

PROTOCOLO DE MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

1. DESARROLLO

Montaje de las agujas de microinyección:

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

Preparación de la placa de microinyección:

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

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

Microinyección:

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

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

2. REGISTROS

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