, in hota cu flux laminar, folosind consumabile sterile, de unica folosinta, marcate CE, aflate in perioada de valabilitate a termenului de utilizare si testate pe embrioni.

Embriologul va purta echipament de protectie de unica folosinta.

Inainte de fiecare procedura se va face decontaminarea suprafatelor cu substante cu destinatie speciala pentru spatiile de prelucrare (care sa nu fie toxice pentru gameti si embrioni).

Echipamentele utilizate trebuie sa mentina o temperatura constanta de 37 grade Celsius in mediul de cultura, pe tot parcursul procedurii: termoblocul pentru tuburile de prelevare, lupa stereomicroscopica cu termoplaca, incubatoarele. Termometrul utilizat trebuie sa fie calibrat.

Trebuie sa existe procedura operationala scrisa cu detalii despre fiecare etapa a prelevarii.

**Etapele prelevarii**

**a). Pregatirea consumabilelor inainte de procedura (ziua 0)**

– placile de prelevare, tuburile, pipetele sterile trebuie etichetate corespunzator.

– toate materialele care sunt utilizate pentru prelevare trebuie sa fie preincalzite.

– atentie!: fluxul de aer din hota poate raci atat suprafata de lucru, cat si probele biologice pe parcursul manipularii acestora. De aceea este necesara setarea unei temperaturi adecvate a echipamentelor incalzite.

– diametrul placii de prelevare trebuie sa fie adaptat pentru a preveni racirea probelor biologice (suprafata de expunere la fluxul de aer sa fie redusa)

– in zona de lucru nu trebuie sa existe produse biologice sau consumabile destinate altor cupluri, ci doar cele utilizate pentru pacienta/cuplul respectiv, pentru a evita incurcarea probelor.

– in cazul donarii de ovocite, etichetarea se va face initial cu datele donatoarei, iar datele pacientei primitoarei se vor utiliza ulterior, numai dupa ce donarea este confirmata de un martor.

**b). Identificarea pacientei**: ’’time-out’’ inainte de inceperea procedurii (pentru tot personalul implicat in procedura, din spatiile de prelevare si prelucare)

-pacienta isi confirma identitatea, tipul de procedura si consimtamantul pentru procedura

-se verifica daca tot necesarul de instrumente, materiale si consumabile a fost pregatit

-se verifica ca datele de identificare de pe toate etichetele sa corespunda cu cele ale pacientei (se citesc cu voce tare)

-se fac ultimele ajustari ale echipamentelor

-in spatiul de prelucrare celule reproductive feminine trebuie sa fie posibila dubla identificare si verificare (adica sa existe un martor, fie o persoana, fie un sistem electronic de etichetare, capabil sa emita un cod de bare sau unul bazat pe radiofrecventa).

**c).** **Examinarea lichidului folicular** pentru identificarea, colectarea si spalarea ovocitelor

–pentru mentinerea constanta a pH-ului se vor utiliza medii tamponate corespunzator si/sau procedura se poate desfasura sub o camera speciala, cu expunere la CO2

–examinarea se face cu ajutorul unei lupe stereomicroscopice, prevazute cu masa incalzita/termoplaca, gradul de magnificare al imaginii este cuprins intre 8-60x, expunerea la lumina a ovocitelor trebuie sa fie limitata.

–intotdeauna pipetarea trebuie sa fie manuala, nu se utilizeaza pipete pentru gura. Pipetele trebuie sa fie de unica folosinta si vor aruncate imediat dupa utilizare.

–atunci cand in lichidul folicular exista sange coagulat, se va incerca identificarea complexelor cumulus oophorus-ovocit. Se va desface coagulul cu ajutorul a doua ace sterile, fara a intinde cumulusul, pentru a evita activarea mecanica a ovocitelor

–embriologul informeaza in timp real ginecologul in legatura cu numarul de ovocite, de prezenta sau absenta celulelor granuloase si de aspectul lichidului folicular cand acesta are potentiala semnificatie patologica. De exemplu: absenta ovocitelor si a celulelor granuloase poate sugera eroare de administrare a declansatorului de ovulatie sau prelevarea unei proportii mari de ovocite degenerate (atretice) poate fi consecinta unei presiuni excesive de aspiratie a pompei, etc.

–inainte de a fi incubate in mediul de cultura, complexele cumulus oophorus-ovocit vor fi spalate pentru a indeparta restul de lichid folicular, de sange/lichide patologice si de mediu de aspirare, conform cu procedura operationala standard.

**d). Clasificarea** in functie de gradul de maturitate si evaluarea ovocitelor

–procedura trebuie sa detalieze modul de examinare, gradul de magnificare a imaginii, timpul maxim de examinare, tipul de mediu in care se desfasoara examinarea.

–aspectul morfologic al ovocitelor trebuie inregistrat.

-ovocitele imature, degenerate si cele cu aspect patologic (ovocitele gigante si cele cu globul polar de mari dimensiuni) nu vor fi utilizate pentru fertilizare.

**e). Incubarea** preinseminare/injectare – timpul de incubare trebuie ajustat in functie de gradul de maturare a complexelor cumulus-ovocit, conform procedurii, trebuie precizate actiunile remediale pentru ovocitele imature.

**f).Completarea documentelor** este necesara asigurarii trasabilitatii( ascendente/descendente)

Fiecare banca trebuie sa-si defineasca un sistem propriu clar si amanuntit in ceea ce priveste identificarea, urmarirea si localizarea gametilor si embrionilor fiecarui cuplu, in orice moment pe parcursul fiecarei etape ale procedurii de reproducere asistata aflata in desfasurare. Fiecare pas critic in timpul procedurii (identificarea ovocitelor, mutarea lor dintr-un recipient in altul) trebuie urmarit , verificat si confirmat in scris de un martor.

De exemplu: fisa de prelevare ovocite – nume, prenume pacienta, CNP, cod CUIANT, medicul ginecolog, embriologul care efectueaza procedura, martorul, data si ora recoltarii, numarul ovocite recoltat, tipurile de mediu si de produse terapeutice anexe utilizate (lot, data expirarii), stadializarea ovocitelor, aspectul morfologic, timpul de incubare preinseminare. Documentul este semnat de embriolog si de martor (atunci cand nu se utilizeaza un sistem informatic).

**Patologii asociate si precautii in timpul recoltarii de ovocite**

Toate lichidele biologice (lichid folicular, sange, etc) trebuie considerate si manipulate ca fiind potential infectioase, chiar daca s-a efectuat in prealabil screening-ul pentru hepatite, HIV, sifilis. Ca urmare personalul bancii trebuie sa respecte conditiile de asepsie pentru celule si tesuturi, care includ:

* Respectarea cu strictete a regulilor de igiena si tehnicilor aseptice de manipulare a produselor biologice (a se vedea Cap.6 -Manipularea materialului biologic)
* Utilizarea echipamentului de protectie in banca: halat de unica folosinta peste echipamentul de spital, capelina, incaltaminte pentru bloc operator sau protectie peste incaltamintea de spital, manusi fara talc
* Manipularea lichidelor biologice in hota cu flux laminar vertical
* Pipetare mecanica
* Indepartarea consumabilelor de unica folosinta dupa utilizare in cutiile speciale pentru deseuri biologice, pentru a proteja personalul bancii si dinafara lui.
* Acele, consumabilele din sticla si obiectele ascutite se vor manipula cu mare atentie si vor fi aruncate in cutiile speciale.
* Utilizarea de substante dezinfectante cu eficacitate si siguranta dovedite in banca de celule si tesuturi.

**a).Paciente cu infectii (hepatite, HIV, sifilis, Covid)**

Trebuie sa existe proceduri scrise pentru situatiile in care se vor procesa probe biologice de la pacienti infectati, iar personalul trebuie sa fie instruit.

-procedura se va efectua doar dupa evaluarea pacientilor de catre medicului infectionist (in cazul hepatitelor si a infectiei cu HIV), doar in conditiile unei viremii reduse sau de preferat nedetectabile. Sifilisul va fi tratat inainte de a incepe orice tip de procedura. Procedura RUAM se va desfasura ca urmare a unei decizii luate impreuna de catre medicul infectionist si specialistul in infertilitate.

- in cazul pacientelor infectate, acestea vor fi informate ca riscul transmiterii verticale a infectiei nu poate fi complet eliminat.

- personalul implicat va purta echipament de protectie suplimentar– halat de unica folosinta de bloc operator peste echipamentul de spital, 2 perechi de manusi, ochelari/viziera

-se va utiliza in mod ideal un spatiu complet separat cu acesta destinatie, cu echipamente separate (hota, incubator etc.). Daca acest lucru nu este posibil, se va decala in timp procedura, astfel incat nu existe alte proceduri desfasurate simultan. Se va acorda un timp suficient pentru decontaminarea riguroasa a tuturor suprafetelor si echipamentelor (trebuie sa existe procedura operationala de decontaminare, conform legislatiei nationale in vigoare), inainte de reluarea activitatii.

- daca se va face crioprezervarea ovocitelor dupa prelevare, stocarea se va face in rezervoare separate, destinate fiecarui tip de infectie.

- deseurile rezultate vor fi inlaturate in containere speciale pentru produse biologice cu risc crescut de infectie, conform unei procedurii operationale standard corespunzatoare.

-in ceea ce priveste manipularea ovocitelor se recomanda spalarea lor suplimentara, urmarindu-se scaderea riscului infectios prin dilutii repetate.

**COVID** (in functie de indicatiile autoritatilor competente relationat la incidenta infectiilor)

-testarea pacientilor inainte de inceperea procedurii si in ziua declansarii ovulatiei. In caz de rezultat pozitiv al cel putin unuia din parteneri, procedura se amana pana la negativarea testului.

- vaccinarea personalului medical implicat in procedura

- testarea periodica a personalului implicat in procedura care nu a fost vaccinat

- consilierea cuplurilor inainte de procedura in ceea ce priveste respectarea regulilor de preventie a infectarii, simptomatologia infectiei, riscurile legate de sarcina si nastere, informarea lor ca in cazul infectarii pe parcursul procedurii, aceasta poate fi intrerupta.

Exista exceptii in cazul carora se poate incepe prelevarea de ovocite in ciuda unui rezultat pozitiv pentru SARS-CoV-2 si anume la pacientii oncologici sau in cazul existentei riscului de sindrom de hiperstimulare ovariana. In aceasta situatie trebuie sa exista o procedura operationala standard care sa includa:

- tipul de echipament de protectie pentru personal (masti de protectie FPP2/3 si combinezon, ochelari/viziera).

- modul de organizare a activitatii personalului din banca de celule si tesuturi reproductive(miniechipe)

- evitarea manipularii gametilor si embrionilor altor cupluri in timpul procedurii, pentru a preveni contaminarea acestora.

- in ceea ce priveste manipularea ovocitelor se recomanda spalarea lor suplimentara, urmarindu-se scaderea riscului infectios prin dilutii repetate.

- eliminarea in conditii de siguranta a lichidelor biologice in containere cu destinatie speciala, care vor fi inchise si indepartate in cel mai scurt timp posibil

- decontaminarea suprafetelor dupa procedura, conform legislatiei nationale in vigoare.

**b).Contaminarea lichidului folicular cu lichide patologice**. In situatia in care sangele este coagulat, lichidul nu mai poate fi analizat, iar ovocitul nu poate recuperat. Tubul este aruncat la deseuri de materiale infectioase, in cutia galbena, inscriptionata corespunzator. In cazul pacientelor cu endometrioza, se va evita punctionarea endometrioamelor, din cauza riscului infectios. Uneori insa lichidul folicular poate fi contaminat cu aspiratul din endometrioame. In acest caz exista riscul de contaminare a probelor sterile, de aceea este necesara spalarea repetata a eventualului COC identificat. Tuburile se arunca la deseuri materiale infectiose.

**c).“Sindromul foliculilor goi”** este un scenariu clinic in care, in ciuda prezentei foliculilor ovarieni, nu se recolteaza niciun ovocit. Lichidul folicular are aspect chistic, el nu contine celule si COC-uri, acest lucru trebuie semnalat medicului ginecolog. Sindromul este rareori cauzat de dificultati tehnice de prelevare, de cele mai multe ori este cauzat de lipsa administrarii/administrarea eronata de catre pacienta a declansatorului de ovulatie (hCG). De aceea, ca metoda de precautie, se recomanda masurarea nivelurilor serice de LH si hCG cu o zi inainte de prelevarea de ovocite, pentru a ne asigura ca exista un nivel optim. Atunci cand ne confruntam cu o astfel de situatie, se va administra doza necesara de hCG, iar prelevarea de ovocite va fi repetata dupa intervalul de timp corespunzator.

**Validarea procesului**

Validarea procedurii de prelevare de ovocite consta in asigurarea ca procedura operationala standard sa fie respectata cu strictete, iar toate echipamentele sa fie in stare optima de functionare si produsele terapeutice anexe sa fie corespunzatoare cerintelor.

**Instructaj si competenta**

Personalul bancii care efectueaza prelevarea de ovocite (conform legislatiei, trebuie sa aiba pregatire universitara in domeniul ştiinţelor medicale sau biologice) trebuie sa fi fost instruit in prealabil de catre seful de laborator sau de inlocuitorul acestuia (embriologi seniori) si sa cunoasca procedura operationala standard. Recomandam ca:

* procesul de instruire sa fie documentat si sa contina cel putin 30 de proceduri efectuate sub supraveghere continua (recomandari ale ASRM).
* Rezultatele supervizarii si actiunile corective sa fie documentate in scris pentru fiecare membru al personalului.
* Programul de instruire sa specifice obligativitatea efectuarii unui minim de puncte EMC si un minim de proceduri anuale (ASRM = 20) si sa includa verificarea anuala pentru mentinerea competentei profesionale.

**Markeri ai competentei ovocitelor si indicatori-cheie ai performantei (KPI) (a se vedea Capitolul 2 – Managementul calitatii)**

Nu toate ovocitele recoltate de la o pacienta care a trecut prin tratamentul de stimulare ovariana vor fi competente, doar 5% din ovocite duc la nasterea unui copil sanatos (Lemmen et al., 2016). Competenta ovocitelor este data de gradul de maturare nucleara si citoplasmatica (Patrizio and Sakkas, 2009; Garrido et al., 2011; Lemmen et al., 2016). Mai mult, competenta ovocitelor este influentata de factori intrinseci si extrinseci. Factorii intrinseci sunt influentati de varsta, indicele de masa corporala, modul de viata si tipul de infertilitate. Factorii extrinseci tin de stimularea ovariana, de modul in care decurg procedurile in spatiul de prelucrare celule reproductive feminine (prelevarea, denudarea, fertilizarea, crioprezervarea) si conditiile externe (temperatura, pH, presiunea partiala a oxigenului, apoi de lumina, calitatea aerului, umiditatea si mediile de cultura).

Intrebarea care se ridica este daca exista un marker al competentei ovocitelor imediat dupa prelevarea lor? Cu alte cuvinte, putem afla la momentul recoltarii daca a aparut sau nu o disfunctionalitate pe parcursul dezvoltarii si maturarii ovocitului, intrucat tot ce se intampla ulterior poate fi influentat de conditiile externe sau de contributia genetica a spermatozoidului. In timp, au fost identificati o serie de posibili markeri ai competentei ovocitare, dar ei au fost utilizati in special in cercetare si nu au gasit o aplicabilitate practica in rutina zilnica. Printre acestia: markeri biochimici din lichidul folicular, studiile expresiei genice in celulele granuloase, cantitatea de oxigen preluata de foliculii ovarieni (Nagy et al., 2009; Nel-Themaat and Nagy, 2011). Alti markeri au fost inclusi in activitatea unor banci, de exemplu: morfologia ovocitelor, imagistica fusului de diviziune, biopsia de globul polar, dar fara a fi dovedita utilitatea lor.(Patrizio et al., 2007; Rienzi et al., 2011; Braga et al., 2013).

**Cei mai importanti indicatori pentru ovocite**

Chestionarele Alpha Scientists si ESHRE combinate arata ca rata de recuperare si rata de maturare sunt cei mai importanti indicatori pentru ovocite. Ei nu dau informatii despre performanta bancii, dar estimeaza raspunsul la tratamentul de stimulare si ne ajuta sa apreciem intr-o anumita masura competenta lotului de ovocite recoltate.

Rata de recuperare a ovocitelor este definita ca probabilitatea de a recolta cate un ovocit din fiecare folicul ovarian care atinge o anumita dimensiune in ziua administrarii declansatorului de ovulatie. Acest indicator potential se bazeaza pe acuratetea ecografiei si pe un interval de timp fix de la administrarea declansatorului pana la prelevare, care sa fie respectat de toate bancile. Rata de recuperare a ovocitelor trebuie sa fie de 70-80% pentru nivelul de competenta si de 85-100% ca nivel de referinta (optim).

Rata de maturare a ovocitelor se refera la maturarea nucleara si reprezinta proportia de ovocite aflate in stadiul MII. Este un marker al eficientei stimularii ovariene si al declansarii ovulatiei. Nivelul de competenta este de 75%, iar cel de referinta 90%. El poate fi calculat doar in cazul denudarii ovocitelor inainte de ICSI si este nevoie sa se stabileasca un interval de timp fix de la administrarea declansatorului de ovulatie pana la denudare (40 ± 1 ora de la declansare)

Alti indicatori despre care s-a discutat, dar care nu s-au dovedit utili au fost: gradul ovocitului (proportia de complexe cumulus-ovocit laxe la momentul recoltarii), rata de ovocite degenerate, rata de recuperare a veziculelor germinale.

In concluzie, raspunsurile la chestionar subliniaza lipsa de informatii solide in ceea ce priveste evaluarea calitatii si competentei ovocitelor si necesitatea culegerii acestor informatii de catre registrele nationale si internationale.

**CAPITOLUL 8. PREPARAREA SPERMEI–IUI/FIV/ICSI, ALTE PROCEDURI**

1. **Prelevarea probelor de sperma**
	1. Indicatii generale

Inaintea inceperii unui ciclu de tratament ar trebui realizata cel putin o analiza in scop diagnostic a unei probe de sperma, conform cu Manualul Organizatiei Mondiale a Sanatatii (WHO, 2021). Alegerea ulterioara a metodei de preparare pentru proba de sperma va fi dictata de rezultatele analizei si scopul in care va fi utilizata.

Manualul WHO (2021) mentioneaza ca referinte pentru interpretarea rezultatelor analizei probelor de sperma urmatoarele valori:

* Volumul ejaculatului: 1,4 mL;
* Concentratia de spermatozoizi: 16 x 106/mL;
* Numarul total de spermatozoizi: 39 x 106/ejaculat;
* Motilitate totala: 42%
* Motilitate progresiva: 30%
* Motilitate non-progresiva; 1%;
* Spermatozoizi imotili: 20%
* Vitalitate: 54%
* Forme normale: 4%

Prelevarea probelor de sperma pentru analiza/utilizare in cadrul procedurilor RUAM se realizeaza dupa o perioada de abstinenta de 2 - 7 zile.

Pacientul va primi indicatii scrise si verbale privind prelevarea probei, subliniindu-se importanta colectarii complete a probei.

Proba se preleveaza prin masturbare, colectandu-se intr-un recipient de plastic steril pregatit de personalul bancii de celule si tesuturi reproductive Nu se vor folosi la prelevare lubrifianti sau prezervative care nu sunt special concepute pentru acest scop, deoarece ar putea modifica proprietatile probei si interfera cu rezultatul final.

Recipientul pentru prelevare trebuie sa fie etichetat cu datele de identificare ale pacientului (ex.: nume, prenume, cod, data nasterii, etc), corectitudinea datelor fiind confirmata de catre pacient.

* 1. Prelevarea in cadrul clinicii

Este indicat ca proba sa fie prelevata intr-o camera separata aflata in apropiereaspatiului de prelucrare celule reproductive masculine, pentru a se evita expunerea acesteia la variatii de temperatura si pentru a se putea controla timpul de la prelevarea probei pana la inceperea analizei/prepararii.

Dupa prelevare proba este pastrata de preferat intr-un incubator la 37°C, sau pe o placa incalzita, pana la lichefiere.

1.3 Prelevarea probei in afara clinicii

Daca pacientul nu poate colecta proba la unitatea sanitara acreditata, aceasta poate fi prelevata si in alta locatie.

Pacientul va primi instructiuni privind prelevarea completa a probei si transportul acesteia la unitatea sanitara acreditata.Va trebui sa noteze ora prelevarii si sa transporte proba la unitatea sanitara acreditata in 30 minute, maxim 1 ora, iar temperatura probei sa fie mentinuta intre 20-37°C.

Se va mentiona in buletinul de analiza faptul ca proba a fost recoltata acasa. Se va eticheta recipientul de prelevare cu datele de identificare ale pacientului in prezenta acestuia, iar pacientul va semna o declaratie de prelevare a probei in afara clinicii.

1.4 Prelevarea probei cu ajutorul prezervativului.

Daca pacientul nu poate preleva proba prin masturbare, aceasta poate fi recoltata prin contact sexual utilizand un prezervativ special pentru investigatii de fertilitate.

Pacientul va primi informatii privind prelevarea si transportul probei la unitatea sanitara acreditata.

Se va mentiona in buletinul de analiza faptul ca proba a fost recoltata prin contact sexual cu ajutorul prezervativului.

 **2. Prepararea/procesarea probelor de sperma – IUI, FIV, ICSI**

 2.1 Considerente generale

*Scopul prepararii/procesarii probelor de sperma:*

* *eliminarea plasmei seminale, detritusului, spematozoizilor morti si a celorlalte celule,*
* *concentrarea spermatozoizilor cu motilitate progresiva si morfologie normala.*

Plasma seminala contine factori de decapacitare care impiedica capacitarea spermatozoizilor. Expunerea spermatozoizilor umani la plasma seminala pentru mai mult de 30 de minute dupa ejaculare, precum si contaminarea cu urme de plasma seminala a spermatozoizilor separati poate afecta capacitatea lor de a realiza reactia acrozomica *in vitro* si procesul de fertilizare.

Astfel, pentru utilizarea spermatozozilor in cadrul protocoalelor de lucru este necesara separarea acestora de plasma seminala, asigurandu-se o proba finala care sa contina un procent ridicat de spermatozoizi motili, cu morfologie normala, fara detritus, alte celule sau spermatozoizi morti.

Ca regula generala, se va lucra doar o proba de spermă, de la un singur pacient, intr-o zonă dedicată pentru prepararea/procesarea spermei. Toate consumabilele/produsele terapeutice anexe care vor veni in contact cu proba trebuie sa fie sterile, vor fi utilizate doar pentru manipularea acelei probe si se vor arunca imediat după folosire. Toate tuburile sau recipientele utilizate la prepararea/procesarea/procesarea unei probe vor fi etichetate cu datele pacientului, conform cu fisa de analiza. Orice transfer al materialului seminal intre recipientul de prelevare/tuburi va fi precedat de o verificare a datelor de pe etichete.

Persoana care realizeaza prepararea/procesarea/ probei este responsabila de identificarea corecta a recipientului cu proba, a tuburilor pentru preparare si a formularului de analiză a materialului seminal corespunzatoare pacientului.

2.2 Metode de preparare/procesare

Cele mai folosite metode utilizate pentru prepararea/procesarea probelor de sperma sunt:

1. Migrare (Swim-up)
2. Centrifugare in gradient de densitate
3. Spalare simpla

Alte metode:

* MACS (magnetic activating cell sorting) – selectarea celulelor prin activare magnetica – metoda permite indepartarea spermatozoizilor in curs de apoptoza, permitand recuperarea spermatozoizilor non-apoptotici pentru utilizare;
* Metode microfluidice – permit selectarea spermatozoizilor pe baza motilitatii lor si a altor proprietati fizice. In cazul acesta, se pot utiliza dispozitive disponibile comercial (Sperm Sorter Qualis®, Menicon, Kasugai, Japan; FERTILE, Zymot, DxNow Inc., Gaithersburg, MD, United States; Fertile Chip®, KOEK Biotechnology, Turkey).

Alegerea metodei depinde de calitatea probei, in timp ce tehnicile de migrare directa se utilizeaza in special pentru probele normale, in cazul probelor cu parametri modificati este preferata metoda de centrifugare in gradient de densitate.

2.2.1 Echipamente ncesare

* Centrifuga (swing-out, 250g-750g).
* Pipete serologice de diferite dimensiuni (1-10 ml).
* Tuburi de centrifugare cu fund conic.
* Incubator/placa incalzita 37°C
* Microscop cu contrast de faza, cu obiective 10X, 20X si 40X.
* Camera de numarare (hemocitometrul imbunatatit Neubauer, Makler)
* Lame, lamele (22 × 22 mm)
* Pipete automate 10-1000 μl, cu varfuri sterile corespunzatoare.
* Hota cu flux laminar (sau macar cabinet steril)

2.2.2 Medii - se recomanda ca mediile utilizate sa fie solutii saline suplimentate cu proteina si sa contina un buffer corespunzator conditiilor in care spermatozoizii vor fi procesati/utilizati, HEPES sau similar daca prepararea/procesarea/utilizarea se desfasoara la 37°C in aer atmosferic, respectiv buffer bicarbonat daca procedurile se defasoara in 5-7% CO2.

2.2.3 Migrare (Direct swim-up from semen)

Metoda presupune separarea spermatozoizilor pe baza capacitatii lor de a migra din plasma seminala in mediul de cultura si se realizeaza prin pipetarea probei de sperma sub mediu (sau mediul de cultura este pipetat peste proba), fara a se amesteca. Apoi se incubeaza intre 15 si 60 minute, la 37°C, astfel incat spermatozoizii mobili sa migreze in mediu. Dupa migrare si spalare, proba poate fi utilizata in functie de necesitate.

2.2.4 Centrifugare in gradient de densitate

Metoda presupune separarea celulelor pe baza densitatii lor, prin centrifugare intr-un gradient de densitate discontinuu.

Spermatozoizii umani maturi si normali morfologic au o densitate mai mare decat cea a spermatozoizilor imaturi sau morfologic anormali, respectiv cea a gradientilor utilizati. Astfel, doar spermatozoizii maturi si normali morfologic vor putea penetra stratul inferior al gradientului utilizat si se vor depozita la fundul tubului de centrifugare.

Gradientii utilizati sunt in general constituiti din doua straturi suprapuse de solutii de concentratii diferite, de ex. 40%/80%, 45%/90%. Gradientul se obtine prin pipetarea celor doua solutii intr-un tub de centrifugare fara a se amesteca intre ele. Pipetarea stratului de 80% sub stratul de 40% (pipetat anterior in tub) va rezulta in formarea unei interfete mult mai bine definita intre cele doua straturi. In stratul de 40%, respectiv la interfata dintre cele doua straturi 40% si 80%, se vor selecta in timpul centrifugarii spermatozoizii imotili/morti, reziduurile, celulele epiteliale, leucocitele, bacteriile si spermatozoizii imaturi.

Exemplu de procesare in gradienti :folosind o pipeta sterilă, se distribuie un strat de 1-2 mL de sperma pe un gradient (ex. 40% (1,0-2,0 mL)/80% (1,0-2,0 mL)) deja pregatit si etichetat. Se centrifugheaza 10-20 minute la 300g. Se recomanda utilizarea unei centrifugi cu rotor ”swing-out”, respectiv tuburi de centrifugare cu fund conic, pentru ca astfel se va obtine un depozit mai bine definit si mai usor de recuperat.

Dupa centrifugare se indeparteaza straturile superioare cu ajutorul unei pipete Pasteur de sticla pana la stratul de 80%, respectiv, plasma seminala, stratul de 40% si interfata dintre straturile de 40% si 80%, in tub ramanand doar stratul de 80% si depozitul rezultat.

Cu o pipetă Pasteur curata se ia depozitul care conţine spermatozoizii motili si se transfera într-un tub conic etichetat cu detaliile pacientului şi in care se gasesc 3-5 mL mediu de spalare.

Daca dupa prima centrifugare depozitul este foarte mic se poate colecta un volum mai mare din stratul de 80% (0,5-0,7 ml) pentru recuperarea mai multor spermatozoizi. In acest caz se dubleaza si volumul mediului de spalare pentru a dilua si indeparta stratul de 80%.

Se centrifugheaza 10 minute la 500g. Se indeparteaza supernatantul pana aproape de depozit, in functie de utilizare.

In cazul probelor cu mobilitate si/sau concentratie scazuta se poate imbunatati calitatea probei dupa preparare prin: modificarea concentratiei straturilor gradientului modificarea volumului straturilor (1 ml din fiecare), utilizarea mai multor gradienti, concentrarea probei inainte de plasarea pe gradient prin spalare si resuspensie, spalarea si resuspensia straturilor superioare care in mod normal sunt indepartate.

2.2.5 Spalare simpla

Este utilizata pentru probele de calitate buna si consta in diluarea probei cu mediu de exemplu: (1:2), urmata de centrifugare (300-500g, 5-10 min). Apoi se indeparteaza supernatantul, astfel incat sa se elimine cat mai mult din plasma seminala. Peletul rezultat se resuspenda in mediu curat si se centrifugheaza 3-5 minute la 300-500g. Se indeparteaza din nou supernatantul, iar diluarea finala se va realiza in functie de scopul probei.

2.2.6 Utilizarea probelor de sperma preparate

2.2.6.1 IUI

Dupa a II-a centrifugare, se indeparteaza supernatantul si se resuspenda depozitul intr-un mediu care sa previna capacitarea prematura a spermatozoizilor. Proba este analizata din punct de vedere al motilitatii si concentratiei spermatozoizilor si este pregatita pentru incarcarea in cateterul de inseminare.

Se poate utiliza si un mediu cu buffer bicarbonat si incubare in incubator cu CO2, daca inseminarea va avea loc relativ repede dupa realizarea prepararii.

2.2.6.2 FIV

Dupa a II-a centrifugare, in functie de calitatea probei si marimea depozitului rezultat in urma prepararii se poate opta pentru una dintre urmatoarele metode:

* se dilueaza depozitul in mediu cu buffer bicarbonat si se omogenizeaza, sau
* se realizeaza inca o separare prin ”swim-up” pentru a se creste procentul de spermatozoizi motili din proba finala.

Proba se incubeaza in incubator cu CO2 pentru 30-90 min inainte de inseminarea ovocitelor. Apoi este analizata din punct de vedere al motilitatii si concentratiei spermatozoizilor.

Inseminarea FIV este efectuată cu o concentratie de spermatozoizi care variaza intre 100.000/mL si 500.000/mL (0,1-0,5x106/mL).

Concentrația de inseminare poate varia în funcție de concentratia spermatozoizilor motili progresivi, morfologia spermatozoizilor și antecedentele anterioare. Informații de la cicluri anterioare ale fiecărui cuplu ar trebui folosite pentru a decide cu privire la o concentrație corespunzătoare.

Dacă o incidență anormal de mare de polispermie a fost observata în cicluri FIV anterioare, concentrația de inseminare poate fi redusă.

2.2.6.3 ICSI

Dupa a II-a centrifugare, depozitul poate fi diluat cu mediu fara buffer bicarbonat, deoarece capacitarea spermatozoizilor este irelevanta in cazul procedurii de ICSI. Proba se pastreaza la temperatura camerei pana la injectare.

1. **Alte situatii**
	1. **Utilizarea probelor de sperma obtinute de la pacienti cu ejaculare retrograda**

Pentru pacientii cu ejaculare retrograda, spermatozoizii pot fi recuperati din urina post-ejaculare. Recuperarea cu succes a spermatozoizilor viabili depinde de reglarea pH-ului urinii la momentul ejacularii, prin ingerarea de bicarbonat de sodiu.

La momentul recoltarii, pacientul va urina fara a goli complet vezica. Apoi, va produce o proba de sperma intr-un recipient steril și va urina din nou într-un alt recipient steril (se poate utiliza un mic volum de mediu de cultura, pentru alcalinizarea urinii).

Atat ejaculatul (daca exista), cat si urina, vor fi analizate pentru a se detecta prezenta spermatozoizilor. Urina va fi concentrata prin centrifugare de exemplu: (500g, 8-10 minute).

Ejaculatul si urina concentrata se prepara ulterior, de preferat prin centrifugare in gradient de densitate și se pregătesc pentru IUI , FIV sau ICSI, în funcție de procedura propusa.

* 1. **Preparea spermatozoizilor recoltati chirurgical**
* ***PESA –*** *prelevarea de spermatozoizi prin aspiratie percutanata din epididim*
* ***MESE –*** *prelevarea de spermatozoizi prin tehnica microchirurgicala*
* ***TESA –*** *prelevarea de spermatozoizi prin aspiratie testiculara*
* ***TESE –*** *prelevarea de spermatozoizi prin extractie testiculara*
* ***microTESE –*** *prelevarea de spermatozozizi prin extractie testiculara asistata microscopic*

**3.2.1 Prepararea/procesarea spermatozoizilor recuperati de la nivel epididimal**

Separarea spermatozoizilor din fluidul recoltat de la nivel epididimal, prin diferite metode (PESA sau MESE), se poate realiza prefential prin utilizarea centrifugarii in gradient de densitate. In cazul in care probele contin un numar mic de spermatozoizi, se poate realiza si o spalare simpla.

**3.2.2 Preparea spermatozoizilor recuperati de la nivel testicular**

Tubii seminiferi recuperati de la nivel testicular ( TESA, TESE sau microTESE) trebuie macerati astfel incat sa se elibereze si sa se recupereze spermatozizii. Incubarea ulterioara a spermatozoizilor poate duce la recuperarea motilitatii, acest lucru poate fi observat in 3-4 ore sau chiar dupa incubare peste noapte.

Tesutul testicular se colecteaza în petri-uri cu mediu preincalzit la 37°C, cu buffer HEPES sau MOPS, si se mentine intre 20 si 37°C.

Se macereaza fragmentele testiculare cu ajutorul unor foarfece de disectie sau cu ajutorul unor seringi cu ac atasat si indoit la 90° astfel incat sa poata fi utilizate la presarea tubulilor pe fundul petri-ului si eliberarea continutului acestora in mediu.

Amestecul rezultat poate fi transferat in tuburi de centrifugare, diluat cu mediu de cultura curat si centrifugat la 300g, 8-10 minute. Supernatantul este indepartat iar depozitul rezultat este resuspendat in 0,5 mL mediu proaspat. Se analizeaza proba si se estimeaza motilitatea si numarul de spermatozoizi.

Proba rezultata este apoi utilizata in functie de necesitati, astfel:

- spermatozoizii obtinuti pot fi congelati pentru utilizare ulterioara, mai ale daca partenera nu a fost pregatita concomitent pentru prelevarea ovocitelor;

- spermatozoizii pot fi folositi direct pentru injectare, transferandu-se o picatura de suspensie de spermatozoizi intr-un petri pregatit in prealabil;

Maceratele testiculare pot fi incubate pana la 48-72h la 37°C, in incubator cu CO2, pentru o eventuala imbunatatire a motilitatii spermatozoizilor si apoi utilizate/congelate.

* 1. **Prepararea/procesarea probelor de sperma contaminate**

 Probele provenite de la pacientii seropozitivi vor fi manipulate separat, atat spatial cat si temporal, fata de probele altor pacienti. Se vor utiliza doar materiale de unica folosinta, chiar si echipamente separate, daca este posibil. Se va evita formarea aerosolilor in timpul pipetarilor si centrifugarilor. Se va purta echipament de protectie corepunzator. La finalul procedurilor, toate suprafetele vor fi decontaminate.

Pentru preparea probelor de sperma de la pacientii HBV-pozitivi se vor utiliza metodele uzuale, niciuna dintre metodele actuale de preparare nu poate selecta spermatozoizi necontaminati cu ADN viral HBV.

Preparea probelor de sperma provenite de la pacienti HCV-seropozitiviinclude separarea spermatozoizilor de plasma seminala si leucocite prin centrifugarea in gradient de densitate discontinuu, urmata de o separare a spermatozoizilor mobili prin „swim-up” si apoi spalare.

Nu este recomandata detectarea prin PCR a incarcaturii virale din proba finala pentru probele provenite de la pacienti HBV/HCV-pozitivi.

Pentru prepararea/procesarea probelor de sperma de la pacienti HIV-pozitivi se recomanda centrifugarea intr-un gradient de densitate discontinuu, urmata de doua etape de spalare si apoi „swim-up”.

Indiferent de metoda de preparare folosita, probele provenite de la pacienti HIV-pozitivi ar trebui testate dupa preparare prin RT-PCR si doar probele in care nu se detecteaza prezenta virusului vor fi utilizate pentru proceduri RUAM.

Pentru pacientii infectati cu virusul ZIKA - metodele actuale de preparare a probelor nu pot indeparta complet virusul din sperma, de aceea se recomanda amanarea procedurilor RUAM pentru 3 luni dupa diagnostic sau dupa intoarcerea dintr-o zona cu prevalenta mare.

Contaminarea cu HPV – niciuna dintre metodele actuale de preparare nu poate indeparta complet virusul din probele de sperma infectate, se vor utiliza metodele uzuale de preparare sau, se poate recomanda amanarea procedurii, fiind o infectie tranzitorie.

Contaminarea cu HTLV I/II – se vor utiliza metodele uzuale de preparare, la momentil actual nu se cunosc tehnici de preventie/reducere a transmiterii HTLV I/II in cursul procedurilor RUAM.

**CAPITOLUL 9. INSEMINAREA OVOCITELOR**

Ovocitele pot fi inseminate prin fertilizare in vitro conventionala sau prin ICSI. Timpul la care se efectueaza inseminarea sau injectarea ovocitelor se decide in functie de numarul de ore care au trecut de la administrarea trigger-ului ovulatiei si / sau prelevarea ovocitelor; se are in vedere, de asemenea, faptul ca verificarea fertilizarii trebuie efectuata 16 -18 ore mai tarziu.

 Banca de celule si tesuturi reproductive trebuie sa aiba criterii stricte care sa defineasca conditiile de efectuare a fertilizarii in vitro conventionale sau procedurii de ICSI. Daca tratamentul pacientului este schimbat de la planul original, pacientului trebuie sa i se dea un consimtamant adecvat de completat, iar argumentul pentru care se recomanda modificarea, sa fie notat in documentele pacientului. Aceste consimtaminte trebuie completate inainte ca procedura de administrare a anestezicului pentru ca prelevarea de ovocite sa aiba loc.

 Este obligatorie dubla verificare ( de un alt embriolog pe langa cel care efectueaza procedura sau in sistem automatizat) a identificarii probelor biologice si a pacientilor / donatorilor carora le apartin, la toate momentele critice in cursul procesului clinic si de testare, procesare sau stocare. Protocoalele de dubla verificare trebuie urmate la toti pasii important ai procedurilor din banxa de celule si tesuturi reproductive.

 Indicatorii de performanta ( indicatorii de calitate) precum si valorile lor de referinta, stabiliti de catre banca de celule si tesuturi pentru procedura de inseminare a ovocitelor, trebuie evaluati si analizati conform unei rutine anterior stabilite.( a se vedea capitolul de managementul calitatii)

**Fertilizarea in vitro conventionala (standard)**

 Originea probei de sperma utilizata trebuie notata in documente ( ejaculat, crioprezervata, donata, etc).

 Se va nota in documentele pacientilor timpul la care s-a efectuat inseminarea si concentratia probei de sperma utilizata.

Numarul spermatozoizilor mobili progresivi utilizati pentru inseminare trebuie sa fie suficient pentru optimizarea sanselor unei fertilizari corecte, fara compromiterea dezvoltarii embrionilor ( concentratia spermatozoizilor mobili intre 0,1 si 0,5 x 106 /ml).

 Suspensia finala cu spermatozoizi trebuie sa fie intr-un mediu compatibil culturii ovocitelor. Mediul de fertilizare trebuie sa contina glucoza pentru sustinerea functiei corecte a spermatozoizilor.

 Co-incubarea complexelor ovocit-cumulus cu spermatozoizii se face de obicei peste noapte, insa poate fi suficienta si o perioada mai scurta de timp.

1. Echipamente necesare:
* stereomicroscop cu placa incalzita;
* hota cu flux laminar cu placa incalzita incorporate;
* incubator cu concentratia de CO2 potrivita, eventual cu concentratie mica de O2(5-7%);
* pipete si varfuri potrivite pentru pipetarea spermei(1-10 µl);
1. manusi nepudrate;fisa de trasabilitate.
2. De pregatit in ziua anterioara inseminarii:

Placute pentru cultivarea complexelor ovocit-cumulus (COC) cu mediu de cultura universal pentru fertilizare in vitro, cu sau fara ulei gazat

1. De pregatit in ziua inseminarii:
* Izolarea COC in urma punctiei ovariene si plasarea lor in placuta de cultura a ovocitelor iscriptionata cu numele pacientei;
* Pentru ICSI 8-10 COC pot fi plasate intr-un godeu cu 400-600 µl mediu acoperit cu ulei preechilibrat (al unei placute cu 4 godeuri);
* Pentru inseminare conventionala pana la 4 COC pot fi plasate intr-un godeu cu 400-600 µl mediu sau 1 COC per picatura de 50 µl mediu, acoperite cu ulei preechilibrat;
* Prepararea spermei pentru inseminare (cum a fost descrisa);
* Prepararea unei placute pentru verificarea fertilizarii daca este necesara ( utilizarea de mediu standard sau mediu cu HEPES / MOPS, in functie de necesitatile protocolului de lucru);
* Prepararea unei placute pentru cultura ulterioara a ovocitelor fertilizate ( ce va fi folosita in ziua urmatoare) si plasarea acestei placute intr-un incubator gazat.
1. Inseminarea ovocitelor cu spermatozoizii:
* Inseminarea este cel mai bine de efectuat la 3-4 ore dupa izolarea COC, tinandu-se cont de ora administrarii trigger-ului ovulatiei;
* Se recomanda purtarea de manusi nepudrate;
* Plasarea tubului cu sperma preparata intr-un support pentru tuburi in hota cu flux laminar;
* Scoaterea placutei de cultura cu ovocitele din incubator;
* Identificarea numelui pacientei pe tubul cu sperma preparata si placuta de cultura cu ovocitele de catre doi embriologi.
1. Adaugarea spermei la ovocite:
* Inseminarea in godeu – adaugarea a 50000 -100000 spermatozoizi mobili per godeu care contine 400-600 µl mediu si maxim 4 COC, si pipetarea acestora usoara, in vederea omogenizarii; volumul total de sperma preparata adaugat per godeu nu trebuie sa depaseasca 25 µl.
* Inseminarea in picatura – adaugarea a 25000 spermatozoizi mobili per ovocit sau 100000 spermatozoizi/ml la o picatura care continue 50 µl mediu si 1 COC; volumul total de sperma preparata adaugat nu trebuie sa depaseasca 5 µl.
* Trebuie sa se lucreze rapid,cu  verificarea motilitatii si a distributiei la scurt timp dupa adaugarea spermei, si sa se plaseze placuta inapoi in incubator imediat dupa inseminare;
* In cazul existentei mai multor placute cu ovocite – se vor scoate si insemina placutele pe rand, una dupa alta;
Documentarea inseminarii in dosarul pacientilor.
1. Denudarea pentru verificarea fertilizarii:
* Inaintea denudarii se va verifica procentul spermatozoizilor mobili in placa de fertilizare;
* Se va inlatura bland cumulusul restant cu un varf de denudare mare, de 170 µl;
* Se va nota daca denudarea este dificila – celulele cumulusului sunt prea ferm atasate;
* Se vor plasa ovocitele denudate intr-o picatura separata sau intr-o placuta de verificare a fertilizarii ( facuta cu mediu de cultura normal daca procedura dureaza mai putin de 2-3 minute / sau cu mediu cu HEPES/MOPS daca procedura necesita mai mult timp)
* Verificarea numarului de pronuclei la un microscop inversat utilizand obiectivele de 20x si 40x;
* In cazul inseminarii scurte (3-5 ore) se va verifica prezenta celui de-al doilea globul polar si se va reverifica a doua zi pentru fertilizarea corecta / prezenta a doi pronuclei la 16-18 ore postinseminare;
* Se vor muta ovocitele fertilizate intr-o placuta de cultura pentru cultivarea in continuare a embrionilor;
* Plasarea placutei in incubatorul gazat;
* Documentarea fertilizarii in dosarul pacientilor’

**ICSI**

DEFINITII

ICSI apartine microtehnicilor si este inserarea mecanica a spermatozoidului in citoplasma ovocitului.

DENUDAREA OVOCITELOR este inlaturarea complexului celular – cumulus si corona radiata, din jurul ovocitului.

Procedura de ICSI este realizata pentru obtinerea fertilizarii la cuplurile ai caror parteneri au spermatozoizii probabil incapabili sa penetreze zona pellucida a ovocitelor.

Metoda : sub microscop, un singur spermatozoid este aspirat intr-o micropipeta de sticla cu varf ascutit, montat intr-un micromanipulator hidraulic. O a doua micropipeta este utilizata pentru ancorarea ( sustinerea) ovocitului. Acul de injectie penetreaza zona pellucida ( invelisul glicoproteic gros extern al ovocitului).

Tehnica ICSI a demonstrat avantaje nete din punct de vedere al ratei fertilizarii si al ratei sarcinilor fata de tehnicile anterioare ce utilizau microinjectie.

DESCRIEREA PROCEDURII

 Se recomanda notarea orelor de incepere si terminare a procedurii, precum si embriologul care efectueaza procedura.

 Intervalul de timp in care se desfasoara selectarea spermatozoidului, imobilizarea si injectarea acestuia trebuie redus la minim. Numarul ovocitelor transferate in placa de injectare trebuie corelat cu calitatea probei de sperma si indemanarea embriologului.

 Trebuie sa existe un protocol de denudare a ovocitelor ( inlaturarea celulelor cumulusului) inaintea procedurii de ICSI. Se recomanda o combinare a utilizarii enzimelor ( hialuronidaza, cumulaza) impreuna cu denudarea mecanica, cu atentie pentru a nu leza ovocitele in urma procesului.

In timpul procedurii de ICSI urmatoarele aspect sunt importante:

* Numai ovocitele mature sunt apte a fi injectate;
* Morfologia ovocitelor trebuie mentionata in documente. Ovocitele gigante si ovocitele cu globul polar foarte mare nu se recomanda a fi injectate;
* Se recomanda selectarea de spermatozoizi viabili, mobili, cu morfologie normala;
Ruperea membranei flagelului spermatozoidului trebuie sa fie posterioara piesei intermediare si realizata inaintea injectarii spermatozoidului in ovocit;
* Globulul polar trebuie sa fie departe de locul injectarii spermatozoidului;
* Inaintea injectarii spermatozoidului trebuie rupta ovolema;
* In timpul injectarii trebuie mentinute o temperatura si un pH adecvate in mediul in care se afla gametii;
* Dupa injectare, ovocitele trebuie spalate inaintea cultivarii;
* Este obligatorie dubla verificare si de catre un alt embriolog a gametilor inainte de injectare ( martoringul)
* Cand nu exista spermatozoizi mobili, pentru selectarea spermatozoizilor trebuie utilizat un protocol de verificare a viabilitatii acestora;
* Daca nu sunt disponibili spermatozoizi viabili in ejaculat, trebuie luata in considerare optiunea utilizarii spermatozoizilor din biopsie testiculara;
* Ovocitele care nu s-au fertilizat prin inseminare conventionala sau ICSI nu se recomanda sa fie re-inseminate.
1. Echipamente necesare:
* Microscop inversat cu micromanipulatoare ( 3 dimensiuni, hydraulic sau electric) si placa incalzita ( optional – microscopul inversat sub flux laminar si plasat pe o masa antivibratii);
* Incubator cu concentratia potrivita de CO2 ( optional – atmosfera scazuta in O2, 5-7%);
* Placaute de cultura celulara preincalzite – placa incalzita/ incubator 370C;
* Echipament de pipetare pentru manipularea ovocitelor si spermatozoizilor / stripper + varfuri de 135 µl, 170 µl, 20 µl, 100 µl; pipete si varfuri;
* Micropipete holding si microinjectie;
* Fise de documentare;
* Optional: manusi nepudrate;
1. De pregatit in ziua anterioara ICSI:
* PVP sau produse alternative care sa incetineasca spermatozoizii;
* Mediu pentru injectare, cu sau fara ulei gazat;
* Mediu pentru cultivarea embrionilor in vederea cultivarii ovocitelor dupa injectare
1. De pregatit in ziua efectuarii ICSI:
* Preincalzirea tuturor device-urilor de incalzire la temperatura potrivita; Optional – pornirea fluxului laminar in hota in vederea stabilizarii fluxului de aer si a evitarii turbulentelor;
* Asigurarea faptului ca toate materialele care vin in contact cu ovocitele si spermatozoizii sunt incalzite corespunzator - la o temperature care sa asigure 37 0C in  mediul de cultura;
* Pregatirea placutei de ICSI;
* Pregatirea placutei de cultura a embrionilor. ( optional – spalarea tuturor consumabilelor din plastic cu mediu dedicat de spalare /sau mediu de cultura, inaintea utilizarii lor pentru gameti.
1. Pregatirea ovocitelor pentru ICSI:
* Cand se inlatura celulele cumulusului  de pe ovocite, concentratia hialuronidazei sau a cumulazei si timpul de expunere al ovocitelor trebuie sa fie minime
* De asemenea, in vederea prevenirii lezarii ovocitelor, trebuie utilizate pipete cu lumen adecvat si evitarea unei pipetari viguroase;
* Dupa denudare ovocitele trebuie spalate in mediul de cultura, pentru inlaturarea urmelor de hialuronidaza complet;
* Gradul de maturare al ovocitelor trebuie observant la microscop si notat in documentele medicale
* Dovezile curente nu sugereaza ca denudarea ovocitelor trebuie realizata la un timp specific intre prelevarea ovocitelor si ICSI. Insa, deoarece ovocitele denudate sunt mai vulnerabile la modificarile de pH, momentul denudarii trebuie sa fie apropiat de momentul injectarii;
* Trebuie inregistrata in documente originea probei de sperma utilizata pentru injectare ( ejaculat, crioprezervata, obtinuta chirurgical, de donator, etc)
1. Selectarea spermatozoizilor si imobilizarea:
* Este optionala purtarea manusilor nepudrate;
* Este obligatorie identificarea materialului provenit de la pacient cu numele pacientului si data nasterii, in acord cu cele mai sigure proceduri;
* Se plaseaza tubul cu sperma preparata in suport si se transfera cateva picaturi de supernatant in placuta de icsi. Se ajusteaza volumul utilizat la concentratia de spermatozoizi mobili pentru evitarea oricarei intarzieri in gasirea spermatozoizilor viabili. Mixarea cu solutia vascoasa de incetinire a spermatozoizilor;
* Plasarea unuia sau mai multor ovocite mature denudate in picaturi mici individuale de mediu de injectare, situate pe partea opusa a placutei de ICSI. Acoperirrea cu ulei negazat preincalzit. O atentie deosebita trebuie pentru asigurarea unui flux de lucru rapid si sigur, pentru mentinerea temperaturii de 370 C in intreaga placuta, in principal datorita susceptibilitatii  mari a ovocitelor la temperatura suboptimala si variatiile atmosferice, conditii ce pot conduce rapid la dezorganizarea fusului meiotic. In functie de concentratia spermatozoizilor, selectia acestora poate necesita intervale diferite de timp, astfel ca numarul de ovocite plasate in placuta de ICSI trebuie adaptat.
* Se vor selecta spermatozoizi viabili pe baza criteriilor de mobilitate si morfologie la o magnificatie de 400 ori;
* Optional se poate utiliza o solutie de hialuronat pentru selectarea de spermatozoizi maturi (PICSI);
* Optional se poate utiliza o magnificatie foarte mare pentru selectarea spermatozoizilor cei mai buni din punct de vedere al morfologiei, si cu cele mai putine vacuole la nivelul citoplasmei capului (IMSI);
* Optional se poate utiliza testul HOS / laserului / agentilor de activare ( Sperm Mobil) pentru identificarea spermatozoizilor viabili, in situatia in care sunt disponibili numai spermatozoizi imobili;
* Utilizand varful pipetei de microinjectie perpendicular pe axul spermatozoidului, se imobilizeaza ferm spermatozoidul selectat prin presiune mecanica franca asupra flagellumului, permitand permeabilizarea membranei.
* Se va evita atingerea / lezarea centriolului prin apropierea de piesa intermediara, incercand sa aplicati presiunea la mijlocul flagellumului.
* Daca celula este distrusa ( compromisa), cu capul si coada separate, ea nu va fi utilizata pentru injectare,
* Se va aspira usor spermatozoidul de la coada in pipeta de microinjectie, cu plasarea capului spermatozoidului foarte aproape de varful pipetei de microinjectie, Optional se poate aspira spermatozoidul intai cu capul. Studiile au aratat o rata de fertilizare similara aspirarii spermatozoidului de la coada.
1. Injectia intracitoplasmatica ( ICSI )
* Utilizand forta de aspirare a pipetei holding, se prinde si fixeaza ovocitul cu globulul polar localizat la ora 6.00 sau 12.00. Optional se poate folosi un system optic pentru vizualizarea fusului meiotic;
* Ideal, ovocitul trebuie sa atinga fundul placutei de ICSI. Trebuie asigurata o forta de aspiratie asupra ovocitului suficienta, pentru evitarea posibilelor miscari involuntare ale acestuia in timpul injectarii spermatozoidului;
* Se realizeaza focalizarea imaginii asupra circumferintei ovolemei si apropierea pipetei de microinjectie, cu asigurarea faptului ca ambele pipete, spermatozoidul si ovolema sa fie in acelasi plan focal;
* Se impinge constant, foarte usor si perpendicular pipeta de microinjectie prin zona pellucida si continuarea acestei miscari pana la contactul cu ovolema.Ovolema se va deforma ( va forma un unghi) datorita elasticitatii sale, pana cand se va rupe brusc, cand pipeta va ajunge aproximativ la centrul celulei, permitand pipetei apoi sa intre intr-adevar in citoplasma, prin continuarea miscarii.
* Dupa ruperea ovolemei, o cantitate mica din continutul citoplasmei poate eventual sa intre in pipeta de microinjectie, si trebuie foarte usor sa fie plasata inapoi, in citoplasma. Aceasta aspirare urmata de ejectarea unui continut mic citoplasmatic este benefica procesului de fertilizare.
* Se va muta varful pipetei de microinjectie cu evitarea atingerii partii opuse a ovolemei;
* Usor, se va injecta spermatozoidul din pipeta de microinjectie, cu asigurarea faptului ca acesta a iesit cu totul din pipeta si este plasat in citoplasma ovocitului.
* Se va retrage pipeta de microinjectie din citoplasma ovocitului foarte usor, asigurandu-ne ca spermatozoidul ramane in citoplasma si nu este antrenat de aceasta miscare, sau sa ramana lipit de pipeta de microinjectie.
* Ovocitul trebuie sa nu se miste pe parcursul intregii proceduri, exceptand situatia in care planul focal nu este cel correct si este necesara corectarea acestui fapt.
* Se elibereaza ovocitul din pipeta de holding;
* Utilizand pipete conventionale cu varfuri, ovocitele vor fi mutate in placuta de cultivare a embrionilor, fie in picaturi individuale, fie grupate in godeuri;
* Se verifica inca o data numele pacientului si se plaseaza placuta de cultura inapoi in incubatorul gazat. Optional se poate plasa intr-un incubator nou.
* Se vor repeta setarile si procedurile daca alte ovocite sunt de injectat. Optional, cand o serie de ovocite sunt injectate, ovocitele noi din aceeasi cohorta pot fi plasate in aceeasi placuta, utilizand aceleasi picaturi cu mediu pentru injectarea ovocitelor si aceeasi suspensie cu spermatozoizi. Oricum, varianta aceasta trebuie luata in considerare daca procesul este sufficient de rapid efectuat si exista controlul temperaturii si al conditiilor atmosfertice, care sa permita stabilitatea mediului in care sunt plasati gametii, pe tot parcursul procesului. Acoperirea picaturilor in placuta cu ulei asigura stabilitatea temperarurii si a atmosferei in mediul de cultura. Alternativa este pregatirea mai multor placute pentru ICSI, in vederea scurtarii expunerii ovocitelor la conditii suboptimale, cat timp sunt in afara incubatorului.
* Odata ce procedura este completa, se vor curata microscopul si aria de lucru cu un agent embriotestat, nonalcoolic.
* Pregatirea pentru urmatorul ICSI
1. Dubla verificare
* Inseminarea ovocitelor sau injectarea acestora se fac in prezenta unui martor ( alt embriolog /personal auxiliar sau sistem automat), care verifica , concordanta datelor notate pe recipientele cu ovocite si spermatozoizi; pentru a nu se produce amestecarea gametilor altfel decat in cuplu.
* Fiecare procedura de reproducere asistata umana este insotita de completarea fiselor cu informatii legate de fiecare etapa a procedurii, de la prelevarea gametilor, pana la embriotransfer si stocare. Fisele respective sunt indosariate si stocate in arhiva unitatii.Ele se completeaza si in format electronic si se arhiveaza pe microfilme, pentru a putea fi pastrate o perioada de 30 ani.

DOMENIU DE APLICARE

 Opinia comitetului de practica al ASRM in anul 2020, asupra altor indicatii ale procedurii de ICSI decat pentru factorul masculin.

Procedura ICSI ( injectarea intracitoplasmatica a spermatozoidului) a fost introdusa in 1992 pentru imbunatatirea fertilizarii la cuplurile cu infertilitate cauzata de factorul masculin si la cuplurile cu esec al fertilizarii la o procedura anterioara de fertilizare in vitro fara anomalii detectabile ale probei de sperma.

De atunci, utilizarea procedurii de ICSI in cazul pacientilor cu parametrii probei de sperma normali sau borderline, a devenit comuna. Studiile efectuate au demonstrat faptul ca utilizarea in crestere a procedurii de ICSI in cazul infertilitatilor de cauza non-masculina nu a dus la cresterea ratelor de nasteri ( nou nascuti vii). La cuplurile cu infertilitate de cauza non-masculina au fost demonstrate rate cumulative de nasteri similare cand au fost comparate procedurile de ICSI si fertilizare in vitro conventionala, ca mod de obtinere al embrionilor.

Indicatiile propuse pentru utilizarea procedurii de ICSI in situatiile in care nu se identifica un factor masculin includ:

1. Infertilitatea de cauza neexplicata;
2. Ovocitele de calitate slaba;
3. Numarul de ovocite scazut ( rezerva ovariana mica) ;
4. Varsta materna avansata ;
5. Istoric de esec al fertilizarii la o procedura anterioara cu inseminare conventionala ;
6. Testare genetica preimplantationala ( PGT) ;
7. Fertilizarea ovocitelor dupa maturare in vitro ( IVM);
8. Fertilizarea ovocitelor crioprezervate;
9. Justificarea pentru toate aceste indicatii ( cu exceptia PGT) este evitarea esecului de fertilizare. Probabilitatea esecului de fertilizare trebuie pusa in balanta cu rationament : riscurile potentiale ale procedurii si costurile aferente
10. **ICSI pentru infertilitatea de cauza neexplicata** – rationament : ar putea depasi potentiale bariere ale fertilizarii care determina infertilitatea fara o cauza evidenta. Utilizarea ICSI pentru infertilitatea de cauza neexplicata ( fara asociere de factor masculin) a fost asociata cu o rata a fertilizarii crescuta de unele studii, fata de inseminarea conventionala. Oricum, nu s-a evidentiat o imbunatatire a ratei de sarcina.
11. **ICSI in cazul ovocitelor de calitate mai slaba** = ovocite anormale morfologic ( cu anomalii fie nucleare, citoplasmatice sau ale zonei pellucida) si parametrii de sperma normali. Nu sunt studii care sa justifice imbunatatirea ratei de nasteri prin utilizarea ICSI in cazul ovocitelor de calitate slaba, si parametrii normali ai probei de sperma.
12. **ICSI in cazul unui numar redus de ovocite (≤ 6)** – rationament : cresterea numarului de embrioni obtinuti fata de utilizarea inseminarii conventionale. ICSi in cazul unei rezerve ovariene scazute nu imbunatateste rata fertilizarii, numarul si calitatea embrionilor, nici rata de nasteri.
13. **ICSI pentru varsta materna avansata** – rationament : ovocitele cu varsta avansata au defecte ale zonei pellucida si citoplasmei, care pot reduce rata fertilizarii prin inseminare conventionala. ICSI pentru varsta materna avansata nu imbunatateste rata de nasteri.
14. **ICSI in cazul unui esec anterior de fertilizare la o procedura cu inseminare conventionala, cu parametrii normali ai probei de sperma** – ICSI poate creste rata de fertilizare atunci cand anterior s-a obtinut o rata mai scazuta de fertilizare decat cea asteptata, prin inseminare conventionala.
15. **ICSI pentru PGT** – rationament : asigurarea fertilizarii monospermice si eliminarea posibilitatii de contaminare a probelor biopsiate cu ADN provenit de la spermatozoizii atasati de zona pellucida, in cazul utilizarii ca metoda moleculara a PCR. Cu introducerea tehnicii noi moleculare NGS, acceasta preocupare nu este absoluta. ICSI pentru PGT in absenta infertilitatii data de factorul masculin trebuie limitata la cazurile in care contaminarea probelor biopsiate cu ADN provenit de la spermatozoizii atasati zonei pellucida poate afecta acuratetea rezultatelor.
16. **ICSI in cazul IVM –** rationament : din cauza potentialei indurari a zonei pellucida in timpul procesului de maturare in vitro al ovocitelor imature, ICSI a fost desemnata ca metoda preferata pentru fertilizare. ICSI pare sa creasca rata de fertilizare in cazul ovocitelor maturate in vitro (IVM), desi ratele de implantare si sarcina clinica par sa fie mai mari in cazulfolosirii inseminarii conventionale la ovocitele obtinute prin IVM. Se cere prudenta in interpretarea acestor data din cauza lipsei datelor referitoare la rata de nasteri.
17. **ICSI pentru ovocitele crioprezervate –** rationament: crioprezervarea ovocitelor implica, in general, inlaturarea celulelor cumulusului inaintea crioprezervarii. Acest fapt poate conduce la modificari ale zonei pellucida ce pot reduce rata fertilizarii cu inseminare conventionala. ICSI la ovocitele crioprezervate este metoda de electie pentru obtinerea fertilizarii, desi exista date limitate in sprijinul acestei proceduri.
18. **ICSI ca metoda de rutina a fertilizarii ( indiferent de etiologia infertilitatii) –** rationament : reducerea probabilitatii esecului fertilizarii si cresterea potentiala a numarului de embrioni. In cazurile fara infertilitate de cauza masculina sau istoric de esec al fertilizarii, folosirea procedurii de ICSI de rutina, pe toate ovocitele, nu este sustinuta de dovezile disponibile. ICSI necesita experienta de lucru suplimentara, resurse, efort si timp. Astfel, extinderea utilizarii procedurii de ICSI fata de indicatii creste complexitatea si costurile procedurilor de reproducere asistata.

**Concluzii :**

Procedura ICSi in lipsa infertilitatii de cauza masculina poate fi benefica unui segment selectat de pacienti, ce fac fertilizare in vitro cu testare genetica preimplantatorie a embrionilor pentru boli monogenice ( PGT-M) si in cazul ovocitelor crioprezervate anterior.

 Costurile suplimentare presupuse de ICSI pentru indicatiile ce nu vizeaza factorul masculin, in situatiile in care nu sunt date suficiente care sa argumenteze rezultate mai bune in urma utilizarii ICSI fata de inseminarea conventionala, trebuie luate in considerare,

CRITERII DE COMPETENTA IN ICSI

Criteriile de competenta in ICSI acceptate general includ o rata de degenerare a ovocitelor mai mica de 15% ( ideal 10%) si o rata de fertilizare mai mare de 65% (ideal mai mult de 80%).

1. **Rata fertilizarii normale prin ICSI** reprezinta proportia de ovocite injectate cu 2PN in ziua urmatoare injectarii ( Consensul de la Istambul include si ovocitele cu 2 globuli polari).

	* 65% la paciente sub 40 ani, cu cel putin 3 ovocite obtinute. (Ideal > 80%)

Se exclud cazurile la care se anticipeaza o rata a fertilizarii redusa, ce includ: ovocitele in metafaza I maturate in vitro, ovocitele activate artificial, utilizarea spermatozoizilor obtinuti prin biopsie testiculara, globozoospermia si astenozoospermia.

1. **Rata degenerarii ovocitelor** ideal < 10%, ilustreaza competenta operatorului, calitatea ovocitelor, performanta bancii de celule si tesuturi reproductive; poate indica probleme tehnice.

Degenerarea ovocitelor se poate produce la denudare, in timpul procedurii ICSI, sau la verificarea fertilizarii in ziua 1

1. **Rata de fertilizare slaba** atunci cand < 25% din ovocitele injectate sunt fertilizate.

Ilustreaza competenta operatorului, calitatea gametilor.

1. **Esecul fertilizarii** este atunci cand nici un ovocit injectat nu s-a fertilizat. Maxim 1 – 5 % din cicluri.

 Ilustreaza calitatea / functia gametilor, indemanarea operatorului.

In concluzie, cei mai importanti indicatori cheie ai performantei pentru ICSI sunt:

* Rata degenerarii ovocitelor la ICSI;
* Rata fertilizarii normale prin ICSI.

**CAPITOLUL 10. EVALUARE/SCORING OVOCITARA, EMBRIONARA**

 Recomandarile ce urmeaza reprezinta standardul minim pentru evaluarea morfologica a ovocitelor si a embrionilor, fara a restrictiona bancile de celule si tesuturi reproductive de la observatii suplimentare.

10.1. **Evaluarea ovocitara**

10.1.1. Se va inregistra aspectul morphologic pentru fiecare ovocit

10. 1.2 Morfologia ovocitara optimă este cea a unei structuri sferice cu zona pelucida uniformă, cu o citoplasmă translucidă uniformă lipsită de incluziuni și cu un globul polar adecvat in dimensiuni. Ovocitele suferă sufera procese de maturarea nucleară și citoplasmatică , aceste procesele nefiind intotdeauna sincrone (1).

10.1.3.. **Scor complex cumulus-ovocit**. In prezent există puține dovezi care să susțină corelatia intre morfologia complexului cumulus-ovocit si dezvoltarea embrionului. Acesta ar trebui să fie un scor binary (0 sau 1), cu un complex cumulus-ovocit „bun” (scor 1) definit ca un cumulus extins, uniform (1).

10.1.4 **Zona pelucida**. Ar trebui notate doar observațiile excepționale în ceea ce privește culoarea sau grosimea zonei pelucida.

10.1.5. **Spatiul perivitelin.** Se va mentiona prezentaincluziunilor si a spatiului perivitelin exceptional de mare, ca si aspecte morfologice anormale, dar fara dovezi suficiente care sa sustina vreun prognostic specificpentru aceste observatii.

10.1.6. **Globul polar.** Mărimea globulului polar trebuie menționată numai dacă este exceptional mare. Ovocitele cu un polar anormal de mare nu trebuie inseminate, din cauza riscului de aneuploidie a acestor ovocite**.**

10.1.7. **Citoplasma**. Morfologic citoplasma este, de asteptat, sa fie omogenă. In cazul in care citoplasma este neomogenă, semnificația biologică este necunoscută și in baza dovezilor actuale, poate reprezenta variabilitate între ovocite, mai degrabă decât un „dismorfism” cu semnificație pentru dezvoltare. Un dismorfism cu semnificatie anormala este agregarea/claustrarea de reticul endoplasmatic neted (sER) si recomandarea pentru ovocitele cu această caracteristică este să nu fie inseminate datorita rezultatelor cu potential letal (4).

10.1.8. **Ovocitul gigant** (>200 µm Ø)**.** Este o alta entitate morfologica care trebuie manipulata cu precautie si pentru care se face recomandarea de a nu fi inseminat din cauza constituției genetice anormale.

10.1.9. **Vacuole**. Vacuole mici (5-10µm Ø), puțin probabil să aibă consecințe biologice. In schimb, vacuolele mari (0,14 µm Ø) sunt asociate cu eșecul fertilizării. Persistenta vacuolelor dupa singamie interfera cu planurile de clivaj determinand scaderea ratei de blastulatie. Prin urmare, se va nota prezenta vacuolelor mari.

10.2. **Momentul evaluarii ovocitelor fertilizate (zigoti) si a embrionilor**

10.2.1.Momentul constatarii fertilizarii si evaluarea embrionara se va raporta la momentul inseminarii (Tabel 1), prezentate in rapoarte de evaluare ca ore dupa inseminare (1).

**Tabel 1:**



10.2.2. Toate ovocitele care au fost inseminate sau injectate cu spermatozoizi, sunt examinate între 17 ± 1 ore, după inseminare, pentru prezența pronucleilor și a globulilor polari (1, 2).

10.2.3. In cazul fertilizarii convenționale, celulele cumulus se vor indeparta și ovocite fertilizate normal (2PN) vor fi transferate în placi de cultura noi , ce vor conține mediu de cultură pre-echilibrat (2).

10.2.4. Evaluarea fertilizării, a numarului si a morfologiei PN, trebuie efectuată cu mărire mare (cel puțin 200x), utilizând un microscop inversat echipat cu modulator de contrast Hoffman sau sistem optic echivalent (ex. dispozitiv optic pentru microscopie time-lapse) (2).

10.2.5. Aspectul optim al ovocitului fertilizat : forma sferica, să aibă doi globuli polari, cu doi pronuclei situati central, juxtapusi, cu dimensiuni uniforme si membrane distincte. Pronuclei ar trebui să aibă un numar echivalent de nucleoli si care, în mod ideal, aliniati ecuatorial in regiunea de juxtapunere a membranei pronucleilor (1).

10.2.6. Aspecte morfologice ale pronucleilor, cosiderate a fi atipice: pronuclei largi separati, pronuclei de dimensiuni diferite, micronuclei. Prezența discurilor de agregari/claustrari de reticul endoplasmatic neted ( sER) trebuie evaluată ca parte a fertilizării. Ovocitele fertilizate normal si la care se observa agregarea/claustrarea de reticul endoplasmatic neted (sER) nu ar trebui sa fie transferate(1).

10.2.7. Decizia de a efectua o a doua evaluare in ziua 1, apartine bancii, pentru a nota momentul singamiei sau a primului clivaj. Scopul celei de a doua evaluari poate fi din motiv de control al calitatii (singamia)(5, 7, 8, 9,10,11), fie din motive prognostice (primul clivaj)(6)(1).

10.2.8. Scorul pronuclear este util prin informatiile importante furnizate si este format din trei categorii: pronuclei simetrici, non-simetrici si anormali(1).

**Tabel 2:**



Z, Z-scor (Scott,2003)

10.2.9. Entitati morfologice anormale: pronuclei fără nucleoli („pronuclei fantomă”), pronuclei cu un singur nucleol („pronucleu ochi de taur”), sunt asociate cu rezultate anormale la modelele animale (1).

10.2.10. Embrionii derivați din ovocite cu ≥ 3PN nu ar trebui niciodată transferați sau crioconservați, chiar si in situatia in care nu sunt disponibili pentru transfer embrioni derivați din ovocite cu 2PN. Nu este recomandata utilizarea embrionilor derivați din ovocite cu 1PN sau ovocite cu 0 PN (2).

10.2.11. Ovocitele cu > 2PN, cu 1 PN sau 0 PN se vor izola de ovocitele fertilizate normal, de preferință în placi de cultura separate, pentru a evita orice risc de transfer (3).

**10.3. Evaluarea embrionilor in stadiul de dezvoltare/clivaj**

10.3.1. Pentru embrioni in stadiile de clivaj, observatiile contin informatii despre numarul de celule/stadiu si scor morfologic raportate la numarul de ore post-inseminare fiind acceptat numarul de 4 celule pentru ziua 2 si 8 celule pentru ziua 3.

10.3.2. Scor morphologic cuprinde evaluari pentru:

10.3.2.1. **Fragmentatii,** definite ca structure citoplasmatice extracelulare, anucleate cu diametrul < 45µm pentru embrioni de ziua 2 si < 40 µm diametru pentru embrioni de ziua 3.

10.3.2.1.1. Grade de fragmentare: usoara 10%; moderata 10-25%, severa >25%. Pentru un embrion cu 4 celule, fragmentarea de 25%, echivaleaza in volum cu un blastomer.

10.3.2.2. **Multinucleația** definită ca prezența a mai mult de un nucleu într-un blastomer incluzand micronucleii. Multinucleația este asociată cu un potențial de implantare scăzut, creșterea nivelului de anomalii cromozomiale și în consecință, risc crescut de avort spontan.

10.3.2.2.1. Evaluarea multinucleației se efectueaza în ziua 2 (adică 44 ± 1 h postinseminare)

10.3.2.2.2. Multinucleația prezenta într-o celulă este suficientă pentru ca embrionul să fie considerat a fi multinucleat. Bancile de celule si tesuturi reproductive ar trebui să înregistreze incidența multinucleației în fiecare embrion de ziua 2.

10.3.2.2.3. Schema de notare pentru multinucleație ar trebui să fie binară, menționându-se: prezenta sau absenta.

10.3.2.3 **Dimensiunea celulara**. Pentru embrionii cu 2, 4 sau 8 celule, blastomerele ar trebui sa aibe dimensiuni uniforme. Pentru celelalte etape de diviziune (3, 5, 7 celule) ne asteptam la o diferenta in dimensiunea celulelor avand in vedere ca runda de diviziune celulara nu a fost completa .

10.3.2.3.1. Sistemul de scor ar trebui sa fie binar, mentionandu-se daca dimensiunea este adecvata stadiului de diviziune.

10.3.2.4. **Alte aspect morfologice pentru stadiul de dezvoltare/clivaj** (ziua 2, 3 de diviziune)

10 3.2.4.1. Alte aspect morfologice, cum ar fi granulatiile citoplasmatice, aspectul membranei și prezența vacuolelor, pot fi de asemenea, notate ca parte a evaluării morfologice a embrionilor de ziua 2 si ziua 3. Nu exista dovezi care să susțină un efectul biologic clar al acestor aspete morfologice asupra potențialului de implantare, la fel ca si pentru embrionii care nu au un aranjamentul tridimensional al blastomerelor.

10.3.2.5. **Sistemul de scor pentru embrionii in stadiul de dezvoltare/clivaj** (ziua 2, 3 de diviziune)

10.3.2.5.1. Optim în ziua 2 (44 ± 1 h postinseminare) embrionul trebui sa aiba 4 blastomere, mononucleate, de dimensiuni egale, într-un aranjament tetraedric tridimensional, cu ≤ 10% fragmentari.

10.3.2.5.2. Optim în ziua 3 (68 ± 1 h postinseminare) embrionul trebui sa aiba 8 blastomere, mononucleate, de dimensiuni egale, cu ≤ 10% fragmentari.



**Tabel 3:**

**10.4. Evaluarea embrionilor in ziua 4 (Stadiul de morula)**

10. 4.1. Embrionii in aceasta etapa (92 ± 2 ore) ar trebui sa fie compactati (in a patra runda de diviziune) si in curs de compactare. Compactarea ar trebui să includă practic tot volumul embrionului.

10.4.2. Variațiile morfologiei embrionare din ziua 4 sunt reprezentate de excluderea de celule din procesul de compactare, al caror efect este neclar, exceptand situatia in care mai mult de jumatate din masa celulara a embrionului este exclusa, asociat probabil cu un prognostic evolutiv nefavorabil (12).

****10.4.3. **Sistemul de scor pentru embrionii din ziua 4**

**Tabel 4:**

**10.5. Evaluarea embrionilor in ziua 5 (etapa de blastocist)**

10. 5.1. Morfologia optima pentru embrion in acest stadiu (116+/- 2 ore) este reprezentata de prezenta unei cavitati – blastocel, in diferite grade de expansiune, o masa celulara interna, formata din multe celule, compactate, strans lipite si trofectoderm , un epiteliu coeziv, dispus la periferie si alcatuit din numeroase celule strans aderente. Masa celulara interna are rol prognostic in implantare si dezvoltare fetala ca si trofectodermul, cu rol functional essential.

10.5.2. Variante de structuri morfologice intanite, cu semnificatie neclare includ: extensii citoplasmatice (filopode) intre celulele masei celulare interne si trofectoderm; structuri celulare sau acelulare in spatial perivitelin cau cavitatea blatocist-ului.

**Tabel 5:**

10.5.3.Sistemul de notare este o combinatie intre etapa si scor.

Sistemul de evaluare pentru blastocist este o combinatie intre etapa si scor pentru masa celulara interna (ICM) si trofectoderm (TE) (de ex. pentru un blastocist expandat cu masa celulara interna cu scor bun si trofectoderm cu un scor rezonabil, va fi apreciat: 312) (Gardner and Schoolcraft, 1999 a,b)

10.5.4. Eclozare/“Hatching” reprezinta hernierea trofectoderm-ului prin subtierea zonei pelucida. Acest proces nu poate fi evaluat in mod fiabil in situatiile in care bresa la nivelul trofectodermului s-a realizat artificial, exceptie facand injectia intracitoplasmatica (ICSI).

10.5.5. Pentru fiecare etapa de dezvoltare se acorda un indice numeric (1-6) si pentru structurile celulare, masa celulara interna si trofectoderm, conform clasificarii lui Gardner, se acorda un indice alfabetic A, B, C.

10.5.6. Pentru a putea introduce scorurile in baze de date numerice si pentru a facilita analizele statistice s-a propus inlocuirea indicatorilor alfabetici cu cei numerici, 1 echivalent cu Gardner A, 2 pentru Gardner B si 3 pentru Gardner C.

10.5.7. Daca in momentul evaluarii bastocist-ul este in colaps, acesta va fi evaluat 1-2 ore mai tarziu, dupa reexpandare, pentru o evaluare fiabila.

**10.6. Definitia embrionului neviabil**

10.6.1. Un embrion este considerat neviabil cand evolutia acestui a fost oprita de cel putin 24 de ore sau cand toate celulele au degenerate sau sunt lizate.

**CAPITOLUL 11. CULTURA EMBRIONILOR SI EMBRIOTRANSFERUL**

Cultura embrionară – principii de bază și interacțiuni

Scopul initial al culturii embrionare este de a reproduce condițiile tractului reproductiv matern. Deși este adevărat că oviductul și uterul oferă cel mai bun mediu de cultură posibil, sistemul reproductiv este extrem de complex si având în vedere această complexitate, este nerealist să presupunem că diversele interacțiuni dintre embrion și tractul matern vor fi pe deplin înțelese în viitorul apropiat și chiar mai puțin realist să presupunem că pot fi replicate perfect in vitro. Scopul culturii de embrioni in vitro este de a oferi condiții care să conducă la producerea de embrioni care au același potențial de dezvoltare ca și embrionii care se dezvoltă in vivo.

Există cel puțin doi parametrii de care trebuie tinut cont in incercarea de replicare a conditiilor in vitro. Prima este cantitatea de oxigen. Deși cantitate de oxigen din tractul reproducător feminin uman normal nu este cunoscută, este sigur că va fi mult sub 21% găsită în aerul ambiant. Acest lucru a fost confirmat de rezultatele a sute de studii despre efectul concentratiei scăzute (5-10%) de oxigen față de concentratia ridicată a oxigenului (ambientală) asupra dezvoltării embrionilor fiecărei specii de mamifere studiate, inclusiv a oamenilor. Până în prezent, niciun studiu nu a arătat un efect pozitiv al O2 ridicat asupra dezvoltării preimplantationare a embrionilor umani, în comparație cu multe care au arătat un efect dăunător (Gardner, 2016). Al doilea parametru ce trebuie luat in considerare este cel legat de expunerea embrionului la condiții in vitro cu potențiale de efecte adverse. De exemplu, este posibil ca poluanții de mediu, în special substantele organice volatile (VoC), să joace un rol. Deși embrionul, in tractul matern , nu este complet protejat de substantele organice volatile ,plămânii, ficatul și rinichii mamei asigură o filtrare și detoxifiere considerabilă a Voc-urilor, reducând astfel expunerea embrionului. În schimb, embrionul in vitro nu are astfel de mecanisme de protecție și, prin urmare, trebuie luate măsuri pentru reducerea activă a substantelor organice volatile în aerul general al spatiului de prelucrare celule si tesuturi reproductive și în special în incubator ( Mortimer et al., 2018).

Abordările timpurii pentru cultivarea embrionilor umani au implicat utilizarea mediilor de cultură concepute pentru cultura de celule somatice. Multe dintre componentele acelor medii au fost inadecvate și/sau la concentrații greșite pentru cultura de embrioni umani. De atunci, s-au făcut pași mari în formulele mediilor de cultură embrionare, începând cu dezvoltarea mediului Quinn’s Advantage Fertilization (HTF) pentru cultură până la etapele de perioada de segmentare(clivaj), și apoi medii pentru cultură până la stadiul de blastocist. Includerea tuturor celor 20 de aminoacizi s-a dovedit a fi deosebit de importantă, glutamina fiind furnizată prin dipeptide cu alanină sau glicină. Mediile comerciale produse în masă și distribuite sunt fabricate în condiții mult mai stricte și controlate decât este posibil într-o banca de celule si tesuturi reproductive și sunt supuse unor teste riguroase și supraveghere reglementară.

Este, totuși, important să recunoaștem că mediul de cultură embrionară nu este decât unul dintre probabil sutele de factori din banca de celule si tesuturi reproductive care ar putea afecta rezultatul activitatii(Pool et al., 2012). Printre posibilii factori putem include vârfurile de pipetă, tuburile și placile de cultură care vin în contact atat cu mediile de cultura cat si cu embrionii. Echipamentele, gazele și procedurile operationale specifice(protocoalele utilizate) ar putea avea efecte independente de mediul de cultură ceea ce ne trimite la concluzia că aparitia unei anomalii de dezvoltare în timp ce embrionul se află într-un mediu de cultură nu înseamnă că mediul este responsabil pentru aceasta. Astfel incat ,pentru a asigura cultura embrionilor, fluctuațiile parametrilor implicați trebuie păstrate la o valoare minima.

Desi, evaluarea a cat mai multi parametrii ai culturii embrionare poate fi informativa si poate duce la optimizarea conditiilor de cultura, evaluarea trebuie insa sa includa, in cele din urma indicatori de evaluare post transfer.În mod tradițional, acesti indicatori s-a concentrat pe sarcină, sarcină clinică, sarcină în curs, avort spontan, ratele de naștere și natalitate . Din pacate insa, niciunul dintre acesti indicatori nu este in măsura a valida viabilitatea embrionilor, deoarece niciunul dintre indicatori nu ține cont de numărul de embrioni transferați. De exemplu, dacă doi embrioni sunt transferați și un embrion nu reușește să se implanteze rata de sarcini a unitatii sanitare acreditate nu este modificata. În mod clar, orice măsură care nu poate distinge între 0% și 50% pierdere embrionară nu este de nici un folos în evaluarea viabilității embrionului. Utilizarea ratei de sarcină cumulată este, de asemenea, inadecvată, deoarece nu ține cont de numărul de transferuri. Dimpotrivă, rata de implantare, rata de pierdere fetală și copiii născuți per embrion transferat reprezintă toate , numărul de embrioni transferați. S-a sugerat că rata de implantare este părtinitoare din punct de vedere statistic (Griesinger, 2016), dar acest lucru este ușor de ocolit prin efectuarea de embriotransferuri cu un singur embrion(SET).

Fără îndoială, tendința în serviciile medicale de reproducere umana asistata medical este către transferul de embrioni în stadiul de blastocist (Zilele 5-7) și renuntarea la transferul în stadiul de perioada de segmentare(clivaj) (Zilele 2-3). Transferul embrionilor în stadiul de perioada de segmentare(clivaj) în uter este nefiziologic, în special în prezența nivelurilor crescute de estrogen după stimularea ovariană. În plus, cultura până la stadiul de blastocist oferă oportunitatea de a avea mai multe evaluari ale dezvoltării embrionare, inclusiv al aspectelor morfologice, morfocinetice, metabolice și citogenetice. Ca rezultat, rata de implantare pentru transferul de blastocist este semnificativ mai mare decât pentru transferul în stadiul de perioada de segmentare(clivaj) pentru toate grupele de vârstă materne (Rezumatul Național SART 2015-2017). Transferul de blastocist oferă o sincronizare mai bună între embrion și uter decât transferul în stadiul de perioada de segmentare(clivaj), astfel incat devine dificil de justificat transferul de embrioni în stadiul de perioada de segmentare(clivaj). Chiar daca , unitatea sanitara are ca procedura standard transferul doar la stadiul de blastocisti,, concentrațiile mari de estrogen și progesteron rezultate din stimularea ovariană produc un mediu uterin suboptimal Abordarea logică pentru eliminarea acestei probleme este de a cryoprezerva toti blastocistii (frezee-all) și de a face SET in unul sau mai multe cicluri nestimulate ulterior. Rata de implantare dupa transferul de blastocisti din decongelare/devitrificare este semnificativ mai mare decat cea din transferul de blastocisti proaspeti. Si este valabil pentru toate grupele de vârstă maternă (SART National Summary 2015). Mai mult, incidența copiilorcu greutate mai mica pentru vârsta gestațională este semnificativ scăzută odată cu transferul de embrioni congelați, în timp ce incidența copiilor cu greutate mare pentru vârsta gestațională este semnificativ crescută. (Luke și colab., 2017; Wennerholm și colab., 2013). Este important de remarcat asocierea unei greutati scazute comparativ cu varsta gestationala genereaza rate generale crescute de deces neonatal, infantil , dar nu există nicio asociere între greutatea mai mare comparativ cu varsta gestationala și ratele generale de deces neonatal, infantil (Wennerström et al., 2015; Xu et al., 2010).

Un alt aspect ce trebuie mentionat este incidența mare de aneuploidii, chiar și în rândul blastocistilor cu o morfologie de înaltă calitate. Astfel de embrioni aneuploizi au o șansă mult redusă de a se implanta sau de a avea ca rezultat o naștere . Rata de implantare pentru transferul blastocistilor identificati ca euploizi prin testarea genetică pentru aneuploidii, preimplantationala (PGT-A) este semnificativ mai mare decât cea a blastocistilor netestati, pentru toate grupele de vârstă maternă (SART National Summary 2015). Din punct de vedere clinic, utilizarea PGT-A poate fi un standard mai bun de îngrijire, deși dovezile incontestabile încă lipsesc.Insa, trebuie avut in vedere si faptul ca prezenta embrionilor aneuploizi crește semnificativ numărul de transferuri, timpul până la obtinerea sarcinii, suferința pacientului și costul unor eventuale alte investigatii..

În concluzie, cerințele de bază pentru cultura embrionara optimala par a fi:

–mediu de cultură complet (toți cei 20 de aminoacizi);

–atenție la toți parametrii de cultivare,de mediu dar și clinici;

–concentratie scăzuta de O2;

–minimizarea substantelor organice volatile;

–cultivarea pana la stadiul de blastocist- ziua 5(+);

–vitrificarea blastocistilor și

–transferul unui singur blastocist, devitrificat intr-un ciclu ulterior nestimulat, de preferinta testat pentru aneuploidii (PGT-A) euploid

Temperatura in cultura embrionara

Utilizarea și menținerea temperaturii adecvate în timpul manipulării și culturii celulelor este o componentă critică a optimizării acestuia, deoarece temperaturile necorespunzătoare pot compromite funcția și dezvoltarea celulelor și, prin urmare, pot duce la rezultate nesatisfacatoare. Temperatura ideală pentru cultura celulara in vitro este inca in dezbatere.

Deși recrearea in vitro a condițiilor care există in vivo pentru a se adapta nevoilor fiziologice ale embrionului este o abordare logică (Gardner și Leese, 1990; Gardner și colab., 1996, Gardner și colab., 2002; Lane și Gardner, 2000a), există un risc de erori în măsurătorile in vivo (Ng et al., 2018). În plus, mediile de cultura in-vitro pot necesita alti parametrii decat cei in vivo pentru a asigura o manipulare optimă a gameților și o dezvoltare embrionara corespunzatoare .

Este general acceptat ca temperatura bazala la om este de37°C, dar aceasta valoare ar putea să nu fie complet exactă, deoarece temperatura corpului este de fapt un interval (Dewdney, 1993; Elert, 2015; Mackowiak și colab., 1992; Sund-Levander și colab. , 2002), și poate fi afectată de modul în care este efectuata măsurarea ( oral, versus rectal, versus auricular etc) , ora din zi , sexul (Elert, 2015; Sund-Levander et al., 2002). Toate acestea pun la indoiala ca optim nivelul de 37,0 °C

Temperatura testiculară a majorității mamiferelor, inclusiv a omului, este cu 2-4°C mai mică decât temperatura bazala. Aceasta temperatura este necesară pentru spermatogeneza și spermiogeneza normală (Durairajanayagam et al., 2015). În mod similar, temperatura tractului reproducător feminin ar putea fi, de asemenea, mai mică decât temperatura bazala: există un gradient de temperatură în oviductul porcilor și iepurilor, istmul fiind cu 0,2–1,6 °C mai rece decât ampula (Hunter, 2012; Hunter și Nichol, 1986; Hunter și colab., 2006). Foliculii maturi la iepure, porci și vaci sunt cu 1,3–1,7°C mai reci decât stroma ovariană (Grinsted și colab., 1980; Hunter, 2012; Hunter și Einer-Jensen, 2005; Hunter și colab., 1997, Hunter și colab. , 2000, Hunter și colab., 2006) și cu ~2,3°C mai rece decât stroma în ovarele umane (Grinsted și colab., 1985). Astfel de observații, precum și lipsa de informații fiabile cu privire la temperatura uterului în momentul implantării, au condus la propunerea că dezvoltarea embrionului uman ar putea beneficia de o temperatură mai mică decât temperatura bazala a corpului. (Leese et al., 2008).

Insa,au fost constatate efecte daunatoare asupra ovocitului la variatii de temperatura, chiar si pe termen scurt, astfel incat temperatura optima este considerata a fi 37°C. Exista studii care au demonstrat ca racirea ovocitelor la temperatura camerei pentru o scurta perioada de timp determina dezorganizarea fusurilor de diviziune, unele ovocite prezentand cromozomi deplasati. Reincalzirea lor avand ca rezultat reorganizarea fusului meiotic doar la un numar limitat dintre ovocite. De asemenea, s-a constatat ca severitatea defectelor a crescut cu cat temperatura a fost mai scazuta si cu cat timpul de expunere la o temperatura mai scazuta a fost mai lung.(Johnson și colab., 1988; Pickering și Johnson, 1987; Pickering și colab., 1990).Studiile efectuate , in care s-a observat reasamblarea fusului de diviziune au vazut ca interval de temperatura 33°C sau 37°C (Wang și colab., 2001).

Exista studii care arata ca efectuarea injecției intracitoplasmatice de spermă (ICSI) la 37°C, fata de 33°C sau 34°C, a dus la un număr semnificativ mai mare de ovocite cu un fus meiotic vizibil, precum și rate semnificativ mai mari de fertilizare și sarcină (Wang et al., 2002).Exista insa si studii care arata ca efectuarea ICSI sub 37°C a dus la rezultate de succes (Atiee și colab., 1995), dar nu a abordat atingerea rezultatelor clinice optime

Trebuie mentionat si faptul ca multe protocoale de crioprezervare necesită echilibrare în soluții crioprotectoare la temperatura camerei timp de câteva minute – dar acestea sunt circumstanțe speciale și sunt asociate cu protocoale de decongelare și devitrificare atent monitorizate.

In ceea ce priveste sensibilitatea embrionilor la variatii de temperatura, studiile sunt mai putine.

În timp ce un studiu privind performanța incubatorului a raportat o rată crescută a sarcinii de la incubatoare cu o temperatură de 36,96 ± 0,13°C în comparație cu cele cu o temperatură de 37,03 ± 0,13°C (Higdon și colab., 2008), un altul nu a gasit niciun impact semnificativ asupra rezultatelor clinice in cazul incubatoarelor cu variatii ușoare de temperatură de până la 0,3°C între rafturi (Walker et al., 2013).De mentionat este ca, acuratețea acestor variații minore de temperatură este mai mică decât incertitudinea de măsurare a majorității termometrelor. Cu toate acestea, un studiu prospectiv randomizat controlat, folosind zigoți cultivați timp de 5-6 zile fie la 37°C, fie la 36°C, a demonstrat că in ceea ce priveste cultura la 37°C a existat un număr mediu de celule mai mare în ziua 3 și un numar mai mare de blastocisti comparativ cu cei cultivati la 36°C (Hong et al., 2014). În mod similar, un alt studiu prospectiv a sugerat, de asemenea, că temperatura de 37°C a fost superiora pentru cultura extinsă de embrioni, comparativ cu cea de 36,5°C (Fawzy et al., 2018). Astfel ca variatiile prelungite ale temperaturii culturii par să afecteze dezvoltarea embrionara.

In orice caz, mediile de cultura actuale au fost produse

Mediile de cultură FIV actuale au fost formulate pentru utilizare la ~37°C și se considera că, modificarea temperaturii culturii ar putea afecta metabolismul celular, precum și pH-ul mediului, în special în mediile care conțin HEPES sau MOPS (Jeyendran și Graham, 1982; Swain, 2010). , Swain, 2011, Swain, 2012a, Swain, 2012b; Will et al., 2011). Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că ΔpH/Δ°C este de doar –0,0096 pentru 25 mmol/l bicarbonat, prin urmare pH-ul mediului are o variatie extrem de mica între 36°C și 38°C. Cu toate acestea, o schimbare generală a temperaturii culturii ar putea necesita modificări ale compozitiei mediilor de cultura și ajustări in ceea ce priveste compozitia gazelor din atmosfera de cultura.

Deși temperatura optimă pentru cultivarea embrionilor nu pare sa fie stabilită fără echivoc, este esențial ca variatia temperaturii de cultura sa fie cat mai mica posibil pentru a reduce variabilitatea sistemului de cultură. Prin urmare, spatiul de prelucrare al celulelor si tesuturilor reproductive trebuie menținut la o temperatură confortabilă pentru personal, iar punctele de referință ale echipamentelor ar trebui să răspundă nevoilor de temperatură ale gameților și embrionilor. Acest lucru necesită utilizarea de termometre calibrate și măsurători adecvate, adică a mediului de cultură care înconjoară ovocitele sau embrionii, mai degrabă decât temperatura de suprafață a echipamentului (Cooke și colab., 2002; Lane și colab., 2008). De asemenea trebuie avut in vedere faptul ca embrionii experimenteaza variații de temperatură în timpul schimbărilor de locație si de aceea se recomanda ca aceste schimbari sa aiba loc cat mai rar si pentru intervale de timp cat mai scurte.

Măsurătorile de temperatura, daca nu sunt monitorizate continuu ,trebuie efectuate cel puțin zilnic, de obicei dimineața înainte de utilizarea echipamentului. Monitorizarea continua a temperaturii este utila în identificarea fluctuațiilor de temperatură ce pot aparea pe timpul zilei și în timpul utilizării echipamentului. În termeni practici, este necesar un interval de temperatură strict controlat pentru fiecare piesă de echipament , cu mentiunea ca o temperatură puțin mai mică ar putea fi mai sigură decât o temperatură mai ridicată fata de 37°C.

Mediul de cultura- trebuie ales un mediu de cultură special conceput pentru cultura embrionilor. Poate fi folosit mediu secvențial sau mediu single-step.

Este recomandată cultura embrionilor sub ulei pentru a micșora modificările de Ph, temperatură și osmolalitate.

Tipul de cultură: în picătură sau în plăci de cultură cu godeuri. Decizia poate rămâne la latitudinea persoanei responsabile, ținând cont de preferința individuală și de experiență. Plăcile de cultură trebuie etichetate clar și adecvat și echilibrate coform instrucțiunilor producătorului, de preferabil peste noapte în incubator. Etichetarea se face conform SOP existent.

În cazul în care cultura embrionilor se face până în stadiul de blastocist, se recomandă folosirea incubatoarelor cu concentrație mai mică de oxigen. Pentru o bună trasabilitate se recomandă cultura individuală a embrionilor. Tipul și numărul incubatoarelor din spatiul de prelucrare celule reproductivetrebuie să fie asociate cu tipul de cultură și cu numărul de cazuri.

Umiditatea in cultura embrionara

Pentru a avea o cultura embrionara optimizata este necesar sa mentinem conditii de cultura cat mai constante.

Aceste condiții includ pe langa mediul de cultură ,osmolalitatea și pH-ul acestuia (care depinde și de compoziția fazei gazoase), temperatura, umiditatea și calitatea aerului, toate acestea fiind deosebit de importante (Pool et al., 2012). Deși există valori sau intervale recomandate pentru majoritatea acestor condiții (Wale și Gardner, 2016), nivelul optim de umiditate în incubator nu a fost încă determinat.

Inițial, reglarea CO2 în incubatoare a fost mediată folosind senzori de conductivitate termică care se bazau pe o atmosferă umidificată pentru o funcționare corectă, dar trecerea la senzori cu infraroșu a eliminat această necesitate (Swain, 2014). În plus, au fost exprimate îngrijorări cu privire la faptul că umiditatea ar putea crește probabilitatea creșterii excesive a microorganismelor în incubator, având un impact negativ asupra dezvoltării embrionului (Geraghty et al., 2014) și s-a postulat că utilizarea unei suprapuneri de ulei în placile de cultură ar preveni evaporarea mediului de cultură, protejând astfel împotriva riscului de osmolalitate crescută.Toate aceste observatii au încurajat trecerea către cultura de embrioni într-un mediu neumidificat.

Exista insa doua studii care au demonstrat că un strat de ulei nu este suficient pentru a proteja împotriva modificărilor osmolalității în timpul incubației uscate. Fawzy et al., 2017a au raportat că introducerea umidității într-un incubator normal uscat a dus la îmbunătățirea dezvoltării embrionilor și a ratelor de sarcină în curs. Albert și colab., 2018 au folosit imagistica time-lapse pentru a evalua efectul eliminării umidificării dintr-un incubator umidificat în mod normal asupra dezvoltării embrionului și, de asemenea, au raportat rezultate mai bune cu umidificare. De asemenea, trebuie remarcat faptul că „umed” versus „uscat” nu este o condiție binară, iar aspectele volumelor relative și cele ale suprafețelelor, cât și zonele de interfață pot influența relația precisă dintre un incubator umidificat și mediul de cultură, si invers. Efectele asupra osmolarității în cultura nehumidificată pot fi mai puțin dăunătoare în sistemele de cultură secventiale (la fiecare 48 de ore), deoarece schimbarea osmolarității este cumulativa temporal (Fawzy et al., 2017a; Swain, 2018, Swain et al., 2016). ). Umiditatea camerei poate juca, de asemenea, un rol. Având în vedere dezvoltarea satisfăcătoare și rezultatele raportate într-o serie de lucrări după cultura în sistem time-lapse, care este utilizat într-un mediu uscat nesecvential, o diferență poate fi suprafața mare a micropicăturilor sub ulei în plcute în comparație cu tubul vertical. precum cultura în lamele de la primele generatii de echipamente time-lapse. Embrionii de șoarece cultivați în lame neumidificate s-au dezvoltat la fel de bine sau mai bine decât cei cultivați în micropicături sub ulei într-un incubator umidificat folosind același mediu (Kelley și Gardner, 2017). Până la clarificarea motivelor implicate în promovarea sau inhibarea evaporării prin ulei, embriologii ar trebui să ia în considerare umidificarea ca o alegere evidentă pentru cultură, dar numai dacă producătorii de incubatoare recomandă utilizarea umidificării.

Controlul CO2 si a pH-ului mediului de cultura

Controlul concentratiei de CO2 este esențial pentru mediul de cultură pentru a menține un pH fiziologic

pH-ul unui mediu este complex, cu interacțiuni între aminoacizi și alte componente . În general, concentrațiile de CO2 între 5 și 6% (la nivelul mării) ar trebui să conducă la pHe fiziologic corect de 7,2–7,4 (Swain, 2012b), unde pHe este pH-ul extracelular al mediului de cultură (Bavister, 1995).Dar pHe nu este parametrul de semnificație biologică real; adică pHi, pH-ul intracelular al citoplasmei, care ar trebui să fie cu aproximativ 0,1 unități pH sub pHe, deoarece embrionii utilizează acest gradient pentru mecanismele de transport și pentru a compensa acidificarea internă din procesele metabolice (Lane și colab., 1999). pH-ul ovocitelor și embrionilor umani variază ușor în timpul dezvoltării, dar este de obicei acceptat a fi 7,12, ceea ce înseamnă că pHe ar trebui să fie 7,2-7,3 (Phillips et al., 2000). Acest pH este atins prin cultivare într-un mediu în care presiunea parțială a (pCO2) este titrată pentru a da pH-ul corect.

În principiu, pH-ul mediului, ar trebui să fie ușor de măsurat, dar în practică nu este. Există trei modalități principale de măsurare a pH-ului mediilor de cultură, fiecare cu propriile avantaje și dezavantaje. Un pH-metru trebuie să aibă o calibrare în trei puncte, în mod ideal în interiorul incubatorului. Electrodul de sticlă trebuie păstrat curat deoarece proteinele din mediu vor adera la sticlă, afectând măsurarea. In ciuda curățării regulate, electrodul va trebui să fie înlocuit frecvent. Analizoarele de gaze din sânge, fie că sunt statice sau portabile, pot măsura pH-ul, precum și pCO2 și pO2. Rezultatele pot fi precise, dar trebuie să fiți foarte atenți pentru a vă asigura că,in ceea ce priveste concentrația de CO2 și O2, aceasta este menținută constanta înainte de efectuarea măsurării. Dar pHmetrele și analizoarele de gaze din sânge oferă doar o masurare „instantanee” a pH-ului, care ar putea varia în timp. Exista si tehnologii care utilizeaza fluoroscopia pentru a măsura pH-ul în mod continuu. Se utilizează coloranți fluorescenți care își schimbă culoarea sau intensitatea odată cu pH-ul. Senzorii marker (cu solutii standardizate) sunt plasați în interiorul unui incubator și oferă o citire continuă a pH-ului. Problema cu acești senzori este că se bazează pe un standard care ar putea să nu reflecte pH-ul mediului de cultură.

Controlul pH-ului este complex, iar măsurarea doar a concentratiei de CO2 nu este un indicator proxy pentru pHe dintr-un mediu de cultură complex, unde pH-ul ar trebui măsurat direct. Diferite tipuri și mărci de incubatoare trebuie validate înainte de utilizare, pentru a se asigura că mediul de cultură este menținut la pHe-ul dorit.

*Menținerea unui interval al pHe îngust și stabil este importantă pentru calitatea embrionilor. pH-ul ideal este dificil de definit și poate varia în funcție de mediul de cultura și ingrediente (medii unice versus medii secvențiale; 7,20–7,35), precum și de temperatură. Nivelul de CO2 adecvat pentru condițiile de cultură din fiecarespatiu de prelucrare celule reproductiver trebuie determinat și menținut îndeaproape. Nivelul adecvat de CO2 va varia în funcție de altitudine și de compoziția mediului.*

*Tamponele selectate (adică HEPES și MOPS) par a fi sigure pentru stabilizarea pH-ului în afara incubatorului de cultură.*

*Măsurătorile precise ale pH-ului pot fi dificil de realizat din cauza calibrării cu tampoane care nu sunt proiectate pentru utilizare la 37°C și, prin urmare, trebuie interpretate cu prudență. Analizoarele de gaze din sânge la punctul de îngrijire cu funcție de autocalibrare ar putea oferi măsurători mai precise. Trebuie remarcat faptul că analizoarele de gaze din sânge nu măsoară în mod fiabil pH-ul mediului tamponat*

*Este necesar să se utilizeze produse în conformitate cu instrucțiunile producătorului și cu marcaj CE*

*Mediile de cultură ar trebui să conțină proteine, carbohidrați, un amestec complex de aminoacizi cu glutamina sub formă de dipeptidă și, de obicei, antibiotic(e). Utilizarea roșului de fenol ca indicator de pH este opțională.*

*Din motive de calitate, consistență și reproductibilitate trebui să utilizati mediu de cultură fabricat comercial, destinat utilizării culturilor de embrioni umani.Trebuie remarcat faptul că suplimentarea mediilor cu proteine exogene dincolo de recomandările producătorului ar putea modifica compoziția și performanța mediului.*

*In prezent nu există dovezi suficiente pentru a susține adăugarea de compuși bioactivi, cum ar fi factori de creștere sau proteine complexe, la mediul de cultură embrionara și sunt necesare studii de siguranță și eficacitate înainte de includerea lor in activitatea de rutină.*

*Trebuie implementate politici și proceduri operationale specifice, inclusiv pentru verificarea, acceptarea si validarea consumabilelor si a utilizarii acestora. Aceasta include păstrarea înregistrărilor permanente ale certificatelor de analiză și numerelor de lot/loturi.Banca de celule si tesuturi reproductive trebuie să monitorizeze performanța continuă a acestor materiale.*

*Se pot utiliza atat medii secventiale cat si ne secventiale. Un review Cochrane(Youssef et al., 2015) concluzionează că nu există diferențe de rezultate între cele două sisteme de cultură, iar această concluzie este susținută de alte recenzii sistematice (Dieamant et al., 2017; Sfontouris et al., 2016) . Cu toate acestea, Sfontouris et al., 2016 au concluzionat că: „Deși utilizarea unui singur mediu pentru cultura extinsă are unele avantaje practice și ratele de blastulatie par a fi mai mari, nu există dovezi suficiente pentru a recomanda medii fie secvențiale, fie ne secventiale ca fiind superioare pentru cultura embrionilor la zilele 5/6. Ar trebui efectuate studii viitoare care să compare aceste două sistemede cultivare.”*

*Mediile de cultură :*

*–se păstrează la frigider la 2–8°C;*

*–ferite de lumină (și în special de lumina directă a soarelui);*

*–aruncate atunci când termenul de valabilitate (adică data de expirare) a fost depășit/a;*

*–etichetat cu data expirării și condițiile de păstrare; aceste informații ar trebui să fie, de asemenea, pe toate inserturile de produs;*

*–utilizate în ordinea numerelor lor de lot/loturi*

*Lumina: Pentru a proteja embrionii de expunerea la lungimi de undă potențial dăunătoare ale luminii,se recomanda sa utilizați filtre la microscoape pentru a bloca ultravioletele. În comparație cu iluminarea microscopului, efectul stresului luminii ambientale este scăzut și acest lucru ar putea fi luat în considerare atunci când se planifica un nou spatiu de prelucrare celule si tesuturi reproductive.*

*Temperatura si transportul:*

*–Orice mediu de cultură care a fost înghețat trebuie aruncat.*

*–Uleiul de cultură nu va îngheța, dar uleiul poate prezenta tulburări, care reflectă de obicei o solubilitate redusă a apei sau a altor molecule la temperaturi scăzute; acest lucru ar trebui să fie reversibil la temperatura ambiantă. Dacă a inghetat, uleiul nu trebuie aruncat.*

*Temperatura ridicată poate duce la:*

*–Degradarea prin oxidare (pierderea relativă a ingredientelor active).*

*–Aminoacizii și proteinele pot suferi dezaminare (ionii de amoniu; sursele principale de amoniac sunt monopeptidele instabile de glutamină și sursele de proteine).*

*Eficiența unui frigider, în ceea ce privește menținerea unei temperaturi stabile, depinde de sarcină si ar trebui să fie în intervalul 30-80% din capacitatea sa de depozitare.*

*Monitorizarea și înregistrarea independentă a temperaturii frigiderului este vitală, folosind un termometru calibrat, sau cu monitorizare continua și alarmă automată.*

Concentratia de O2 pentru cultura embrionara

O altă variabilă importantă pentru dezvoltarea embrionului și rezultatele reproducerii asistate este concentratia de oxigen utilizată în incubatoarele de cultură. Două niveluri alternative de O2 sunt utilizate în mod obișnuit in culturile embrionare: O2 atmosferic ambiental (aproape 21% la nivelul mării) și 5%, nivelul fiziologic propus (revizuire: Nielsen și Ali, 2010). Deși nivelurile de O2 în tractul reproducător sunt raportate a fi între 2 și 8% (Fischer și Bavister, 1993; Kaufman și Mitchell, 1994; Kigawa, 1981; Mastroianni și Jones, 1965; Yedwab și colab., 1976), au aparut indoieli in ceea ce priveste despre metodele utilizate în aceste studii, ceea ce a determinat sugestia ca este necesara o reevaluare. (Ng et al., 2018).

Exista numeroase studii care demonstreaza ca este de preferat o concentratie de 5% O2 în comparație cu O2 ambiental De exemplu au fost raportate rate de perioada de segmentare(clivaj) mai bune , precum si rate de blastulatie la bune pentru cultura cu o concentratie de 5% O2 (Edwards și colab., 1970; Steptoe și colab., 1971; Steptoe și Edwards). , 1978).

Alte studii au aratat ca o concentratie de 20% O2 a fost inferioara fata de cea cu 5% O2 raportat la ratele de sarcini clinice, ratele de implantare sau de copii nascuti vii (Bontekoe și colab., 2012; Meintjes și colab., 2009a; Nastri și colab., 2016) , dar au fost recomandate studii suplimentare cu protocoale de studiu și de cultură mai stricte. Studiile in sisteme time-lapse de embrioni umani și de șoarece au arătat un efect dăunător al expunerii la O2 atmosferic, chiar si pentru un timp scurt. (Kirkegaard și colab., 2013; Wale și Gardner, 2010).

Oxigenul este considerat un factor de stress in cazul culturilor embrionare, deoarece in combinatie cu amoniul aduce modificari in transmiterea glutaminei si alaninei, ceea ce are ca rezultat o dezvoltare fetala anormala. (Wale și Gardner, 2016)

De asemenea, pentru culturi embrionare realizate cu concentratii ambientale au fost studii care au raportat o crestere a aparitiei de specii reactive la oxigen, care pot afecta atat dezvoltarea embrionara cat si descendentii rezultati. (Bedaiwy și colab., 2004, Bedaiwy și colab., 2010; Yang și colab., 1998).Exista studii care raporteaza perturbarea metabolismului metabolismul transcriptomului, proteomul, carbohidraților și aminoacizilor, homeostazia embrionului și epigenomul, inclusiv inducerea inactivării premature a cromozomului X și afectează diferențial embrionii masculini și feminini (Gardner și Lane, 2005; Katz-Jaffe și colab. , 2005; Lengner și colab., 2010; Li și colab., 2016; Rinaudo și colab., 2006; Wale și Gardner, 2012, Wale și Gardner, 2013).

Exista studii care sugereaza ca cultivarea intr-un mediu cu o concentratie de 2% O2, incepand cu stadiul de morula ar putea optimiza cultura embrionara, deoarece se speculeaza ca, la nivel uterin, concentratia de O2 este mai mica decat la nivelul oviductului (Ng și colab. , 2018), iar faptul ca apare o crestere a nivelului glicolizei aerobe dupa activarea genimica creste riscul aparitiei si producerii speciilor reactive la oxigen (Morin, 2017).

Studiile efectuate pe culturi embrionare utilizand niveluri scazute de O2 de către Kaser și colab., 2016 și Yang și colab., 2016, au fost insuficiente, dar Fawzy și colab., 2017b au cultivat embrioni umani continuu din ziua 0 până în ziua 5 si/sau 6 în concentrație de O2 de 3,5% sau 5,0% și au constatat că, pentru culturile efectuate cu o concentratie de 3,5% O2 au aparut rate de fertilizare si perioada de segmentare(clivaj) carescute semnificativ, dar rate de blastulatie si rezultate clinice semnificativ mai mici.

In concluzie, nivelul optim al concentratiei de O2 pentru cultura embrionara ramane a fi determinat, inclusiv in ceea ce priveste posibilitatea nivelurilor diferentiate in functie de stadiul de dezvoltare embrionara.

La acest moment, concentratia de 5% O2 este recomandarea pentru cultura de embrioni umani in vitro.

Manipulare , consumabilele , echipamentele, mediul ambiental

Pentru optimizarea culturii embrionare trebuie avute in vedere inclusiv aspectele legate de factorii indirecti care pot afecta cultura embrionara cum ar fi :

* Manipularea efectuata defectuos sau intr-un timp ce poate modifica parametrii optimi ai temperaturii, pH-ului etc.De exemplu: : pentru placile de cultura ce contin picaturi de 50 µl de mediu sub ulei regazarea (reechilibrarea pH-ului) durează aproximativ de 20 × mai mult decât degazarea, care este foarte rapidă chiar și cu ulei, deoarece pH-ul va fi > 7,4 în <2 min (Mortimer și Mortimer, 2015). Prin urmare, se recomandă ca un vas de cultură să fie expus la aer timp de <2 minute sau utilizarea clopotelor/palniilor/miniincubatoarelor cu gaz in hota dar tot cu respectarea unor timpi de manipulare cat mai aproape de sub 2 minute.
* Consumabilele. ( corect alese pentru a nu elimina substante organice volatile sau substante embriotoxice, medii cu compozitia corecta, placi de cultura care in functie de grosime pot avea variatii de temperatura etc
* Incubatoare, hote etc validate
* Aerul din spatiul de prelucrare celule corespunzator.

Pregatirea placilor de cultura trebuie efectuata sub hota pentru a menține sterilitatea vaselor, mediilor de cultură și uleiului în timpul manipulării, etichetării . Toate aceste etape sunt efectuate la temperatura ambientala de aceea viteza este esențială pentru a evita evaporarea micropicăturilor distribuite și suprapuse cu ulei (Swain și colab., 2012).

Menținerea performanței incubatoarelor pentru fiecare variabilă în limite acceptabile predeterminate este esentiala.Validarea echipamentelor se face prin confirmarea performantelor acceptabile, stabilite prin identificarea punctelor de referință și a toleranțelor. Aceste repere sunt îndeplinite după ce un incubator este pornit pentru prima dată și stabilizat, iar apoi sunt menținute prin supravegherea constantă a performanței printr-un program de management al calității. Pentru toate variabilele care afectează funcționarea incubatorului, inclusiv temperatura, așa cum s-a discutat mai sus, concentratia gazelor, pH-ul, umiditatea și calitatea aerului, orice corecție după perturbarea mediului implică o fază de echilibrare înainte de atingerea punctului de referință și apoi stabilizarea într-un interval acceptabil de toleranță (Swain, 2010).

Există o varietate de factori care influențează stabilitatea mediului de cultură, nu în ultimul rând este frecvența de deschidere/închidere a ușii incubatorului sau a capacului , in functie de tipul incubatorului. Aceste deschideri/închideri pot fi reduse la minimum, asigurându-se că există un număr adecvat de incubatoare de cultură pentru volumul de cazuri și prin existența unor incubatoare dedicate activităților non-culturii, cum ar fi echilibrarea placilor, preparatele de spermă etc. este recomandat ca fiecare compartiment al incubatorului sa acomodeze un singur pacient Un astfel de principiu nu numai că reduce deschiderea/închiderea ușii, dar reduce și probabilitatea de amestecare a probelor. De asemenea se recomanda ca pregatirea placilor de cultura se fie efectuata in loturi și nu toate deodată.

In ceea ce priveste incubatoarele exista diferite avantaje si dezavantaje , la fiecare tip si sau model, referitoare la controlul temperaturii sau masurarea si controlul uniditatii ( Swain,2014).

În plus, cerința critică referitoare la concentratiile gazului , la stabilitatea si puritatea mediului interior aduce atât avantaje, cât și dezavantaje în utilizarea fie a gazului pre-amestecat, fie a unui gaz care este reglat de incubator. Indiferent de tipul de alimentarea cu gaz utilizată, filtrele în linie sunt recomandate pentru îndepărtarea diferitelor toxine cunoscute, inclusiv VOC, praf, bacterii etc., iar sursele de gaz de rezervă ar trebui să fie disponibile pentru utilizare. Incubatoarele ar trebui monitorizate individual folosind indicatori cheie de performanță.

Pentru performante optime in ceea ce priveste incubatoarele este necesara :

1. Întreținerea preventivă, care trebuie efectuată cel puțin anual. Aparatul trebuie oprit și, dacă nu este un incubator care poate fi sterilizat la căldură uscată ridicată, camera trebuie dezasamblată conform recomandărilor producătorului. Toate componentele, precum și camera interioară, trebuie curățate temeinic cu un săpun ușor diluat de la producători specializați pentru utilizare in FIV, deși pot fi găsite urme de reziduuri chiar și după clătirea temeinică cu apă deionizată și sterilizarea cu peroxid de hidrogen . Peroxidul de hidrogen poate fi folosit în locul săpunului , deoarece elimină proteinele și alte reziduuri. Sterilizarea reușită poate fi obținută folosind atât curățarea cu săpun ușor diluat, cât și ciclurile de sterilizare sau peroxidul de hidrogen în sine. Curățarea camerelor time-lapse trebuie efectuată cu mare grijă și trebuie urmate instrucțiunile producătorului. Se recomandă ventilarea camerei înainte ca aparatul să fie repornit pentru recalibrare. Pe lângă curățare, senzorii de gaz trebuie verificați în raport cu standardele certificate și temperatura calibrată cu un termometru calibrat sau efectuată de compania cu care aveti contract de service si mentenanta. Termometru se calibreaza anual.

2.Funcționarea zilnică, trebuie să implice implementarea unui program de QC robust și verificat , minimizarea deschiderilor ușilor/capacului și stabilității electrice( fiind echipament critic trebuie ca fie cuplat la sursa neintreruptibila de curent si cuplat deasemenea la grup electrogen. Toate incubatoarele ar trebui să fie conectate la un sistem de alarmă care este testat în mod regulat pentru funcționalitate și care trimite alarme printr-un arbore telefonic catre personal in cazul depasirii intervalelor de siguranta, pentru a permite un răspuns rapid.

*Monitorizarea continuă independentă a parametrilor critici ai infrastructurii și echipamentelor de lucru este bligatorie pentru autoritățile de acreditare.*

*Validarea echipamentului in sensul funcționarii conform specificațiilor este efectuată în mod normal de producător sau de agentul acestuia, în momentul instalării („Calificarea instalării”). Verificarea specificațiilor cerințelor utilizatorului și a performanței echipamentului este efectuată de utilizator după instalare și înainte de prima utilizare („Calificarea operațională”) și din nou la intervale regulate, inclusiv după întreținere sau reparare („Calificarea performanței”). În aceste cazuri, scopul este de a stabili că performanța echipamentului se încadrează în intervalele de toleranță acceptate ale specificațiilor sale (ISO 15189:2012; Mortimer și Mortimer, 2015).*

*Echipamentele de monitorizarepentru parametrii spatiului sau a mediul de cultură trebuie să fie certificate și calibrate conform recomandărilor producătorului. În absența recomandărilor, calibrările ar trebui efectuate de cel puțin două ori pe an sau mai des, dacă este necesar, pentru a asigura continuitatea adecvată a scopului.*

**Embriotransferul (ET)**

Embriotransferul este procedeul prin care embrionii selectați sunt introduși în cavitatea uterină sub ghidaj ecografic.

Criteriile de selecție ale embrionilor includ stadiul de dezvoltare și aspectul morfologic. De asemenea, pot fi incluse între criteriile de evaluare și rezultatele obținute prin cultivarea folosind sistemul time-lapse.

In conformitate cu Ghid de bună practică în infertilitate (ORDIN nr. 1.241 din 9 august 2019 anexa 30) si prezentele recomandari ca si Strategie de embriotransfer avem urmatoarele recomandari:

5.5.1. Se recomandă efectuarea embriotransferului sub ghidaj ultrasonografic transabdominal, întrucât s-a demonstrat că această tehnică duce la creșterea ratei de sarcină.

5.5.2. Plasarea unui embrion în cavitatea uterină cu un endometru sub 5 mm grosime este puțin probabil să ducă la sarcină și de aceea nu este recomandată.

5.5.3. Se recomandă informarea femeilor că repausul la pat mai mult de 20 de minute după embriotransfer nu îmbunătățește rezultatele tratamentului.

5.5.4. Se recomandă ca evaluarea calității embrionilor, atât în stadiul de perioada de segmentare(clivaj) cât și de blastocist să se facă în concordanță cu Gardner Blastocyst Grading Scale ( a se vedea capitolul de evaluare embrionara).

5.5.5. Embrioselecția pentru transferul unui singur embrion este încă perfectibilă, ea bazându-se în momentul actual pe evaluarea stadiului de dezvoltare și a morfologiei embrionare. Aceste caracteristici sunt relevante pentru a potențialul implantațional, deși acuratețea predictivă este relativ slabă.

Cu toate acestea, pentru a preveni complicațiile serioase legate de sarcinile multiple, în majoritatea situațiilor clinice se încurajează transferul electiv al unui singur embrion selecționat morfologic ca fiind de calitate superioară (eSET-Elective Single Embryo Transfer):

Pentru femeile sub 37 ani:

– În primul ciclu complet de FIV folosiți la embriotransfer un singur embrion.

– În al doilea ciclu complet de FIV folosiți la embriotransfer un embrion unic dacă sunt disponibili 1 sau mai mulți embrioni de calitate superioară.

– Luați în considerare 2 embrioni pentru embriotransfer dacă nu există cel puțin 1 embrion de calitate superioară.

– În al treilea ciclu complet de FIV transferați nu mai mult de 2 embrioni per embriotransfer.

Pentru femeile cu vârsta între 37 - 39 ani:

– În primul și al doilea ciclu complet de FIV utilizați pentru transfer 1 singur embrion, dacă există disponibili 1 sau mai mulți embrioni de calitate superioară.

– Luați în considerare embriotransferul a 2 embrioni dacă nu există 1 sau mai mulți embrioni de calitate.

– La al treilea ciclu complet de FIV nu transferați mai mult de 2 embrioni.

Pentru femeile cu vârsta 40-42 ani:

– Luați în considerare transferul a 2 embrioni, dar dacă există blastocist de calitate disponibil utilizați transferul unui singur blastocist, cel puțin pentru primul embriotransfer.

Pentru femeile în tratament FIV cu ovocite donate se recomandă utilizarea unui singur embrion pentru transfer intrauterin deoarece această strategie se bazează pe vârsta tânără a donatoarei de ovocite.

Aspecte esențiale

1. Nu se recomandă transferul a mai mult de 2 embrioni per embriotransfer.

2. Dacă există disponibil un blastocist de calitate se recomandă transferul electiv al unui singur blastocist, cel puțin la femeile de până în 42 de ani care se află la primul ciclu de tratament.

3. În cazul unui embriotransfer cu 2 embrioni se recomandă să le fie explicate cuplurilor riscurile legate de apariția sarcinii multiple.

4. Se recomandă crioprezervarea pentru stocarea oricărui embrion de calitate bună, rămas după realizarea embriotransferului. Embrionii supranumerari se recomanda a fi crioprezervati cate unul maxim 2 per unitate sau eliminați în funcție de decizia cuplului, proceduri interne și legislatie.Se recomanda eliminarea embrionilor nevalidati

5. Se recomandă informarea femeilor cu cicluri ovulatorii care urmează să parcurgă un transfer de embrioni crioprezervați, că șansa de naștere după transferul unui embrion decongelat este similară între transferul pe ciclu natural și cel într-un ciclu de substituție hormonală.

6.Pentru efectuarea embriotransferului se recomandă:

-identificare pacientei /dubla verificare

-verificarea consimțămintelor informate scrise cu privire la numarul de embrioni transferați/crioprezervati

-notarea orei embriotransferului și a timpului scurs de la inseminarea ovocitelor la embriotransfer.

-notarea numărului și calitatății embrionilor care urmează a fi transferați

-notarea numelui persoanei din banca care efectuează embriotransferul

-notarea numelui medicului care efectuează embriotransferul

-notarea tipului de cateter folosit

-notarea detaliilor legate de embriotransfer:

* prezența sângelui sau a mucusului în cateter
* dificultăți întâlnite în efectuarea acestuia
* numărul de încercări necesare pentru ca embrionul/embrionii să fie introduși în cavitatea uterină.
* timpul efectiv pentru realizarea embriotransferului.

Se consideră că există suficiente dovezi pentru a recomanda:

* efectuarea embriotransferului sub ghidaj ecografic
* folosirea cateterului de tip “soft”

și pentru a nu recomanda

* repaus la pat după embriotransfer.

Introducerea in datelor in Registrul National de Transplant si notarea codului CUIANT pe toata documentatia aferenta.

Folosirea mediilor imbogățite cu acid hialuronic pentru embriotransfer poate fi folosit insă calitatea dovezilor existente la ora actuală este moderată.

A se vedea capitolul de evaluare embrionara in vederea selectiei pentru ET.

Evaluarea calității embrionilor este recomadabil să se facă la mărire 400X (se poate face și la 200X) folosind un microscop inversat cu optică Hoffman sau echivalentă.

Dacă embriotransferul se face pe parcursul segmentării, evaluarea calității embrionilor ar trebui să includă:

numărul de blastomere,

dimensiunea blastomerelor,

simetria acestora,

procentul de fragmentare,

prezența granulațiilor, vacuolelor și

prezența a mai multor nuclei/blastomer (multinucleație).

**CAPITOLUL 12. CRIOPREZERVAREA MATERIALULUI BIOLOGIC REPRODUCTIV**

**Definiții**

**Congelare lenta (decongelare lentă)**

O reducere treptată a temperaturii, de obicei la viteze de -0,1 până la -3 ° C/min, la -30 ° C sau mai puțin înainte de depozitarea în azot lichid la -196 ° C. Formarea cristalelor de gheață are loc extracelular.

**Vitrificarea (devitrificare)**

 O reducere a temperaturii, de obicei la viteze mai mari de -2.500°C/min, înainte de depozitarea în azot lichid la -196°C si presupune formarea unui solid amorf sau a unei stări asemănătoare sticlei (necristalină). Vitrificarea depinde de viteza de răcire și de compoziția soluției de vitrificare.

**Decongelarea**

Denumită în mod obișnuit, dar incorect, „dezghețare” sau „reîncălzire”, se referă la creșterea relativ rapidă a temperaturii celulelor stocate în azot lichid până la temperatura camerei sau mai sus în condițiile definite prin protocoalele de lucru .

**Cui se adreseaza**

Crioprezervarea poate fi realizată pentru gameți, embrioni și țesuturi reproductive ( tesut ovarian/testicular).

Crioprezervarea se face cu ajutorul echipamentelor specifice, în spații adecvate pentru crioprezervarea și stocarea materialului biologic.

Principalele abordări de crioprezervare sunt congelarea lentă și vitrificarea, în funcție de tipul de material biologic.

* + - Pentru crioprezervarea spermei ambele metode se pot utiliza cu succes; se recomandă vitrificarea ca alternativă eficienta fata de metoda congelarii lente.
		- Pentru ovocite metoda de crioprezervare recomandată este vitrificarea. Pentru embrioni și blastociști s-au raportat rate ridicate de succes atunci când s-a utilizat vitrificarea.
		- Pentru embrionii la stadiul de pronuclei sau în faza de blastomere, congelarea lentă poate fi o opțiune, dar cu un grad inferior de menținere a viabilității în comparație cu vitrificarea.
		- Pentru țesuturile reproductive (ovarian/testicular) metoda preferată este congelarea lentă, dar vitrificarea țesutului ovarian constituie și ea o opțiune. Pentru tesutul testicular se recomandă vitrificarea ca alternativă eficienta fata de metoda congelarii lente.

**Alegerea materialului biologic**

Crioprezervarea este realizata in cazuri selectionate.

In cazul probelor de sperma se evalueaza eşantionul de sperma/ tesut testicular pentru motilitate, progresie, morfologie si prezenta celulelor sexuale si se determina adecvarea mostrei pentru congelare, bazat pe analiza probei şi antecedentele pacientului.

In cazul ovocitelor si embrionilor se evalueaza calitatea acestora si se realizeaza repartizarea acestora pe paietele de congelare. Pentru vitrificarea ovocitelor, acestea se denudeaza in prealabil si se observa gradul de maturare si diferite aspecte ale morfologiei acestora.

In cazul tesului ovarian se recomanda respectarea protocoalelor specifice si stocarea probelor in recipiente in sistem deschis sau inchis.

**Verificarea consimtamintului informat al pacientilor**

Nici un eşantion de material biologic reproductiv nu trebuie să fie crioprezervat până nu a fost completat si verificat un formular adecvat de consimţământ din partea pacientilor . Consimtamintele se stocheaza la dosarul pacientului si se pot arhiva sau scana in bazale de date electonice.

**Medii si dispozitive de crioprezervare:**

Medii de crioprezervare

Se recomanda folosirea soluțiilor/ mediilor validate de crioprezervare și decongelare/devitrificare, precum și dispozitive validate de crioprezervare. Compoziția soluțiilor de crioprezervare și decongelare/devitrificare ar trebui să fie cea asociată cu rezultate optime. Se recomanda folosirea mediilor speciale, gata preparate, ce detin marcaj CE.

Vitrificarea celulelor spermatice se face prin utilizarea mediilor de vitrificare cu un continut ridicat de substante crioprotectoare bazat pe glicerol care protejeaza celula spermatica de formarea cristalelor de gheata si mentin integritatea si functiile acesteia.

Pentru ovocite si embrioni se recomanda soluții gata preparate ce contin DMSO, cât și non-DMSO, ambele reprezentand opțiunile actuale cele mai viabile pentru vitrificarea ovocitelor și embrionilor umani, supuse unor controale riguroase in privinta toxicitatii potențiale a crioprotectanților.

Dispozitive de crioprezervare

Materialele biologice pot fi stocate in sisteme deschise sau inchise, cu un grad ridicat de securitate.

**Reguli de biosecuritate** (vezi si capitolul manipularea materialului biologic)

Inaintea procedurii de crioprezervare se recomanda screeningul serologic pentru HIV, Hepatita B/C, VDRL.

Materialul biologic provenind de la pacienți sero-pozitivi se manipuleaza cu atenție si va fi stocat în dispozitive în sistem deschis sau în dispozitive în sistem închis, cu un grad ridicat de securitate.

Se recomandă recipiente de stocare dedicate, cu azot lichid sau în stare de vapori, ce permit stocarea in carantina,

Pentru crioprezervarea materialului biologic de la pacienții COVID-19 pozitivi se recomanda utilizarea de dispozitive inchise de înaltă securitate și / sau tancuri de stocare în fază de vapori.

Deocamdată există o lipsă de consens privind siguranța legată de contactul direct al materialului biologic cu azotul lichid. Bancile de celule si tesuturi reproductive vor lua propriile decizii pe baza rezultatelor obținute, analizei riscurilor și reglementărilor în vigoare.

Nu exista o evidenta clara in a favoriza dispozitivele închise în detrimentul celor în sistem deschis.

Nu există rapoarte publicate de contaminare încrucișată reală a embrionilor crioconservați atunci când sunt utilizate sisteme de depozitare deschise. Nu a fost raportată nici o transmitere a bolii cauzată de contaminarea încrucișată mediată de azot lichid sau alte surse legate de crioprezervare.

Pentru minimizarea riscurilor de transmitere a infecțiilor prin intermediul azotului lichid se va evita contaminarea suprafeței externe a dispozitivelor de crioprezervare, la încărcarea acestora cu materialul biologic.

**Etichetarea probelor crioconservate** (vezi capitol etichetare, trasabilitate)

**Scopul**

Asigurarea identificarii complete, trasabilitatii si transferului in conditii de siguranta a probelor biologice crioprezervate, in scopul utilizarii ulterioare in proceduri de reproducere asistata .

**Cui se adreseaza**

* 1. Embrioni crioprezervati
	2. Ovocite crioprezervate
	3. Sperma crioprezervata
	4. Tesut testicular crioprezervat
	5. Tesut ovarian crioprezervat

Dispozitivele pentru crioprezervare trebuie să fie etichetate clar, utilizând etichete rezistente la temperaturi ultrajoase. Eticheta trebuie să conțină informații de identificare a pacientului și/sau un cod unic de identificare, tipul materialului biologic stocat, data stocării, cantitatea stocată, numărul procedurii.

Înregistrările fizice și electronice adiționale privind materialul biologic crioconservat vor include:

* datele de pe etichetă dispozitivelor;
* metoda de crioprezervare;
* data și ora crioconservării;
* operatorul;
* tipul de produs biologic stocat
* calitatea embrionilor și stadiul de dezvoltare;
* numărul de ovocite sau embrioni per dispozitiv;
* numărul dispozitivelor utilizate per pacient;
* localizarea probelor crioconservate (recipient, canistră, culoare paietă).
* SEC

**Decongelarea/devitrificarea probelor crioprezervate**

La decongelare, înregistrările privind materialul biologic vor include:

* numărul procedurii
* informații de identificare a pacientului și/sau un cod unic de identificare,
* tipul materialului biologic
* metoda folosita
* data și ora decongelarii
* operatorul;
* calitatea probei / evaluarea produsului biologic după decongelare;
* procedura pentru care a fost decongelata/devitrificata (Inseminare intrauterină, FIV, ICSI, embriotransfer sau în scopul distrugerii/eliminarii probelor biologice)

**Validarea si verificarea identităţii probelor crioprezervate**

Se recomandă dubla verificare a identității pacientului sau folosirea unui sistem electronic de verificare a trasabilitatii la realizarea următoarelor etape: transferul probelor în placa de crioprezervare, încărcarea dispozitivelor de crioprezervare etichetate, plasarea în recipientul de criostocare, scoaterea din recipientul de criostocare.

Pe durata stocării și manipulării materialului crioconservat este necesară menținerea condițiilor adecvate de lucru și siguranță. Temperatura de stocare in azot lichid trebuie menținuta in valori de sub -130 °C.

Se recomandă inventarierea periodică a conținutului recipientelor de criostocare, cu verificarea concordanței dintre conținutului acestora și informațiile scriptice documentate in format hartie sau in sistem electronic.

In conformitate cu OMS 1763/2007 stocarea ţesuturilor şi celulelor necesita:

 a) definirea scrisă a condiţiilor de stocare în localul unităţii;

 b) precizarea parametrilor de temperatură şi umiditate ai aerului încăperii şi controlul lor documentat. ;

Documentatia si inregistrarile se pastreaza pentru o perioadă de cel puţin 30 de ani

Donările de spermă, altele decât cele de la parteneri, vor fi ţinute în carantină pentru cel puţin 180 de zile, după care este necesară repetarea testelor. Dacă mostra de sânge este testată suplimentar prin tehnica amplificării acidului nucleic (NAT) pentru HIV, HBV şi HCV, testarea unei alte mostre nu este necesară. De asemenea, retestarea nu este necesară dacă procesarea include o etapă de inactivare validată pentru virusurile în cauză.

Donatorii trebuie să aibă rezultatele testelor negative pentru HIV 1 şi 2, HCV, HBV şi sifilis pe o mostră de ser sau plasmă, testări efectuate conform anexei nr. II, pct. 1.1. din ordin Pentru donatorii de spermă se efectuează în plus teste pentru Chlamydia pe o mostră de urină, prin tehnica amplificării acidului nucleic (NAT), rezultatul trebuind să fie negativ;

Pentru evaluarea procedurilor de cryoprezervare indicatorii cheie de performanță (KPI) sunt esențiali in cazul introducerii unei tehnici sau a unui proces.

Astfel incat se stabilesc, cel puțin standardele de competență, pentru monitorizarea continua a performanței ca parte a unui sistem de management al calității, ce pot ajuta atât in cadrul controlului intern al calității, cât și in asigurarea externă a calității, precum și pentru limitele superioare (nivelurile de referinta) și îmbunătățirea calității. Aproape toti indicatorii cheie de performanta( KPI) utilizati în mod obișnuit în crioconservarea gameților și embrionilor,fie prin congelare lentă sau vitrificare, se referă la ratele de supravietuire. Acestea sunt de obicei evaluate imediat după decongelare/devitrificare, fiind evaluate prin revenirea materialului biologic la funcţia aparent normală sau dupa caz, la continuarea dezvoltarii morfologice.

Pentru comparabilitate între bancile de celule si tesuturi reproductive, KPI-urile necesită

definiții precise și metode obiective, standardizate pentru determinarea lor. ( vezi capitolul managementul calitatii)

**CAPITOLUL 13. PREGATIREA PENTRU SITUATII DE URGENTA**

Fiecare unitate sanitara acreditata, respectiv fiecare spatiu prelucrare celule trebuie sa aiba implementat un plan de actiune pentru situatii de urgenta, elaborat in conformitate cu prevederile legale in vigoare la nivel national si local.

Planul pentru situatii de urgenta trebuie sa cuprinda actiunile si masurile necesare pentru gestionarea situatiilor de urgenta, pentru a putea asigura:

- siguranta personalului, precum si a altor categorii de persoane care se fla in incinta unitatii la momentul aparitiei unei situatii de urgenta;

- protejarea materialului biologic de origine umana (embrioni, ovocite, spermii) atat proaspat, cat si crioprezervat;

- limitarea pierderilor materiale (echipamente de lucru, consumabile) si a documentelor specifice laboratorului (rapoarte medicale, registre de lucru, fise pacienti)

Situatiile de urgenta sunt definite ca fiind:

- dezastre naturale: cutremur, razboi, furtuni devastatoare etc

- situatii specifice zonei: inundatii, incendii etc

- situatii specifice bancii: pana de curent, defectarea echipamentelor, pandemii care pot afecta starea de sanatate a personalului etc.

Obiective generale:

- cunoasterea riscurilor specifice unitatilor sanitare acreditate

- cunoasterea masurilor de prevenire a acestora

- pregatirea personalului in cazul producerii acestora

Obiective specifice

- elaborarea unui plan pentru situatii de urgenta specifice unitatilor sanitare acreditate

- desfasurarea unor programe de pregatire pentru situatii de urgenta

- desemnarea unor responsabili in luarea deciziilor in situatiile de urgenta

*13.1. Elaborarea planului pentru situatii de urgenta*

Planul pentru situatii de urgenta trebuie sa fie un plan strict si exact, cu pasi clari de urmat. Tot personalul unitatilor sanitare acreditate trebuie sa citeasca si sa cunoasca planul pentru situatii de urgenta. Actiunile desfasurate in situatii de urgenta sunt menite sa asigure: siguranta personalului si a altor categorii de persoane implicate, protectia materialului biologic de origine umana crioprezervat sau proaspat, limitarea pierderilor materiale si a documentelor importante.

*13.1.1. Siguranta personaluluisi a altor categorii de persoane implicate*

Siguranta personalului, precum si a altor persoane care se afla in unitatea sanitara acreditata in momentul aparitiei unei situatii de urgenta este prioritara.

I. In primul rand este obligatorie existenta unui plan de evacuare a cladirii. Personalul angajat trebuie sa cunoasca planul pentru situatii de urgenta si sa inteleaga responsabilitatea pe care o are fiecare in astfel de situatii (telefoane de urgenta, locul de adunare in situatii de urgenta, raportarea situatiilor de urgenta), Numerele de telefon sau alte date de contact ale autoritatilor locale menite sa intervina in situatii de urgenta este recomandat sa fie prezentate personalului angajat.

II. Pentru spatiul de stocare celule este necesar un sistem de averizare sonora si luminoasa in ceea ce priveste cantitatea de oxigen din aer si un sistem de suport al vietii (butelii de oxigen). Zona de crioprezervare si/sau stocare celule/tesuturi reproductive trebuie sa aiba posibilitate de ventilare directa catre afara.

III. Trebuie sa existe un contract de colaborare cu o unitate sanitara de nivel superior sau o alta unitate acreditata care poate prelua pacientii in cazul aparitiei unei situatii de urgenta sau a unor situatii neprevazute.

III. Este necesara numirea unui responsabil pentru situatii de urgenta. Responsabilul pentru situatii de urgenta trebuie sa fie o persoana instruita pentru a actiona in situatii de urgenta, care sa cunoasca planul cladirii si echipamentele existente si care sa fie capabila sa gestioneze o situatie de urgenta.

*13.1.2. Protejarea materialului biologic de origine umana (ovocite, spermii, embrioni) proaspat sau crioprezervat*

13.1.2.1. Material biologic crioprezervat

Este necesara elaborarea unui set de masuri suplimentare pentru a asigura mentinerea temperaturii de crioprezervare pana la depasirea situatiei de urgenta. Aceste masuri suplimentare trebuie sa aiba in vedere:

I. Existenta unui rezervor suplimentar cu azot lichid

II. Existenta unui contract cu un furnizor de azot lichid care sa asigure livrarea azotului lichid pe perioada situatiei de urgenta, cu mentiunea ca, in anumite situatii de urgenta, acest lucru nu este posibil

III. Depunerea tuturor eforturilor necesare pentru a asigura umplerea periodica cu azot lichid a tancurilor cu probe stocate, pe toata perioada starii de urgenta, cu mentiunea ca, in anumite situatii de urgenta, acest lucru nu este posibil

IV. Pastrarea in duplicat sau pe un server securizat a datelor de identificare a probelor stocate, precum si ale pacientilor care au probele stocate in cadrul unitatii sanitare

V. Anularea importului/exportului de embrioni sau gameti crioprezervati

VI. Existenta unui contract cu o alta unitate sanitara acreditata ca banca de stocare pentru transferarea in conditii corespunzatoare a materialului biologic in cazul unor situatii de urgenta care permit si necesita mutarea lor (dezastre naturale anuntate, incendii, inundatii).

In cazul transferului materialului biologic stocat la o noua locatie trebuie facute eforturi suplimentare pentru anuntarea pacientilor cu privire la noua locatie si intocmite rapoarte in acest sens.

In cazul in care materialul biologic este distrus sau compromis, pacientii vor fi instiintati si vor fi intocmite rapoarte in acest sens.

Consimtamintele de stocare semnate de catre pacienti trebuie sa contina o clauza cu privire la situatiile de urgenta, in care sa fie informati despre posibilitatea transferului materialului biologic si a documentelor insotitoare catre o unitate terta acreditata.

Pentru situatii de urgenta de nivel national (ex. razboi) poate exista un contract de colaborare cu o unitate sanitara acreditata din spatiul european.

13.1.2.2. Material biologic proaspat

In cazul in care apare o situatie de urgenta intre momentul punctiei si cel al embriotransferului, optiunile privind transferul, crioprezervarea sau abandonarea ciclului trebuie discutate cu pacientii. In functie de natura situatiei de urgenta se ia cea mai buna masura.

Masuri recomandate in cazul aparitiei unei situatii de urgenta in timpul procedurilor de laborator:

|  |  |
| --- | --- |
| **Procedura de lucru** | **Masura recomandata** |
| Punctie | - anularea ciclului;- directionarea spre un alt centru; |
| IVF/ICSI | - congelare ovocite; |
| Verificarea fecundarii | - nu se efectueaza, se lasa in cultura; |
| Cultura de embrioni | - vitrificare embrioni;- se lasa embrionii in cultura pana in ziua 5; |
| Diagnostic preimplantational | - se vitrifica toti embrionii;- se amana testele de ziua 3 pentru ziua 5; |
| Embriotransfer | - se amana ET de ziua 2,3 pentru ziua 5;- se anuleaza ET si se vitrifica toti embrionii; |
| Vitrificare embrioni | - se amana pentru ziua 5; |

Consimtamintele pentru includerea in programul de Reproducere Umana Asistata trebuie sa contina o clauza cu privire la situatiile de urgenta.

*13.1.3. Siguranta documentelor si a echipamentelor de lucru*

13.1.3.1 Siguranta documentelor

I. Este necesara stabilirea unui sistem bine definit de documentare, inregistrari ale datelor si arhivare. Accesul la inregistrari si documentatie trebuie sa fie restrictionat , fiind permis numai persoanelor autorizate.

I. Este necesar un back-up periodic al datelor pacientilor cu inregistrarea istoricului modificarilor.

II. Se impun masuri pentru garantarea securitatii datelor si impiedicarea modificarilor neautorizate in fisierele unitatii acreditate.

III. Pentru a evita pierderea de date privind activitatea unitatii sanitare si inregistrari de probe si pacienti se recomanda arhivarea in doua modalitati diferite: atat in format electronic, cat si pe suport hartie intr-o forma lizibila. Arhiva cu documente trebuie sa permita un acces facil pentru mutarea rapida a documentelor in caz de situatii de urgenta.

13.1.3.2 Siguranta echipamentelor

I. Echipamentele de lucru trebuie revizuite periodic si este necesara intocmirea unor rapoarte care sa ateste validarea lor.

II. Este necesara monitorizarea continua a parametrilor din spatiul de prelevare, prelucrare si stocare celule si echiparea cu sisteme de alarma pentru parametrii critici.

III. In cazul fluctuatiilor de curent electric sau a intreruperii alimentarii cu energie electrica pe o perioada mai indelungata, este necesara existenta unui generator de energie auxiliar, care sa alimenteze echipamentele si aparatura din spatiul de prelucrare celule.

VI. Pentru echipamentele considerate cruciale pentru desfasurarea activitatii in spatiul de prelucrare celule (ex. incubator) se recomanda existenta unor echipamente de rezerva care sa fie validate si conforme cu normele in vigoare.

13.2 Desfasurarea unor programe de pregatire pentru situatii de urgenta

Programele de pregatire pentru situatii de urgenta au in principal urmatoarele obiective:

I. Asigurarea cunoaşterii de către persoanele instruite a sarcinilor şi atribuţiilor ce le revin premergător, pe timpul şi după apariţia unei situaţii de urgenţă;

II. Crearea unui cadru unitar şi coerent de acţiune pentru prevenirea şi gestionarea riscurilor generatoare de situaţii de urgenţă şi asigurarea unui răspuns optim în caz de urgenţă, adecvat fiecărui tip de risc identificat;

III. Stabilirea concepţiei de intervenţie în situaţii de urgenţă şi elaborarea planurilor operative.

Evidenţa participării la pregătire şi a rezultatelor obţinute în urma verificărilor se ţine la nivelul fiecărei unitati care a organizat pregătirea, de către personalul desemnat să gestioneze documentaţia specifică.

13.3 Desemnarea unor responsabili in luarea deciziilor in situatiile de urgenta

Este necesara numirea unui responsabil pentru situatii de urgenta. Responsabilul pentru situatii de urgenta trebuie sa fie o persoana instruita pentru a actiona in situatii de urgenta, care sa cunoasca planul cladirii si aparatura de lucru si care sa fie capabila sa gestioneze o situatie de urgenta.

Principalele atributii ale persoanei desemnata ca responsabil pentru situatiile de urgenta:

- evalueaza situatia de urgenta

- decide asupra masurilor organizatorice necesare managementului optim al crizei

- coordoneaza evacuarea persoanelor implicate, in caz de nevoie

- evalueaza aparatura disponibila si starea de functionare a echipamentelor

- deruleaza apeluri catre organele abilitate sa intervina in situatii de urgenta

- desemneaza persoane pentru materializarea masurilor de rezolvare a situatiei de urgenta

**GLOSAR**

**Anomalii congenitale:** toate anomaliile structurale, funcționale și genetice diagnosticate la feții avortați, la naștere sau în perioada neonatală.

**ANT:** Agenția Națională de Transplant

**Avort indus:** întreruperea unei sarcini clinice care are loc înainte de împlinirea a 24 de săptămâni complete de vârstă gestațională (18 săptămâni după fertilizare) sau, dacă nu se cunoaște vârsta gestațională, a unui embrion/făt de mai puțin de 500 de grame. Dupa finalul primului trimestru, intreruperea sarcinii este permisa doar in scop terapeutic.

**Avort spontan recurent:** pierderea spontană a două sau a mai multe sarcini clinice, consecutiv.

**Avort spontan:** pierderea spontană a unei sarcini clinice care are loc înainte de împlinirea a 24 de săptămâni complete de vârstă gestațională (18 săptămâni după fertilizare) sau, dacă nu se cunoaște vârsta gestațională, a unui embrion/făt de mai puțin de 500 de grame.

**Blastocist:** un embrion, la cinci sau șase zile după fertilizare, cu o masă celulară internă, strat exterior de trofectoderm și o cavitate blastocel umplută cu lichid.

**BOP:** Boala Ovarelor Polichistice.

**Chirurgie reproductivă:** proceduri chirurgicale efectuate pentru a diagnostica, conserva, corecta și/sau îmbunătăți funcția reproductivă.

**Ciclu anulat:** un ciclu ART în care stimularea sau monitorizarea ovariană a fost efectuată cu intenția de a trata, dar nu s-a ajuns la aspirație foliculară sau, în cazul unui embrion decongelat, nu s-a efectuat transferul embrionului.

**Ciclu de de donare de ovocite:** un ciclu ART în care pacienta primește ovocite de la un donator.

**Ciclu de donare a ovocitelor:** un ciclu în care ovocitele sunt colectate de la un donator sunt fertilizate și, ulterior, embrionul transferat.

**Ciclu de donare de spermă:** un ciclu ART în care o pacientă primește spermatozoizi de la un donator care este altcineva decât partenerul ei.

**Ciclu inițiat:** un ciclu ART în care pacienta primește medicamente specifice pentru stimularea ovariană sau monitorizare în cazul ciclurilor naturale, cu intenția de a trata, indiferent dacă se încearcă sau nu aspirația foliculară.

**Ciclu natural IVF:** o procedură de IVF în care unul sau mai multe ovocite sunt colectate din ovare în timpul unui ciclu menstrual spontan fără administrarea de medicamente.

**Ciclu natural modificat:** o procedură IVF în care unul sau mai multe ovocite sunt colectate din ovare în timpul unui ciclu menstrual spontan. Medicamentele sunt administrate cu singurul scop de a bloca creșterea spontană a LH și/sau de a induce maturarea finală a ovocitelor.

**Ciclul de transfer de embrioni congelați/dezghețați (FET):** o procedură ART în care se efectuează monitorizarea ciclului cu intenția de a transfera un embrion înghețat/dezghețat sau mai mulți embrioni congelați/dezghețați. Notă: Un ciclu FET este inițiat atunci când se administrează medicație specifică sau când se începe monitorizarea ciclului cu intenția de a trata.

**Ciclul de transfer embrionar:** un ciclu ART în care unul sau mai mulți embrioni sunt transferați în uter.

**Ciclul ovocitelor înghețate/dezghețate:** o procedură ART în care se efectuează monitorizarea ciclului cu intenția de a fertiliza ovocitele dezghețate și de a efectua transferul embrionar.

**Congelare lenta (decongelare lentă):** o reducere treptată a temperaturii, de obicei la viteze de -0,1 până la -3 ° C/min, la -30°C sau mai puțin înainte de depozitarea în azot lichid la -196°C. Formarea cristalelor degheață are loc extracelular.

**Crioconservare:** înghețarea sau vitrificarea și stocarea gameților, zigoților, embrionilor sau țesutului gonadal.

**Deces neonatal precoce:** decesul unui copil născut viu în termen de 7 zile de la naștere.

**Deces neonatal:** decesul unui copil născut viu în primele 28 de zile de la naștere.

**Decesul fătului (copil născut mort):** moartea înainte de expulzia completă sau extragerea din mamă a unui produs de fertilizare la cel puțin 24 de săptămâni complete de vârstă gestațională. Decesul este indicat de faptul că, după o astfel de separare, fătul nu respiră și nu prezintă alte semne de viață, cum ar fi bătăi ale inimii, pulsația cordonului ombilical sau mișcarea voluntară a mușchilor.

**Decongelarea:** Denumită în mod obișnuit, dar incorect, „dezghețare” sau „reîncălzire”, se referă la creșterea relativ rapidă a temperaturii celulelor stocate în azot lichid până la temperatura camerei sau mai sus în condițiile definite prin protocoalele de lucru.

**Denudarea ovocitelor:** inlaturarea complexului celular – cumulus si corona radiata, din jurul ovocitului.

**Diagnostic genetic preimplantare (PGD):** analiza corpurilor polare, blastomerilor sau trofectodermului din ovocite, zigoți sau embrioni pentru a depista modificările genetice, structurale și/sau cromozomiale specifice.

**Donarea de embrioni:** transferul unui embrion rezultat din gameți (spermatozoizi și ovocite) care nu provin de la pacienta primitoare și de la partenerul acesteia.

**Ecloziune asistată a embrionului:** o procedură în vitro în care zona pelucida a embrionului este, fie subțiată, fie perforată prin metode chimice, mecanice sau cu laser pentru a ajuta la separarea blastocistului.

**Ecloziune:** procesul prin care un embrion în stadiul de blastocist se separă de zona pelucida.

**Embrion:** produsul diviziunii zigotului până la sfârșitul stadiului embrionar, la opt săptămâni după fertilizare.

**Embriotransfer**: procedeul prin care embrionii selectați sunt introduși în cavitatea uterină sub ghidaj ecografic.

**eSET**: transfer electiv al unui singur embrion.

**Făt:** produsul fertilizării de la finalizarea dezvoltării embrionare, la opt săptămâni complete după fertilizare, până la avort sau naștere.

**Fertilizare:** pătrunderea spermatozoizilor în ovul și combinarea materialului genetic al acestora care conduce la formarea unui zigot.

**Fertilizarea în vitro (IVF):** o procedură ART care implică fertilizarea extracorporeală.

**Gestație/naștere multiplă:** o sarcină/naștere cu mai mult de un făt/nou-născut.

**Greutate extrem de redusă la naștere:** greutate la naștere mai mică de 1.000 de grame.

**Greutate mică la naștere:** Greutate la naștere mai mică de 2.500 de grame.

**HEPA:** filtre de control al aerului cu mare eficiență.

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus (virusul imunodeficienței umane)

**HPV:** Human Papilloma Virus (virusul papilloma uman)

**HVB:** hepatita virală B

**HVC:** hepatita virală C

**ICSI:** apartine microtehnicilor si este inserarea mecanica a spermatozoidului in citoplasma ovocitului

**IMC:** Index de Masă Corporală

**Implantare:** atașarea și penetrarea ulterioară a blastocistului fără zona pelucida (de obicei în endometru) care începe la cinci până la șapte zile după fertilizare.

**Inducerea ovulației (OI):** tratamentul farmacologic aplicat pacientelor cu anovulație sau oligo-ovulație cu intenția de a induce cicluri ovulatorii normale.

**Infertilitate (definiție clinică):** o boală a aparatului reproducător definită de eșecul obținerii unei sarcini clinice după 12 luni de relații sexuale regulate neprotejate, iar după vârsta de 35 ani intervalul este de 6 luni.

**Injectarea intra-citoplasmatică a spermei (ICSI):** o procedură prin care un singur spermatozoid este injectat în citoplasmă ovocitelor.

**IUI:** Inseminare Intrauterină

**IVM:** Maturarea în vitro a ovocitelor.

**LPS:** susținerea fazei luteale.

**MACS**: selectarea celulelor prin activare magnetica – metoda permite indepartarea spermatozoizilor in curs de apoptoza, permitand recuperarea spermatozoizilor non-apoptotici pentru utilizare;

**Mama purtătoare (surogat):** o pacientă care poartă o sarcină cu acordul că va ceda produsul nașterii viitorului(ilor) părinte(ți). Gameții pot proveni de la viitorul(ii) părinte(ți)și/sau de la o terță parte (sau părți).

**MEA:** testarea embrionilor de șoareci

**MESA:** Aspirație microchirurgicală a spermei epididimare.

**MESE:** Extragerea microchirurgicală a spermei epididimare.

**Mic pentru vârsta gestațională:** greutatea la naștere mai mică decât 2 deviații standard sub medie sau mai mică decât centila a 10-a, conform graficelor locale de creștere intrauterină.

**Micromanipulare:** o tehnologie care permite efectuarea unor mici proceduri chirurgicale pe spermatozoizi, ovocite, zigoți sau embrioni.

**MicroTESE:** Extracție microchirurgicală a spermei testiculare.

**Mortalitate perinatală:** deces fetal sau neonatal care apare în timpul sarcinii târzii (după 20 de săptămâni de vârstă gestațională complete), în timpul nașterii și până la 7 zile complete după naștere.

**Naștere a unui copil viu:** expulzia sau extragerea completă de la mama sa a unui produs de fertilizare, indiferent de durata sarcinii, care, după separare, respiră sau prezintă orice alte semne de viață, precum bătăi ale inimii, pulsația cordonului ombilical ori mișcarea voluntară a mușchilor, indiferent dacă cordonul ombilical a fost tăiat sau dacă placenta este atașată.

**Naștere prematură precoce:** nașterea unui copil viu sau mort care are loc între săptămânile a 24-a și a 28-a de vârstă gestațională.

**Naștere prematură:** nașterea unui copil viu sau mort între săptămânile a 24-a și a 37-a complete de vârstă gestațională.

**Naștere supramaturată:** nașterea unui copil viu sau mort care are loc după 42 de săptămâni complete de vârstă gestațională.

**Naștere:** expulzia sau extragerea unuia sau a mai mulți feți de la mamă după 24 de săptămâni complete de vârstă gestațională.

**Nașterea la termen:** nașterea unui copil viu sau mort care are loc între săptămânile a 37-ași a 42-a de vârstă gestațională.

**Perioada neonatală:** intervalul de timp care începe la naștere și se termină la 28 de zile după naștere.

**PESA:** Aspirarea percutanată a spermei epididimare.

**pHe**: pH-ul extracelular al mediului de cultură.

**pHi:** pH-ul intracelular al citoplasmei.

**PTA:** produs terapeutic anex.

**Rata cumulativă a nașterilor cu cel puțin un copil născut viu:** numărul estimat de nașteri cu cel puțin un copil născut viu rezultat dintr-un ciclu ART inițiat sau aspirat, inclusiv ciclul în care sunt transferați embrioni proaspeți și ciclurile ART ulterioare cu embrioni înghețați/decongelați. Această rată este utilizată atunci când un număr mai mic față de numărul total de embrioni proaspeți și/sau congelați/decongelați au fost utilizați dintr-un ciclu ART. Notă: Nașterea unui singur copil dintr-o sarcină uniovulară, a gemenilor sau alte sarcini multiple se înregistrează ca o singură naștere.

**Rata de implantare:** numărul de saci gestaționali observați, împărțit la numărul de embrioni transferați.

**Rata nașterilor de copii vii:** numărul de nașteri care au dus la cel puțin un copil născut viu, exprimat la 100 de cicluri inițiate, cicluri de aspirație sau cicluri de transfer embrionar. Când se menționează rata nașterilor, trebuie specificat numitorul (cicluri inițiate, aspirate sau de transfer embrionar).

**Rata nașterilor după tratamentul ART per pacient:** numărul de nașteri cu cel puțin un copil născut viu pentru fiecare pacient în urma unui număr specificat de tratamente ART.

**Rata nașterilor:** numărul de livrări exprimat la 100 de cicluri inițiate, cicluri de aspirație sau cicluri de transfer de embrioni. Când se menționează rata nașterilor, trebuie specificat numitorul (cicluri inițiate, aspirate sau de transfer embrionar). Aceasta include nașterile care au dus la nașterea unuia sau a mai mulți copii vii și/sau născuți morți. Notă: Nașterea unei singur copil dintr-o sarcină uniovulară, a gemenilor sau alte sarcini multiple se înregistrează ca o singură naștere.

**Rata sarcinilor clinice:** numărul de sarcini clinice exprimat la 100 de cicluri inițiate, cicluri de aspirație sau cicluri de transfer embrionar. Notă: Când se menționează rata sarcinilor clinice, trebuie specificat numitorul (cicluri inițiate, aspirate sau de transfer embrionar).

**Rata totală a nașterilor cu cel puțin un copil născut viu:** numărul total estimat de nașteri cu cel puțin un copil născut viu rezultat dintr-un ciclu ART inițiat sau aspirat, inclusiv toate ciclurile ART cu embrioni proaspeți și toate ciclurile ART cu embrioni înghețați/dezghețați. Această rată este utilizată atunci când au fost utilizați toți embrionii proaspeți și/sau congelați/dezghețați dintr-un ciclu ART. Notă: Nașterea unui singur copil dintr-o sarcină uniovulară, a gemenilor sau alte sarcini multiple se înregistrează ca o singură naștere.

**RCT:** studii clinice randomizate

**Reducerea embrionilor/feților:** o procedură de reducere a numărului de embrioni sau feți viabili într-o sarcină multiplă.

**Reproducere umană asistată medical (RUAM):** reproducerea produsă prin inducerea ovulației, stimularea ovariană controlată, declanșarea ovulației, proceduri ART și inseminarea intrauterină, intracervicală și intravaginală cu material seminal al soțului/partenerului sau donatorului.

**Sac gestațional:** o structură lichidiană asociată cu sarcina timpurie, care poate fi localizată în interiorul sau în afara uterului (în cazul unei sarcini ectopice).

**Sac(i) sau embrion(i) dispăruți:** dispariția spontană a unuia sau a mai mulți saci sau embrioni gestaționali într-o sarcină în curs, documentată ecografic.

**Sarcină biochimică (avort spontan preclinic/avort spontan):** o sarcină diagnosticată numai prin depistarea HCG în ser sau urină și care nu se transformă într-o sarcină clinică.

**Sarcina clinică cu bătăi cardiace fetale:** sarcină diagnosticată ecografic sau documentație clinică a cel puțin unui făt cu bătăi cardiace. Aceasta include și sarcină ectopică.

**Sarcina clinică:** o sarcină diagnosticată prin vizualizarea ecografică a unuia sau a mai mulți saci gestaționali sau prin semne clinice de sarcină evidente. Aceasta include și sarcină ectopică. Notă: sacii gestaționali multipli sunt considerați ca fiind o singură sarcină clinică.

**Sarcină ectopică:** o sarcină în care implantarea are loc în afara cavității uterine.

**Screening genetic preimplantare (PGS):** analiza corpurilor polare, blastomerilor sau trofectodermului din ovocite, zigoți sau embrioni pentru a depista aneuploidia, mutațiile și/sau rearanjarea ADN-ului.

**Sindrom de hiperstimulare ovariană (SHSO):** un răspuns sistemic exagerat la stimularea ovariană caracterizat printr-un spectru larg de manifestări clinice și de laborator. Este clasificat ca ușor, moderat sau sever, în funcție de gradul de distensie abdominală, de mărire a ovarelor și de complicații respiratorii, hemodinamice și metabolice.

**Stimulare ovariană ușoară pentru FIV:** o procedură în care ovarele sunt stimulate fie cu gonadotropine și/sau cu alți compuși, cu intenția de a limita numărul de ovocite obținute pentru FIV.

**Stimularea ovariană controlată (COS) pentru ART:** tratament farmacologic prin care pacientele sunt stimulate să inducă dezvoltarea foliculilor ovarieni multipli pentru a obține ovocite multiple la aspirația foliculară.

**Stimularea ovariană controlată (COS) pentru cicluri non-ART:** tratament farmacologic pentru paciente prin care ovarele sunt stimulate să producă mai mult de un ovocit.

**Tehnologie de reproducere asistată (ART):** toate tratamentele sau procedurile care includ manipularea în vitro a ovocitelor și a spermatozoizilor sau a embrionilor umani, în scopul obținerii unei sarcini. Aceasta include, dar fără a se limita la, fertilizarea în vitro și transferul embrionilor, transferul în interiorul trompei uterine al gameților și al zigoților, transferul tubar al embrionilor, crioconservarea gameților și embrionilor, donarea de ovocite și embrioni și mame purtătoare de sarcină. ART nu include inseminarea asistată (inseminarea artificială) folosind spermatozoizii fie de la partenerul unei paciente, fie de la un donator de spermatozoizi.

**TESA:** Aspirarea spermei testiculare.

**TESE:** Extracția spermei testiculare.

**Torsiune ovariană:** rotirea parțială sau completă a pediculului vascular ovarian care provoacă obstrucția fluxului sanguin ovarian și care poate duce la necrozarea țesutului ovarian.

**Transfer selectiv de embrioni:** transferul unuia sau al mai mulți embrioni, selectați dintr-o cohortă mai mare de embrioni disponibili.

**Transferul de embrioni (ET):** procedura în care unul sau mai mulți embrioni sunt introduși în uter sau trompa uterină.

**Vârsta gestațională:** vârsta unui embrion sau făt calculată prin adăugarea a 2 săptămâni (14 zile) la numărul de săptămâni complete de la fertilizare. Notă: Pentru transferurile de embrioni congelați/decongelați, se calculează o dată estimativă a fertilizării prin scăderea vârstei embrionului la îngheț din data transferului ciclului FET.

**Vitrificare:** O reducere a temperaturii, de obicei la viteze mai mari de -2.500°C/min, înainte de depozitarea în azot lichid la -196°C si presupune formarea unui solid amorf sau a unei stări asemănătoare sticlei (necristalină). Vitrificarea depinde de viteza de răcire și de compoziția soluției de vitrificare.

**BIBLIOGRAFIE**

A review of best practices of rapid-cooling vitrification for oocytes and embryos: a committee opinion. Fertil Steril. 2021 Feb;115(2):305-310. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.11.017. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33358335.

Actualizarea recomandarilor – masuri in domeniul RUA in contextul pandemiei SARS-COV-2 (2martie 2022) – Ministerul Sanatatii, Agentia Nationala de Transplant.

Agarwal A., Gupta S., & Sharma R., (2016). Andrologial Evaluation of Male Infertility. A Laboratory Guide. Editura Springer.

Albert C.Gonzalez N.Marcos J.Alegre L.Ruiz B.A.De Los Santos J.M.Meseguer M.The effect of high humidity culture conditions over embryo development: a continuous embryo monitoring assessment.Reprod. Biomed. Online. 2018; 37 (https://doi.org/): e15-e16https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.04.029

Ali J.Whitten W.K.Shelton J.N.Effect of culture systems on mouse early embryo development.Hum. Reprod. 1993; 8: 1110-1114

Allahbadia G., Kuwayama M., & Ganghi G. Vitrification in Assisted Reproduction (2015). A User’s Manual. Editura Springer.

Alper M.M, Brinsden P.R, Fischer R. et al, Is your IVF programme good? Human Reprod. 2002,17:8-10.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group of EmbryologyThe Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting.Reprod. Biomed. Online 22, 632–646 and Hum. Reprod. 2011; 26 (simultaneous publication): 1270-1283

Association of Clinical Embryologists – Guidelines on Good Practicein Clinical Embryology Laboratories 2012

Atiee S.H.Pool T.B.Martin J.E.A simple approach to intracytoplasmic sperm injection.Fertil. Steril. 1995; 63: 652-655

Babcock D.F.Pfeiffer D.R.Independent elevation of cytosolic [Ca2+] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms.J. Biol. Chem. 1987; 262: 15041-15047

Babcock D.F.Rufo Jr., G.A.Lardy H.A.Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1983; 80: 1327-1331

Barrie A.Homburg R.McDowell G.Brown J.Kingsland C.Troup S.Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms.Fertil. Steril. 2017; 107: 613-621

Bavister B.D.Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts.Hum. Reprod. Update. 1995; 1: 91-148

Bedaiwy M.A.Falcone T.Mohamed M.S.Aleem A.A.Sharma R.K.Worley S.E.Thornton J.Agarwal A.Differential growth of human embryosin vitro: role of reactive oxygen species.Fertil. Steril. 2004; 82: 593-600

Bedaiwy M.A.Mahfouz R.Z.Goldberg J.M.Sharma R.Falcone T.Abdel Hafez M.F.Agarwal A.Relationship of reactive oxygen species levels in day 3 culture media to the outcome ofin vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles.Fertil. Steril. 2010; 94: 2037-2042

Behr B.R.Stratton C.J.Foote W.D.Knutzen V.Sher G.In vitro fertilization (IVF) of mouse ova in HEPES-buffered culture media.J. In vitro Fert. Embryo Transf. 1990; 7: 9-15

Bhattacharyya A.Yanagimachi R.Synthetic organic pH buffers can support fertilization of guinea pig eggs, but not as efficiently as bicarbonate buffer.Gamete Res. 1988; 19: 123-129

Biggers J.D.McGinnis L.K.Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation developmentin vitro.Hum. Reprod. 2001; 16: 153-163

Biggers J.D.McGinnis L.K.Summers M.C.Discrepancies between the effects of glutamine in cultures of preimplantation mouse embryos.Reprod. Biomed. Online. 2004; 9: 70-73

Biggers J.D.Thoughts on embryo culture conditions.Reprod. Biomed. Online. 2002; 4: 30-38

Björndahl L.Mortimer D.Barratt C.L.R.Castilla J.A.Menkveld R.Kvist U.Alvarez J.G.Haugen T.B.A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology.Cambridge University Press, Cambridge, UK2010

Blomfield, S., 2011. Characterization of the physical environment of embryos throughoutin vitro culture: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy at Massey University, Palmerston North, New Zealand https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/6015/01\_front.pdf?sequence=1andisAllowed=y

Boatman D.E.Robbins R.S.Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions.Biol. Reprod. 1991; 44: 806-813

Bontekoe S.Blake D.Heineman M.J.Williams E.C.Johnson N.Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies.Cochrane Database Syst. Rev. 2010; (Available from:)CD007421 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20614459

Bontekoe S.Mantikou E.van Wely M.Seshadri S.Repping S.Mastenbroek S.Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies.Cochrane Database Syst. Rev. 2012; 7CD008950

Boone W.R, Johnson J.E., Locke A.J., Crone IV M.M., Price T.M., Control of air quality in an assisted reproductive tehnology laboratory. Fertil Steril. 1999, 71:150-4

Boone W.R, Jones J.M., Shapiro S.S., Using videotaped specimens to test quality control in a computer assisted semen analysis system. Fertil Steril. 2000; 73: 636-40.

Bounds, G. et al; Beyond Total Quality Management: Toward the Emerging Paradigm, MC Grow- Hillinc, NY, 1994.

Bungum M.Humaidan P.Bungum L.Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF: a prospective randomized study.Reprod. Biomed. Online. 2002; 4: 233-236

BUZZEL ROBERT D. L.,GALE BRADLEY , The Pims Principles: Linking Strategy to Performance , Free Press “[u.a.]”, 1987

Byrd S.R.Flores-Foxworth G.Applewhite A.A.Westhusin M.E.In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator.Theriogenology. 1997; 47: 857-864

Campbell A.Fishel S.Bowman N.Duffy S.Sedler M.Hickman C.F.L.Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics.Reprod. Biomed. Online. 2013; 26: 477-485

Chen M.Wei S.Hu J.Yuan J.Liu F.Does time-lapse imaging have favourable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinicalin vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials.PLoS One. 2017; 12e0178720https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178720

Ciray H.N.Campbell A.Agerholm I.E.Aguilar J.Chamayou S.Esbert M.Sayed S.Time-Lapse User GroupProposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group.Hum. Reprod. 2014; 29: 2650-2660

Cohen J, Alikani M. The time has come to radically rethink assisted reproduction. Reprod Biomed Online 2013;27:323–324.

Cohen J, Gilligan A, Willadsen S.  Culture and quality control of embryos. Hum Reprod. 1998;3(Suppl 3):137–44. PMID: 9755420; DOI: [10.1093/humrep/13.suppl\_3.137](https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_3.137)

Cohen J.Alikani M.Evidence-based medicine and its application in clinical preimplantation embryology.Reprod. Biomed. Online. 2013; 27: 547-561

Cohen J.Edwards R.Fehilly C.Fishel H.Hewitt J.Purdy J.Rowland G.Steptoe P.Webster J.In vitro fertilization: a treatment for male infertility.Fertil. Steril. 1985; 43: 422-432

Cohen J.Fehilly C.B.Walters D.E.Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator.Fertil. Steril. 1985; 44: 254-262

Cohen J.Rieger D.Historical background of gamete and embryo culture.Methods Mol. Biol. 2012; 912: 1-18

Cohen J.Simons R.F.Edwards R.G.Fehilly C.B.Fishel S.B.Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts.J. In vitro Fert. Embryo Transf. 1985; 2: 59-64

COMMISSION DIRECTIVE 2004/23 / CE 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 / CE 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

Cooke S.Tyler J.P.Driscoll G.Objective assessments of temperature maintenance usingin vitro culture techniques.J. Assist. Reprod. Genet. 2002; 19: 368-375

Council of Europe. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. 1st edn. 2013.

Crosby Philip (1979)., Quality is Free. New York: McGraw-Hill, ,. ISBM 0-07-014512-1

Cryopreserved reproductive tissues in the IVF laboratory: a committee opinion. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, Society for Reproductive Biologists and Technologists, and Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. , Published by Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.06.019

Cutting R.Morroll D.Roberts S.A.Pickering S.Rutherford A.on behalf of BFS and ACEElective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists.Hum. Fertil. 2008; 11: 131-146

D Mortimer , \*, J Cohen b , ST Mortimer , M Fawzy c , DH McCulloh d , DE Morbeck e , X Pollet-Villard f , RT Mansour g , DR Brison h , A Doshi i , JC Harper j , JE Swain k , AV Gilligan l) .Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting, Reprod Biomed Online,  2018 Jun;36(6):658-674. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.02.005. Epub 2018 Mar 2.

Dale B., Menezo Y., Cohen J., Di Matteo L., Wilding M., Intracelular PH regulation in human ovocyte. Hum. Reprod. 1998; 13-964-70.

Dattena M.Mara L.Bin T.A.Cappai P.Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan.Mol. Reprod. Dev. 2007; 74: 42-47

Davidson A, Vermesh M, Lobo R, Paulson R. Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization: the one-cell versus the two-cell model. Fertil Steril. 1988;49:516–21. 7. PMID: 3125070;

Dawson, D.A., Fort, D.J., Newell, D.L., and Bantle, J. A., Developmental Toxicity Testing with FETAX: Evaluation of Five Validation Compounds," Drug and Chemical Toxicology. Vol , 1987b, pp. 237-244

De los Santos M.J.Apter S.Coticchio G.Debrock S.Lundin K.Plancha C.E.Prados F.Rienzi L.Verheyen G.Woodward B.Vermeulen N.ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF LabsRevised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015).Hum. Reprod. 2016; 31: 685-686

Devreker F.Hardy K.Effects of Glutamine and Taurine on Preimplantation Development and Cleavage of Mouse Embryosin vitro.Biol. Reprod. 1997; 57: 921-928

Dewdney A.K.200% of nothing: an eye-opening tour through the twists and turn of math abuse and innumeracy.Wiley, 1993

Dickens C.J.Maguiness S.D.Comer M.T.Palmer A.Rutherford A.J.Leese H.J.Physiology: Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the Fallopian tube.Hum. Reprod. 1995; 10: 505-508

Dieamant F.Petersen C.G.Mauri A.L.Comar V.Mattila M.Vagnini L.D.Renzi A.Petersen B.Ricci J.Oliveira J.B.A.Baruffi R.L.R.Franco Jr., J.G.Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis.J.B.R.A. Assist. Reprod. 2017; 21: 240-246

Directiva Comisie Europene 2015/565/CE of 01 October 2015. Single European Code (SEC) for Tissues and Cells - EU Update

DIRECTIVE 2004/23/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

Downs S.M.Mastropolo A.M.Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes.Mol. Reprod. Dev. 1997; 46: 551-566

Dozortsev D.Nagy P.Abdelmassih S.Oliveira F.Brasil A.Abdelmassih V.Diamond M.Abdelmassih R.The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 h after administration of human chorionic gonadotrophin.Fertil. Steril. 2004; 82: 1492-1496

Dumollard R.Campbell K.Halet G.Carroll J.Swann K.Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes.Dev. Biol. 2008; 316: 431-440

Dumollard R.Ward Z.Carroll J.Duchen M.R.Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo.Development. 2007; 134: 455-465

Dumoulin J.C.M.van Wissen L.C.P.Menheere P.P.C.A.Michiels A.H.J.C.Geraedts J.P.M.Evers J.L.H.Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos.Biol. Reprod. 1997; 56: 739-744

Durairajanayagam D.Agarwal A.Ong C.Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress.Reprod. Biomed. Online. 2015; 30: 14-27

Eagle H.Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.Science. 1959; 130: 432-437

Eagle H.Buffer combinations for mammalian cell culture.Science. 1971; 174: 500-503

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. Fertil Steril 2005a;83:1635-1640.

Ebner T.Moser M.Shebl O.Mayer R.Tews G.Assistingin vitro fertilization by manipulating cumulus-oocyte-complexes either mechanically or enzymatically does not prevent IVF failure.J. Turkish-German Gynecol. Assoc. 2017; 12: 135-139

Ebner T.Moser M.Shebl O.Sommergruber M.Yaman C.Tews G.Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development.Reprod. Biomed. Online. 2008; 6: 801-807

Edwards L.J.Williams D.A.Gardner D.K.Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids.Mol. Reprod. Dev. 1998; 50: 434-442

Edwards R.G, Steptoe P.C, Pury J.M. , Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro, Br. J.Obst. et Ginecol., 87: 737-56 (1980).

Edwards R.G.Steptoe P.C.Current status of in-vitro fertilization and implantation of human embryos.Lancet. 1983; 322: 1265-1269

Edwards R.G.Steptoe P.C.Purdy J.M.Fertilization and Cleavagein vitro of Preovulatory Human Oocytes.Nature. 1970; 227: 1307-1309

El-Danasouri I.Selman H.Strehler E.Comparison of MOPS and HEPES buffers during vitrification of human embryos.Hum. Reprod. 2004; 14: i136

Elert G.Temperature of a healthy human body (body temperature).The Physics Factbook. 2015; ([citedAvailable from:)http://hypertextbook.com/facts/LenaWong.shtml

ESHRE Guideline Group on good practice in IVF labs December 2015

ESHRE position paper on the EU Tissues and Cells Directive EC/ 2004/23

ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive MedicineThe Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory key performance indicators.Hum. Reprod. 2017; (Open 201712 July 2017, hox011) (and Reprod. Biomed. Online 35(simultaneous publication)): 494-510https://doi.org/10.1093/hropen/hox011

European Committee on Organ Transplantation (CD-P-TO),EDQM-Guidance for root-cause analysis of non-satisfactory external quality assessment results

Evans J. ; Eguality, Education and Physical Education, Falmer Press, 1993.

Fawzy M.Emad M.AbdelRahman M.Y.Abdelghafar H.Abdel Hafez F.F.Bedaiwy M.A.Impact of 3.5% O2 culture on embryo development and clinical outcomes: a comparative study.Fertil. Steril. 2017; 108: 635-641

Fawzy M.Emad M.Gad M.A.Sabry M.Kasem H.Mahmoud M.Bedaiwy M.A.Comparing 36.5°C with 37°C for human embryo culture: a prospective randomized controlled trial.Reprod. Biomed. Online. 2018; 36: 620-626

Fawzy M.Sabry M.Nour M.Abdelrahman M.Y.Roshdy E.Magdi Y.Abdelghafar H.Integrating insulin into single-step culture medium regulates human embryo developmentin vitro.Fertil. Steril. 2017; 107: 405-412

Feigenbaum Armand V. , Total Quality Control, Revised, Volume 1,MCGRAW HILL BOOK Company, 1991

Ferguson W.J.Braunschweiger K.I.Braunschweiger W.R.Smith J.R.McCormick J.J.Wasmann C.C.Jarvis N.P.Bell D.H.Good N.E.Hydrogen ion buffers for biological research.Anal. Biochem. 1980; 104: 300-310

Fischer B.Bavister B.D.Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits.J. Reprod. Fertil. 1993; 99: 673-679

FitzHarris G.Baltz J.M.Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth.Development. 2006; 133: 591-599

FitzHarris G.Siyanov V.Baltz J.M.Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms.Development. 2007; 134: 4283-4295

Fleming S.King R.Micromanipulation in Assisted Conception.Cambridge University Press, Cambridge2003https://doi.org/10.1017/CBO9780511545153

Fredrickson J.Krisher R.Morbeck D.E.The impact of the protein stabilizer octanoic acid on embryonic development and fetal growth in a murine model.J. Assist. Reprod. Genet. 2015; 32: 1517-1524

Gardner D.K.Lane M.Calderon I.Leeton J.Environment of the preimplantation human embryoin vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells.Fertil. Steril. 1996; 65: 349-353

Gardner D.K.Lane M.Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF Hum.Reprod. Update. 1997; 3: 367-382

Gardner D.K.Lane M.Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media.Hum. Reprod. 1998; 13 (discussion 160): 148-159

Gardner D.K.Lane M.Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting.Reprod. Fertil. Dev. 2005; 17: 361-370

Gardner D.K.Lane M.Schoolcraft W.B.Physiology and culture of the human blastocyst.J. Reprod. Immunol. 2002; 55: 85-100

Gardner D.K.Leese H.J.Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolismin vitro.J. Reprod. Fertil. 1990; 88: 361-368

Gardner D.K.Rodriguez-Martinez H.Lane M.Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer.Hum. Reprod. 1999; 14: 2575-2580

Gardner D.K.Schoolcraft W.B.Culture and transfer of human blastocysts.Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 1999; 11: 307-311

Gardner D.K.Schoolcraft W.B.In vitro culture of human blastocysts.in: Jansen R. Mortimer D. Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999. Parthenon Publishing, London1999: 378-388

Gardner D.KKelley R.L.Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype.J. Dev. Orig. Health Dis. 2017; 8: 418-435

Gardner D.The impact of physiological oxygen during culture, and vitrification for cryopreservation, on the outcome of extended culture in human IVF.Reprod. Biomed. Online. 2016; 32: 137-141

Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts, Curr Opin Obstet Gynecol, 1999b, vol. 11; 307 – 311.

Gardner DK, Schoolcraft WB. Jansen R, Mortimer D. In vitro culture of human blastocysts, Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999, 1999a London Parthenon Publishing; 378 – 388.

Garven G. et al,Theoretical analysis of the role of groundwater flow in the genesis of Stratabound on deposit 2: qualitative results: American Journal of Science,v 284, p. 1125 -1174, p.1085 -1112, 1984.

Geisthovel F., Ochsner A., Gilligan A.V. Enviramental evaluation of assisted reproduction techniques laboratories in Germany and the USA,Narasa Publishing Hause. 2001: 184-98.

George MA, Braude PR, Johnson MH, Sweetnam DG. Quality control in the IVF laboratory: in  vitro and in  vivo development of mouse embryos is unaffected by the quality of water used in culture media. Hum Reprod. 1989;4:826–31; PMID: 2606962 DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136994.

Geraghty R.J.Capes-Davis A.Davis J.M.Downward J.Freshney R.I.Knezevic I.Lovell-Badge R.Masters J.R.Meredith J.Stacey G.N.Thraves P.Vias M.Cancer Research UKGuidelines for the use of cell lines in biomedical research.Br. J. Cancer. 2014; 111 (https://doi.org/): 1021-1046 https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166

Giligan A. V., Alouf C.A. Air quality in the IVF laboratory- it’s little things that matter. Fertil. Mag. 2006; 5: 42-3.

Gilligan A, Schimmel T, Esposito B, Jr, Cohen J. Release of volatile organic compounds such as styrene by sterile petri dishes and flasks used for in-vitro fertilization. Fertil Steril. 1997;68(Supplement 1):S52–S3. doi: 10.1016/S0015-0282(97)90737-8. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136994 PMID: 2606962

Gong Y.,Dubin N.M. Effect of felt-tip marking pens on mouse embryo growth. Fertil. Steril. 1998;70(Suppl.1): S492-3.

Good N.E.Izawa S.Hydrogen ion buffers.Methods Enzymol. 1972; 24: 53-68

Good N.E.Winget G.D.Winter W.Connolly T.N.Izawa S.Singh R.M.Hydrogen ion buffers for biological research.Biochemistry. 1966; 5: 467-477

Graves C.N.Biggers J.D.Carbon dioxide fixation by mouse embryos prior to implantation.Science. 1970; 167: 1506-1508

Griesinger G.Beware of the ‘implantation rate’! Why the outcome parameter ‘implantation rate’ should be abandoned from infertility research.Hum. Reprod. 2016; 31: 249-251

Grinsted J.Blendstrup K.Andreasen M.P.Byskov A.G.Temperature measurements of rabbit antral follicles.J. Reprod. Fertil. 1980; 60: 149-155

Grinsted J.Kjer J.J.Blendstrup K.Pedersen J.F.Is low temperature of the follicular fluid prior to ovulation necessary for normal oocyte development?.Fertil. Steril. 1985; 43: 34-39

Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology 2015

[H Lee Higdon 3rd](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Higdon+HL+3rd&cauthor_id=17524397)[1](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17524397/#affiliation-1), [Dawn W Blackhurst](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Blackhurst+DW&cauthor_id=17524397), [William R Boone](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Boone+WR&cauthor_id=17524397), Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory, Fertil Steril, . 2008 Mar;89(3):703-10.  doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.040. Epub 2007 May 24.

Hagen D.R.Prather R.S.Sims M.M.First N.L.Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media.J. Anim. Sci. 1991; 69: 1147-1150

Hall J.Gilligan A.Schimmel T.Cecchi M.Cohen J.The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture.Hum. Reprod. 1998; 13: 146-153

Hamamah S.Gatti J.L.Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity.Hum. Reprod. 1998; 13: 20-30

Hammoud I, Vialard F, Casasnovas P, Lefebvre G, Vauthier-Brouzes D, Poirot C. How viable are zygotes in which the PN are still intact at 25 h? Impact on the choice of embryo for transfer. Fertil Steril 2008; 90:551– 556.

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. Hum Reprod 2001;16:313-318.

Hardarson T.Bungum M.Conaghan J.Meintjes M.Chantilis S.J.Molnar L.Gunnarsson K.Wikland M.Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup.Fertil. Steril. 2015; 104: 1452-1454

Harper J.Magli M.C.Lundin K.Barratt C.L.R.Brison D.When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory?.Hum. Reprod. 2012; 27: 303-313

Hassan H.A.Cumulus cell contribution to cytoplasmic maturation and oocyte developmental competencein vitro.J. Assist. Reprod. Genet. 2001; 18: 539-543

Heller R., Hindle T., Essential Manager’s Manual, DK Publishing, Inc, 1998.

Higdon 3rd, H.L.Blackhurst D.W.Boone W.R.Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory.Fertil. Steril. 2008; 89: 703-710

Ho J.Y.Chen M.J.Yi Y.C.Guu H.F.Ho E.S.The effect of preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate, embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI.J. Assist. Reprod. Genet. 2003; 20: 358-364

Hong K.H.Lee H.Forman E.J.Upham K.M.Scott Jr, R.T.Examining the temperature of embryo culture inin vitro fertilization: a randomized controlled trial comparing traditional core temperature (37°C) to a more physiologic, cooler temperature (36°C).Fertil. Steril. 2014; 102: 767-773

Houghton F.D.Media composition: amino acids and cellular homeostasis.Methods Mol. Biol. 2012; 912: 97-106

Huang Z.Li J.Wang L.Yan J.Shi Y.Li S.Brief co-incubation of sperm and oocytes forin vitro fertilization techniques.Cochrane Database Syst. Rev. 2013; 30CD009391

Hunter R.H.Bogh I.B.Einer-Jensen N.Müller S.Greve T.Pre-ovulatory graafian follicles are cooler than neighbouring stroma in pig ovaries.Hum. Reprod. 2000; 15: 273-283

Hunter R.H.Einer-Jensen N.Greve T.Presence and significance of temperature gradients among different ovarian tissues.Microsc. Res. Tech. 2006; 69: 501-507

Hunter R.H.Einer-Jensen N.Pre-ovulatory temperature gradients within mammalian ovaries: a review.J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 2005; 89: 240-243

Hunter R.H.Grøndahl C.Greve T.Schmidt M.Graafian follicles are cooler than neighbouring ovarian tissues and deep rectal temperatures.Hum. Reprod. 1997; 12: 95-100

Hunter R.H.Nichol R.A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage.J. Reprod. Fertil. 1986; 77: 599-606

Hunter R.H.Temperature gradients in female reproductive tissues.Reprod. Biomed. Online. 2012; 24: 377-380

Hyclone Laboratories Laborator light induce toxic changes in media, sera and cells. Art to Sci.1982;1(3)2-5,vi

International Standardization Organization/DIS 15189:2:2002. Medical laboratories—particular requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Standardization Organization.

International Standards organisation, ISO Standard 14971 Medical Devices- Applicotion of Risk Management to Medical Devices,

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non–male factori ndications: a committee opinion ( ASRM 2020);

Ishizuka Y.Takeo T.Nakao S.Yoshimoto H.Hirose Y.Sakai Y.Horikoshi Y.Takeuji S.Tsuchiyama S.Nakagata N.Prolonged exposure to hyaluronidase decreases the fertilization and development rates of fresh and cryopreserved mouse oocytes.J. Reprod. Dev. 2014; 60: 454-459

Isiklar A.Mercan R.Balaban B.Alatas C.Aksoy S.Urman B.Impact of oocyte pre-incubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection.Reprod. Biomed. Online. 2004; 8: 682-686

ISO 14644–1:2015Cleanrooms and associated controlled environments – Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration.

ISO 15189:2012, Medical laboratories – Requirements for quality and competence.

Iván Oseguera-López, Sara Ruiz-Díaz, Priscila Ramos-Ibeas and Serafín Pérez-Cerezales – Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes, Front. Cell Dev. Biol., 29 November 2019 | https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00298

Jeyendran R.S.Graham E.F.Effects of cooling and freezing on pH of semen extender.Cryobiology. 1982; 19: 16-19

Johnson J.E.,Boone W.R.,Bernard R.S., The effects of volatile compounds(VC) on the outcome of in vitro mouse embryo culture. Fertil Steril. 1993; 60 (suppl 1); S 98–9.

Johnson M.H.Pickering S.J.George M.A.The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte.Hum. Reprod. 1988; 3: 383-387

Juran J M Gryma F M Calitatea produselor. Tratat practice de planificare, proiectare realizare si control, Editura Tehnica, Bucuresti,1973

Kanwar K.C.Yanagimachi R.Lopata A.Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa.Fertil. Steril. 1979; 31: 321-327

Kao Y.K., Higdon III H.L., Graves – Herring J.E., Boone W.R. Where do mouse embryos thrive best? Comparation of mammalian embryo development under varying laboratory environments.J. South Carolina Acad. Tci. 2009; 7 (2): 29-30.

Karagouga G, Fredrickson JR, Morbeck DE. Interaction of air quality and culture environment: role of protein concentration and oil quality on effects of volatile organic compounds (VOCs) on embryo development. Fertil Steril. 2014;102:e212.; DOI:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.716>

Kaser D.J.Bogale B.Sarda V.Farland L.V.Racowsky C.Randomized controlled trial of low (5%) versus ultralow (2%) oxygen tension forin vitro development of human embryos.Fertil. Steril. 2016; 106: e4

Kastrop P.M.M.de Graaf-Miltenburg L.A.M.Gutknecht D.R.Weima S.M.Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management.Hum. Reprod. 2007; 22: 2243-2248

Kato Y.Nagao Y.Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction.Reprod. Med. Biol. 2012; 11: 165-176

Kato Y.Nagao Y.Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle.Theriogenology. 2009; 72: 624-635

Katz-Jaffe M.G.Linck D.W.Schoolcraft W.B.Gardner D.K.A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development.Reproduction. 2005; 130: 899-905

Kaufman D.L.Mitchell J.A.Intrauterine oxygen tension during the oestrous cycle in the hamster: patterns of change.Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol. 1994; 107: 673-678

Kelley R.LGardner D.K.In vitro culture of individual mouse preimplantation embryos: the role of embryo density, microwells, oxygen, timing and conditioned media.Reprod. Biomed. Online. 2017; 34: 441-454

Kigawa J.[Studies on the levels of pO2 and pCO2 in the uterine cavity and uterine tissue (author’s transl)].Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1981; 33: 1646-1654

Kirkegaard K.Hindkjaer J.J.Ingerslev H.J.Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring.Fertil. Steril. 2013; 99 (738–744 e4)

Kleijkers S.H.Mantikou E.Slappendel E.Consten D.van Echten-Arends J.Wetzels A.M.van Wely M.Smits L.J.van Montfoort A.P.Repping S.Dumoulin J.C.Mastenbroek S.Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicentre RCT.Hum. Reprod. 2016; 31: 2219-2230

Kleijkers S.H.van Montfoort A.P.Bekers O.Coonen E.Derhaag J.G.Evers J.L.Dumoulin J.C.Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2–8°C and during incubation at 37°C.Hum. Reprod. 2016; 31: 1192-1199

Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. Hum Reprod 1996;11:1492-1498.

Koustas G.Sjoblom C.Epigenetic consequences of pH stress in mouse embryos.Hum. Reprod. 2011; 26: i78

Kovacic B, Plas C, Woodward BJ, Verheyen G, Prados FJ, Hreinsson J, De Los Santos MJ, Magli MC, Lundin K, Plancha CE. The educational and professional status of clinical embryology and clinical embryologists in Europe. Hum Reprod 2015;30: 1755- 1762.

Lane M.Baltz J.M.Bavister B.D.Na+/H+ antiporter activity in hamster embryos is activated during fertilization.Dev. Biol. 1999; 208: 244-252

Lane M.Bavister B.D.Regulation of intracellular pH in bovine oocytes and cleavage stage embryos.Mol. Reprod. Dev. 1999; 54: 396-401

Lane M.Gardner D.K.Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse.Biol. Reprod. 2003; 69: 1109-1117

Lane M.Gardner D.K.Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids.J. Reprod. Fertil. 1997; 109: 153-164

Lane M.Gardner D.K.Inhibiting 3-phosphoglycerate kinase by EDTA stimulates the development of the cleavage stage mouse embryo.Mol. Reprod. Dev. 2001; 60: 233-240

Lane M.Gardner D.K.Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo.Biol. Reprod. 2000; 62: 16-22

Lane M.Gardner D.K.Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos.Semin. Reprod. Med. 2000; 18: 195-204

Lane M.Lyons E.A.Bavister B.D.Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH.Hum. Reprod. 2000; 15: 389-394

Lane M.Mitchell M.Cashman K.S.Fell D.Wakefield S.Zander-Fox D.L.To QC or not to QC: the key to a consistent laboratory?.Reprod. Fertil. Dev. 2008; 20: 23-32

Lars Bjorndahl, et al. - A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology, Cambridge University Press, 2010

Lawitts J.A.Biggers J.D.Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods.J. Reprod. Fertil. 1991; 91: 543-556

Lawler C, Baker HWG, Edgar DH. Relationships between timing of syngamy, female age and implantation potential in human in vitro-fertilised oocytes. Reprod Fertil Dev 2007;19:482 – 487.

Leape L.L - A systems analysis approach to medical error ; JAMA. 1997 Jan 22-29;277(4):307-11.

Leclerc C.Becker D.Buehr M.Warner A.Low intracellular pH is involved in the early embryonic death of DDK mouse eggs fertilized by alien sperm.Dev. Dyn. 1994; 200: 257-267

Leese H.J.Baumann C.G.Brison D.R.McEvoy T.G.Sturmey R.G.Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited.Mol. Hum. Reprod. 2008; 14: 667-672

Leese H.J.Metabolism of the preimplantation embryo: 40 Years on.Reproduction. 2012; 143: 417-427

Leese H.J.The formation and function of oviduct fluid.J. Reprod. Fertil. 1988; 82: 843-856

LEGE Nr. 588 din 15 decembrie 2004 privind aprobarea Ordonantei Guvernului nr. 79/2004 pentru infiintarea Agentiei Nationale de Transplant ACT EMIS DE: PARLAMENT ACT PUBLICAT IN: MONITORUL OFICIAL NR. 1232 din 21 decembrie 2004

Legea 95 2006 privind reforma în domeniul sănătăţii, publicată în Monitorul Oficial nr. 372 din 28 aprilie 2006

Lengner C.J.Gimelbrant A.A.Erwin J.A.Cheng A.W.Guenther M.G.Welstead G.G.Alagappan R.Frampton G.M.Xu P.Muffat J.Santagata S.Powers D.Barrett C.B.Young R.A.Lee J.T.Jaenisch R.Mitalipova M.Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations.Cell. 2010; 141: 872-883

Leonard P.H.Charlesworth M.C.Benson L.Walker D.L.Fredrickson J.R.Morbeck D.E.Variability in protein quality used for embryo culture: Embryotoxicity of the stabilizer octanoic acid.Fertil. Steril. 2013; 100: 544-549

Leung P.C.S.Gronow M.J.Kellow G.N.Lopata A.Speirs A.L.McBain J.C.du Plessis Y.P.Johnston I.Serum supplement in humanin vitro fertilization and embryo development.Fertil. Steril. 1984; 41: 36-39

Levitt, Theodore (1972), "Production Line Approach," Harvard Business Review, (September-October), 41-52.

Li W.Goossens K.Van Poucke M.Forier K.Braeckmans K.Van Soom A.Peelman L.J.High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression.Reprod. Fertil. Dev. 2016; 28: 948-959

Lichtenfels A.J.F.C., Gomes J.B., Pieri P.C., El Khouri Miraglia S.G.,Hallak J., Saldiva P.H.N. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male to female ratio in Sao Paulo, Brasil. Fertil. Steril. 2007;87:230-2.

Lopata A.Patullo M.J.Chang A.James B.A method for collecting motile spermatozoa from human semen.Fertil. Steril. 1976; 27: 677-684

Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis.Fertil. Steril. 2016; 106 (95–104 e17)

Lu Y.Bonte D.Ferrer-Buitrago M.Popovic M.Neupane J.Van der Jeught M.Leybaert L.De Sutter P.Heindryckx B.Culture conditions affect Ca2+ release in artificially activated mouse and human oocytes.Reprod. Fertil. Dev. 2018; 30: 991-1001

Luke B.Brown M.B.Wantman E.Stern J.E.Toner J.P.Coddington 3, C.C.Increased risk of large-for-gestational age birthweight in singleton siblings conceived within vitro fertilization in frozen versus fresh cycles.J. Assist. Reprod. Genet. 2017; 34: 191-200

Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum Reprod 2001; 16:2652– 2657.

Machtinger R.Racowsky C.Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence.Reprod. Biomed. Online. 2013; 26: 210-221

Mackowiak P.A.Wasserman S.S.Levine M.M.A critical appraisal of 98.6 degrees F, the upper limit of the normal body temperature, and other legacies of Carl Reinhold August Wunderlich.JAMA. 1992; 268: 1578-1580

Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L, Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. Hum Reprod 2008;23: 1253-1262.

Mahadevan M.M.Fleetham J.Church R.B.Taylor P.J.Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, HEPES, or phosphate.J. In vitro Fert. Embryo Transf. 1986; 3: 304-308

Maheshwari A.McLernon D.Bhattacharya S.Cumulative live birth rate: time for a consensus?.Hum. Reprod. 2015; 30: 2703-2707

Marquez B.Suarez S.S.Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca2+ influx.Biol. Reprod. 2007; 76: 660-665

Mastenbroek S.Twisk M.van Echten-Arends J.Sikkema-Raddatz B.Korevaar J.C.Verhoeve H.R.Vogel N.E.Arts E.G.de Vries J.W.Bossuyt P.M.Buys C.H.Heineman M.J.Repping S.van der Veen F.In vitro fertilization with preimplantation genetic screening.N. Engl. J. Med. 2007; 357: 9-17

Mastroianni Jr., L.Jones R.Oxygen Tension within the Rabbit Fallopian Tube.J. Reprod. Fertil. 1965; 9: 99-102

Mayer, J. F., Jones, E. L., Dowling-Lacey, D., Nehchiri, F., Muasher, S. J., Gibbons, W. E., & Oehninger, S. C. (2003). Total quality improvement in the IVF laboratory: Choosing indicators of quality. Reproductive BioMedicine Online, 7(6), 695-699.

McGraw-Hill, 1951 - Business & Economics

Mckiernan S.H., Bavister B.D. Envirament variables influence in vetro development of hamster 2 cell embryos to te blastocyst stage. Biol. Reprod. 1990; 43: 404-13.

Medically assisted reproduction in patients with a viral infection/disease – ESHRE viral Infection Guideline Group – feb. 2021

Meintjes M.Chantilis S.J.Douglas J.D.Rodriguez A.J.Guerami A.R.Bookout D.M.Barnett B.D.Madden J.D.A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program.Hum. Reprod. 2009; 24: 300-307

Meintjes M.Chantilis S.J.Ward D.C.Douglas J.D.Rodriguez A.J.Guerami A.R.Bookout D.M.Barnett B.D.Madden J.D.A randomized controlled study of human serum albumin and serum substitute supplement as protein supplements for IVF culture and the effect on live birth rates.Hum. Reprod. 2009; 24: 782-789

Meintjes M.Media composition: macromolecules and embryo growth.Methods Mol. Biol. 2012; 912: 107-127

Menezo Y.Testart J.Perrone D.Serum is not necessary in humanin vitro fertilization, early embryo culture, and transfer.Fertil. Steril. 1984; 42: 750-755

[Meredith W Walker](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Walker+MW&cauthor_id=24146163)[1](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24146163/#affiliation-1), [Julia M Butler](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Butler+JM&cauthor_id=24146163), [H Lee Higdon 3rd](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Higdon+HL+3rd&cauthor_id=24146163), [William R Boone](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Boone+WR&cauthor_id=24146163), Temperature variations within and between incubators-a prospective, observational study, J Assist Reprod Genet, . 2013 Dec;30(12):1583-5.  doi: 10.1007/s10815-013-0104-0. Epub 2013 Oct 23.

Merton Y.S., Vermeulen Z.L., Otter T., Mullaart E., de Ruigh L., Hasler J.F. Carbon activated gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate fallowing transfer of in vitro – produced bovine embryos. Theriogenology. 2007; 67: 1233-8.

Micromanipulation in Assisted Conception. A user’s manual and Troubleshooting Guide, Steven D. Fleming and Robert S. King (2003)

Ministerul sanatatii publice ordin 273/2020

MINISTERUL SĂNĂTĂŢII PUBLICE, ORDIN nr. 1.763 din 12 octombrie 2007, Publicat în MONITORUL OFICIAL nr. 698 din 16 octombrie 2007

Morbeck D.E.Air quality in the assisted reproduction laboratory: a mini-review.J. Assist. Reprod. Genet. 2015; 32: 1019-1024

Morbeck D.E.Baumann N.A.Oglesbee D.Composition of single-step media used for human embryo culture.Fertil. Steril. 2017; 107: 1055-1060

Morbeck D.E.Krisher R.L.Herrick J.R.Baumann N.A.Matern D.Moyer T.Composition of commercial media used for human embryo culture.Fertil. Steril. 2014; 102: 759-766

Morbeck D.E.Paczkowski M.Fredrickson J.R.Krisher R.L.Hoff H.S.Baumann N.A.Moyer T.Matern D.Composition of protein supplements used for human embryo culture.J. Assist. Reprod. Genet. 2014; 31: 1703-1711

Moreno-Cuevas J.E.Sirbasku D.A.oestrogen mitogenic action. III. Is phenol red a ‘red herring’?.In vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2000; 36: 447-464

Morin S.J.Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O2 in extended culture represent the most physiologic system?.J. Assist. Reprod. Genet. 2017; 34: 309-314

Moriwaki T, Suganuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y, Oguchi H, Furuhashi M. Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. Hum Reprod 2004;19:152-156.

Mortimer D, S Mortimer, Quality and Risk Management in the IVF Laboratory , Article in Journal of Andrology 26(4):439-439 •July 2005 with 90 Reads DOI: 10.2164/jandrol.05059.

Mortimer D.Cohen J.Mortimer S.T.Fawzy M.McCulloh D.H.Morbeck D.E.Pollet-Villard X.Mansour R.T.Brison D.R.Doshi A.Harper J.C.Swain J.E.Gilligan A.V.Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting.Reprod Biomed Online. 2018; 36: 658-674

Mortimer D.Sperm preparation methods.J. Androl. 2000; 21: 357-366

Mortimer S.T.Mortimer D.Quality and Risk Management in the IVF Laboratory.2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK 2015

Naji O.Moska N.Dajani Y.El-Shirif A.El-Ashkar H.Hosni M.M.Khalil M.Khalaf Y.Bolton V.El-Toukhy T.Early oocyte denudation does not compromise ICSI cycle outcome: a large retrospective cohort study.Reprod. Biomed. Online. 2018; 37: 18-24

Nakahara T.Iwase A.Goto M.Harata T.Suzuki M.Ienaga M.Kobayashi H.Takikawa S.Manabe S.Kikkawa F.Ando H.Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos.J. Assist. Reprod. Genet. 2010; 27: 93-96

Nakayama T.Noda Y.Goto Y.Mori T.Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos.Theriogenology. 1994; 41: 499-510

Nastri C.O.Nóbrega B.N.Teixeira D.M.Amorim J.Diniz L.M.M.Barbosa M.W.P.Giorgi V.S.I.Pileggi V.N.Martins W.P.

Ng K.Y.B.Mingels R.Morgan H.Macklon N.Cheong Y.In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review.Hum. Reprod. Update. 2018; 24: 15-34

Niederberger C.Pellicer A.Cohen J.Gardner D.K.Palermo G.D.O’Neill C.L.Chow S.Rosenwaks Z.Cobo A.Swain J.E.Schoolcraft W.B.Frydman R.Bishop L.A.Aharon D.Gordon C.New E.Decherney A.Tan S.L.Paulson R.J.Goldfarb J.M.Brännström M.Donnez J.Silber S.Dolmans M.M.Simpson J.L.Handyside A.H.Munné S.Eguizabal C.Montserrat N.Izpisua Belmonte J.C.Trounson A.Simon C.Tulandi T.Giudice L.C.Norman R.J.Hsue A.J.Sun Y.Laufer N.Kochman R.Eldar-Geva T.Lunenfeld B.Ezcurra D.D’Hooghe T.Fauser B.C.J.M.Tarlatzis B.C.Meldrum D.R.Casper R.F.Fatem i H.M.Devroey P.Galliano D.Wikland M.Sigman M.Schoor R.A.Goldstein M.Lipshultz L.I.Schlegel P.N.Hussein A.Oates R.D.Brannigan R.E.Ross H.E.Pennings G.Klock S.C.Brown S.Van Steirteghem A.Rebar R.W.LaBarbera A.R.Forty years of IVF.Fertil. Steril. 2018; 110: 185-324

Nielsen H.I.Ali J.Embryo culture media, culture techniques and embryo selection: A tribute to Wesley Kingston Whitten.Reprod. Stem Cell Biotechnol. 2010; 1: 1-29

Nota de informare asupra reluarii activitatii de transplant de celule reproductive si reluarea tratamentelor de reproducere umana asistata medicala ulterior incetarii starii de urgenta provocate de pandemia COVID-19 – Comisia de Obstetrica-Ginecologie a Ministerului Sanatatii, Agentia Nationala de Transplant, Societatea de Obstetrica si Ginecologie din Romania, Asociatia Embriologilor din Romania, 20.05.2020

Okano A, Saka N et al. DNA damage in early hamster embryos exposed to fluorescent light. Theriogenology. 1997;47:310

ORDIN MS nr. 860/2013 pentru aprobarea criteriilor de acreditare în domeniul transplantului de organe, țesuturi și celule de origine umană

ORDIN nr. 1.226 din 3 decembrie 2012pentru aprobarea Normelor tehnice privind gestionarea deșeurilor rezultate din activități medicale și a Metodologiei de culegere a datelor pentru baza națională de date privind deșeurile rezultate din activități medicale

ORDIN nr. 1.763 din 12 octombrie 2007 privind stabilirea cerinţelor tehnice pentru donarea, prelevarea, testarea, procesarea, conservarea, distribuirea, codificarea şi trasabilitatea ţesuturilor şi celulelor de origine umană utilizate în scopuri terapeutice, precum şi notificarea incidentelor adverse severe şi a reacţiilor adverse grave survenite în timpul transplantării lor

ORDIN nr. 273 din 20 februarie 2020 privind modificarea și completarea Ordinului ministrului sănătății nr. 860/2013 pentru aprobarea criteriilor de acreditare în domeniul transplantului de organe, țesuturi și celule de origine umană

Ordonanţa Guvernului nr. 79/2004 M. Of. nr. 791 din 27 august 2004

Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The Relationship between Pregnancy Outcome and Smooth Endoplasmic Reticulum Clusters in MII Human Oocytes. Hum Reprod 2004;19:1591 – 1597 - Căutare Google, n.d.

Otsuki J.Nagai Y.Chiba K.Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development.Fertil. Steril. 2007; 88: 741-743

Ottosen L.D.Hindkjaer J.Ingerslev J.Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures.J Assist. Reprod. Genet. 2007; 24: 99-103

Ozawa M.Nagai T.Kaneko H.Noguchi J.Ohnuma K.Kikuchi K.Successful pig embryonic developmentin vitro outside a CO2 gas-regulated incubator: effects of pH and osmolality.Theriogenology. 2006; 65: 860-869

Palasz A.T.Breña P.B.De la Fuente J.Gutiérrez-Adán A.The effect of different zwitterionic buffers and PBS used for out-of-incubator procedures during standardin vitro embryo production on development, morphology and gene expression of bovine embryos.Theriogenology. 2008; 70: 1461-1470

Parasuraman R., Sustained attention: A multifactorial approach. In Attention and Performance XI, ed. By M.I. Posner & O.S.M Marin, pp 493-511, Hillsdale, NY: Lawrence Erlbaum, 1985.

Paternot G.Debrock S.D’Hooghe T.Spiessens C.Computer-assisted embryo selection: a benefit in the evaluation of embryo quality?.Reprod. Biomed. Online. 2011; 23: 347-354

Patrat C.Kaffel A.Delaroche L.Guibert J.Jouannet P.Epelboin S.De Ziegler D.Wolf J.P.Fauque P.Optimal timing for oocyte denudation and intracytoplasmic sperm injection.Obstet. Gynecol. Int. 2012; 403531

Pedersen B.M.Boel M.Montag M.Gardner D.K.Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on day 3.Human Reprod. 2016; 31: 2231-2244

Phillip J. Ross , Taguchi Techniques for Quality Engineering: Loss Function, Orthogonal Experiments, Parameter and Tolerance Design, McGraw Hill Professional, 1996, ISBN 0070539588, 9780070539587

Phillips K.P.Baltz J.M.Intracellular pH regulation by HCO3-/Cl- exchange is activated during early mouse zygote development.Dev. Biol. 1999; 208: 392-405

Phillips K.P.Léveillé M.C.Claman P.Baltz J.M.Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos.Hum. Reprod. 2000; 15: 896-904

Pickering S.J.Braude P.R.Johnson M.H.Cant A.Currie J.Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte.Fertil. Steril. 1990; 54: 102-108

Pickering S.J.Johnson M.H.The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte.Hum. Reprod. 1987; 2: 207-216

Pomeroy K.O.Reed M.L.The effect of light on embryos and embryo culture.J. Reprod. Stem Cell Biotechnol. 2013; 3: 46-54

Pool T.B.Schoolfield J.Han D.Human Embryo Culture Media Comparisons.in: Smith G.D. Swain J.E. Pool T.B. Embryo Cult. Methods Protoc. Methods Mol. Biol. 912. Humana Press, Totowa, NJ2012: 367-386https://doi.org/10.1007/978–1-61779–971–6\_21(Available from: https://doi.org/)

Pribenszky C.Nilselid A.M.Montag M.Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta analysis.Reprod. Biomed. Online. 2017; 35: 511-520

Pujol A.García D.Obradors A.Rodríguez A.Vassena R.Is there a relation between the time to ICSI and the reproductive outcomes?.Hum. Reprod. 2018; 33: 797-806

Quinn P.Kerin J.F.Warnes G.M.Improved pregnancy rate in humanin vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid.Fertil. Steril. 1985; 44: 493-498

Quinn P.Moinipanah R.Steinberg J.M.Weathersbee P.S.Successful humanin vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions.Fertil. Steril. 1995; 63: 922-924

Quinn P.Wales R.G.Fixation of carbon dioxide by pre-implantation mouse embryosin vitro and the activities of enzymes involved in the process.Aust. J. Biol. Sci. 1971; 24: 1277-1290

Quinn P.Wales R.G.Fixation of carbon dioxide by preimplantation rabbit embryosin vitro.J. Reprod. Fertil. 1974; 36: 29-39

Racowsky C.Kovacs P.Martins W.P.A critical appraisal of time-lapse imaging for embryo selection: where are we and where do we need to go?.J. Assist. Reprod. Genet. 2015; J32: 1025-1030https://doi.org/10.1007/s10815–015–0510–6

Racowsky C.Martins W.P.Effectiveness and safety of time-lapse imaging for embryo culture and selection: it is still too early for any conclusions?.Fertil. Steril. 2017; 108: 450-452

Racowsky C.Ohno-Machado L.Kim J.Biggers J.D.Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day?.Hum. Reprod. 2009; 24: 2104-2113https://doi.org/10.1093/humrep/dep198

Racowsky C.Stern J.E.Gibbons W.E.Behr B.Pomeroy K.O.Biggers J.D.National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate.Fertil. Steril. 2011; 95: 1985-1989

Racowsky C.Vernon M.Mayer J.Ball G.D.Behr B.Pomeroy K.O.Wininger D.Gibbons W.Conaghan J.Stern J.E.Standardization of grading embryo morphology.Fertil. Steril. 2010; 94: 1152-1153

Reproductive Laboratory Checklist - CAP Accreditation Program 08.21.2017 College of American Pathologists

Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015) ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, Maria José De los Santos, Susanna Apter, Giovanni Coticchio, Sophie Debrock, Kersti Lundin, Carlos E Plancha, Fernando Prados, Laura Rienzi, Greta Verheyen, Bryan Woodward, Nathalie Vermeulen. Human Reproduction, Volume 31, Issue 4, April 2016, Pages 685–686, <https://doi.org/10.1093/humrep/dew016>; PMID: 26908842

Revised guidelines for human embryology and andrology laboratories The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology Fertil Steril2008;90:S45–59 2008 by American Society for Reproductive Medicine

Richardson M.E.,Trapp A.C., Bernard R.S. The effect of residual paint fumes on murine embryonic development. Bull SC Acad Sci.1997;59:131.

Rienzi L.Gajta G.Ubaldi F.Predictive value of oocyte morphology in human IVF; A systematic review of the literature.Hum. Reprod. Update. 2011; 17: 34-45

Rienzi L.Ubaldi F.Anniballo R.Cerulo G.Greco E.Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection.Hum. Reprod. 1998; 13: 1014-1019

Rinaudo P.F.Giritharan G.Talbi S.Dobson A.T.Schultz R.M.Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos.Fertil. Steril. 2006; 86 (1265. e1–36): 1252-1265

Robertson S.A.Basic science to clinical application—the utility of GM-CSF in reproductive medicine.J. Reprod. Immunol. 2011; 90: 132-133

Rogers B.J.Perreault S.D.Bentwood B.J.McCarville C.Hale R.W.Soderdahl D.W.Variability in the human-hamsterin vitro assay for fertility evaluation.Fertil. Steril. 1983; 39: 204-211

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. Hum Reprod 1998;13:182 – 187.

Salinas et al, 2010 ,M. Salinas, M. Lopez-Garrigos, M. Gutierrez, J. Lugo, J.V. Sirvent, J. Uris Achieving continuous improvement in laboratory organization through performance measurements: a seven-year experience Clin. Chem. Lab. Med, 48 (2010), pp. 57-61

Salumets A, Hyde´n-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16:2177 – 2181. Salumets A, Hyde´n-Granskog C, Ma¨kinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. Hum Reprod 2003; 18:821 – 825

Sangita K Jindal, Richard G Rawlins, Charles H Muller, Erma Z Drobnis - Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies, Reproductive BioMedicine Online (2016) 33, 121–130

SART National Summary, 2015.www.sartcorsonline.com/rptCSR\_PublicMultYear.aspx?reportingYear=2015

Sfontouris I.A.Kolibianakis E.M.Lainas G.T.Venetis C.A.Petsas G.K.Tarlatzis B.C.Lainas T.G.Blastocyst utilization rates after continuous culture in two commercial single-step media: a prospective randomized study with sibling oocytes.J. Assist. Reprod. Genet. 2017; 34: 1377-1383

Sfontouris I.A.Martins W.P.Nastri C.O.Viana I.G.Navarro P.A.Raine-Fenning N.van der Poel S.Rienzi L.Racowsky C.Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.J. Assist. Reprod. Genet. 2016; 33: 1261-1272

Shamsuddin M.Larsson B.Gustafsson H.Rodriguez-Martinez H.A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability.Theriogenology. 1994; 41: 1033-1043

Shewhart W.A. , Economic Control of quality of manufactured product , D. Van Nostrand Company, inc, 1931.

Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. Hum Reprod 1997;12:1531 – 1536

Squirrell J.M.Lane M.Bavister B.D.Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos.Biol. Reprod. 2001; 64: 1845-1854

Staff management in the in vitro fertilization laboratory (Fertil Steril 2005;84:1786–8. ©2005 by American Society for Reproductive Medicine.)

Standard Operational Procedures in Reproductive Medicine – Laboratory and Clinical Practice, Botros Rizk and Marcus Montag (2017)

Steptoe P.C.Edwards R.G.Birth after the reimplantation of a human embryo.Lancet. 1978; 312: 366

Steptoe P.C.Edwards R.G.Purdy J.M.Human blastocysts grown in culture.Nature. 1971; 229: 132-133

Sunde A.Brison D.Dumoulin J.Harper J.Lundin K.Magli M.C.Van den Abbeel E.Veiga A.Time to take human embryo culture seriously.Hum. Reprod. 2016; 31: 2174-2182

Sund-Levander M.Forsberg C.Wahren L.K.Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review.Scand. J. Caring. Sci. 2002; 16: 122-128

Swain J.E.Cabrera L.Xu X.Smith G.D.Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development.Reprod. Biomed. Online. 2012; 24 (https://doi.org/): 142-147https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.10.008

Swain J.E.Comparison of three pH measuring devices within the IVF laboratory.Fertil. Steril. 2013; 100: S251

Swain J.E.Decisions for the IVF laboratory: Comparative analysis of embryo culture incubators.Reprod. BioMed. Online. 2014; 28 (https://doi.org/): 535-547https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.004

Swain J.E.Different mineral oils used for embryo culture microdrop overlay differentially impact media evaporation.Fertil. Steril. 2018; 109 (https://doi.org/): e53https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.02.101

Swain J.E.Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF?.Hum. Reprod. Update. 2012; 18: 333-339

Swain J.E.Media Composition: pH and Buffers.Methods. Mol. Biol. 2012; 912: 161-175

Swain J.E.Optimal human embryo culture.Semin. Reprod. Med. 2015; 33: 103-117

Swain J.E.Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality.Reprod. Biomed. Online. 2010; 21: 6-16

Swain J.E.Pool T.B.New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction.Reprod. Biomed. Online. 2009; 18: 799-810

Swain J.E.Schoolcraft W.B.Bossert N.Batcheller A.E.Media osmolality changes over 7 days following culture in a non-humidified benchtop incubator.Fertil. Steril. 2016; 106: e362

Swain J.Embryo culture and pH.Fertil. Steril. 2011; 95 (author reply e68): e67

Swain JE.  Optimal human embryo culture. Semin Reprod Med. 2015;33(2):103–17; PMID: 25734348

Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. Hum Reprod 2002; 17:1513 – 1518.

Tay J.I.Rutherford A.J.Killick S.R.Maguiness S.D.Partridge R.J.Leese H.J.Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents.Hum. Reprod. 1997; 12: 2451-2456

Testart J.Lassalle B.Frydman R.Apparatus for thein vitro fertilization and culture of human oocytes.Fertil. Steril. 1982; 38: 372-375

The *Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. 4th Ed. by* European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg, France

The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, Reproductive biomedicine online In Press, ePub • February 2015 with 485 Reads, DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.01.016

The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators ; ESHRE Special Interest Group of Embryology1,\* and Alpha Scientists in Reproductive Medicine2

Torello´MJ, Ardoy M, Caldero´n G, Cuadros J, Herrer R, Moreno JM,Ortiz A, Prados F, Rodrıguez L, Ten J. Criterios ASEBIR de valoracion morfologica de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos. ASEBIR Congress, Zaragoza, 2007

Tucker K. E., and Jansen C. (2002). The mouse embryo bioassay: is it the ‘gold standard’ for quality control testing in the IVF laboratory? In ‘The Art and Science of Assisted Reproductive Techniques’. (Eds G. N. Allahbadia and R. Basuray Das.) pp. 249–253. (Martin Dunitz: London.)

UNE 179007/2013 Health services. Systems of quality management for assisted reproduction laboratories

Van de Velde H.De Vos A.Joris H.Nagy Z.P.Van Steirteghem A.C.Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection.Hum. Reprod. 1998; 13: 3160-3164

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. Hum Reprod 2003;18:1062-1069.

Vanderzwalmen P.Hiemer A.Rubner P.Bach M.Neyer A.Stecher A.Uher P.Zintz M.Lejeune B.Vanderzwalmen S.Cassuto G.Zech N.H.Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles.Reprod. Biomed. Online. 2008; 17: 617-627

Veeck LL. Pre-embryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veeck LL (Ed) ; 1988;49:827-3

Von Wyl S., Bersinger N.A., Air quality in the IVF laboratory: results and survey. J. Assist Reprod. Gen. 2004; 21: 347-8.

Wale P.L.Gardner D.K.Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium.Biol. Reprod. 2013; 89: 1-10

Wale P.L.Gardner D.K.Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development.Biol. Reprod. 2012; 87: 1-8

Wale P.L.Gardner D.K.The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction.Hum. Reprod. Update. 2016; 22: 2-22

Wale P.L.Gardner D.K.Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients.Reprod. Biomed. Online. 2010; 21: 402-410

Walker M.W.Butler J.M.Higdon 3rd, H.L.Boone W.R.Temperature variations within and between incubators-a prospective, observational study.J. Assist. Reprod. Genet. 2013; 30: 1583-1585

Wang W.H.Meng L.Hackett R.J.Oldenbourg R.Keefe D.L.Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy.Hum. Reprod. 2001; 16: 2374-2378

Wang W.H.Meng L.Hackett R.J.Oldenbourg R.Keefe D.L.Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates.Fertil. Steril. 2002; 77: 1274-1277

Warrilow K.C, Huynh H.T., Gwozdziewicz J.B., Schillings W.A., Peters A.Y. A retrospective analysis: the examination of a potential relationship between particulate (P) and volatile organic compound (VOC) levels in a class 100 IVF laboratory cleanroom (CR) and specific parameters of embryogenesis and rates of implantation (IR). Fertil. Steril. 2001; 76 (suppl 1): S15 – 6.

Wennerholm U.B.Henningsen A.K.Romundstad L.B.Bergh C.Pinborg A.Skjaerven R.Forman J.Gissler M.Nygren K.G.Tiitinen A.Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group.Hum. Reprod. 2013; 28: 2545-2553

Wennerström E.C.Simonsen J.Melbye M.Long-term survival of individuals born small and large for gestational age.PLoS One. 2015; 10e0138594

Wilkinson J.Roberts S.A.Showell M.Brison D.R.Vail A.No common denominator: a review of outcome measures in IVF RCTs.Hum. Reprod. 2016; 31: 2714-2722

Will M.A.Clark N.A.Swain J.E.Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success.J. Assist. Reprod. Genet. 2011; 28: 711-724

Xie Y.Wang F.Puscheck E.E.Rappolee D.A.Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos.Mol. Reprod. Dev. 2007; 74: 1287-1294

Xu H.Simonet F.Luo Z.C.Optimal birth weight percentile cut-offs in defining small- or large-for-gestational-age.Acta. Paediatr. 2010; 99: 550-555

Yanagimachi R.Mammalian fertilization.in: Knobil E. Neill J.D. The Physiology of Reproduction. 2nd edition. Raven Press, New YorkNY, USA1994: 189-317

Yang H.W.Hwang K.J.Kwon H.C.Kim H.S.Choi K.W.Oh K.S.Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos.Hum. Reprod. 1998; 13: 998-1002

Yang Y.Xu Y.Ding C.Khoudja R.Y.Lin M.Awonuga A.O.Dai J.Puscheck E.E.Rappolee D.A.Zhou C.Comparison of 2, 5, and 20% O2 on the development of post-thaw human embryos.J. Assist. Reprod. Genet. 2016; 33: 919-927

Yedwab G.A.Paz G.Homonnai T.Z.David M.P.Kraicer P.F.The temperature, pH, and partial pressure of oxygen in the cervix and uterus of women and uterus of rats during the cycle.Fertil. Steril. 1976; 27: 304-309

Yeung Q.S.Briton-Jones C.M.Tjer G.C.Chiu T.T.Haines C.The efficacy of test tube warming devices used during oocyte retrieval for IVF.J. Assist. Reprod. Genet. 2004; 21: 355-360

Youssef M.M.Mantikou E.van Wely M.Van der Veen F.Al-Inany H.G.Repping S.Mastenbroek S.Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles.Cochrane Database Syst. Rev. 2015; 20CD007876

Zander-Fox D.Mitchell M.Thompson J.G.Lane M.Repercussions of a transient decrease in pH on embryo viability and subsequent fetal development.Reprod. Fertil. Dev. 2008; 20: 84

Zethaml, V.A. et al; Refinement and Reassessment of the servqual Scale; Journal of Retailing, Vol.67, no.4, Winter 1991, S.420-450.

Zhao Y.Baltz J.M.Bicarbonate/chloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development.Am. J. Physiol. 1996; 271: C1512-C1520

Zhao Y.Chauvet P.J.Alper S.L.Baltz J.M.Expression and function of bicarbonate/chloride exchangers in the preimplantation mouse embryo.J. Biol. Chem. 1995; 270: 24428-24434

Ziebe S.Loft A.Povlsen B.B.Erb K.Agerholm I.Aasted M.Gabrielsen A.Hnida C.Zobel D.P.Munding B.Bendz S.H.Robertson S.A.A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium forin vitro fertilization.Fertil. Steril. 2013; 99: 1600-1609

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:102:0048:0058:en:PDF

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:EN:PDF

http://legeaz.net/legea-95-2006/

http://www.clr.ro/Rep\_dil\_2002/..%5Crep\_htm%5COG79\_2004.htm

http://www.eshre.eu/~/media/emagic%20files/Guidelines/Position%20Papers/Tissues%20and%20cells%20directive.pdf

http://www.iso.org/iso/home/standards/management-standards/iso\_9000.htm

http://www.legex.ro/Legea-588-2004-45169.aspx

https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD007421.pub4/full?highlightAbstract=embrio%7Ctransfer%7Cembri

https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(17)30229-7/fulltext