

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «ИМЭКС»

Потапова И.В.

« 25 » 12 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

**" Микропипетки для вспомогательных репродуктивных технологий"
(холдинговые микропипетки, инъекторные микропипетки, микропипетки
для хетчинга, микропипетки для биопсии, микропипетки для денудации),
производства «Микротек ИВФ с.р.о.», Майдаленки 844/7, 638 00 Брно-
Лесна, Чешская республика**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Микропипетки для вспомогательных репродуктивных технологий используются в процедурах ЭКО (экстракорпорального оплодотворения) для различных тонких манипуляций с яйцеклеткой и эмбрионом. Данное изделие медицинского назначения, может быть использовано при работе с микроманипуляторами производства, например, Narishige, Integra TI, Eppendorff и их аналогов.

Существуют 5 разновидностей микропипеток:

Холдинговая микропипетка (зеленого цвета) используется в процедурах ЭКО для удержания яйцеклетки во время процедуры ICSI (инъекция единственного сперматозоида внутрь яйцеклетки).

Инъекторная ИКСИ микропипетка (синего цвета) представляет собой инструмент, используемый в ЭКО для процедуры ICSI, а именно, для инъекции единственного сперматозоида внутрь цитоплазмы яйцеклетки.

Микропипетка для хетчинга (розового цвета) представляет собой инструмент, используемый в ЭКО для процедуры хетчинга, то есть частичного рассечения блестящей оболочки яйцеклетки или эмбриона.

Микропипетка для биопсии (желтого цвета) представляет собой инструмент, используемый в ЭКО биопсии blastomera, клеток трофобласта или полярного тельца, используемых для последующего преимплантационного генетического анализа (PGD).

Микропипетка для денудации (120-150 микрон – белого цвета, 180-200 микрон – серого цвета, 250-300 микрон – коричневого цвета) представляет собой инструмент, используемый в ЭКО денудации ооцитов и ранних эмбрионов.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Общая длина всех видов пипеток составляет 5,5 см, за исключением микропипетки для денудации, её длина составляет 9,5 см. Длина изогнутой рабочей области от 0,5 до 1 мм (в зависимости от вида ИМН).

Компания выпускает серию микропипеток, отличающихся внешним диаметром рабочей части микропипетки, он составляет 80, 100 и 120 микрон, внутренним диаметром рабочей части микропипетки, от 15 до 25 микрон, углом изгиба, который представлен вариантами 20, 25, 30, 35, 40 и 45 градусов; типом окончания рабочей части микропипетки: А – прямое окончание, В – скошенное окончание, угол скоса составляет 40 градусов; а также наличием и длиной пили на кончике микропипетки (L – длинный (300 мкм.) и S – короткий (200 мкм.)).

Каждая микропипетка упакована в индивидуальную упаковку, позволяющую сохранять стерильность инструмента. Упаковка представляет собой пластиковую капсулу различных цветов (зелёный, синий, жёлтый, розовый, белый в зависимости от вида ИМН). Данная маркировка позволяет легко визуально отличить продукт от других его видов, производимых компанией.

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Изделия предназначены для выполнения различных тонких манипуляций при проведении ЭКО, например хетчинга, ИКСИ, денудации или биопсии. При использовании микроинструментов по назначению никаких противопоказаний не существует.

4. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ ИЗДЕЛИЯ

1. Определите, какую именно из микроманипуляций Вам нужно выполнить (ИКСИ, биопсия, хетчинг, денудация).

2. Выберите соответствующие микропипетки согласно цветовым кодам

3. Непосредственно перед использованием вскройте цветную стерильную капсулу и извлеките из нее микроинструмент. Не следует извлекать все требуемые инструменты одновременно, извлекайте каждый следующий после того, как предыдущий установлен в микроманипулятор (см. п. 4а)

4 а. Вставьте микропипетки в предварительно настроенный микроманипулятор (традиционно микропипетка для холдинга вставляется в левый держатель микроманипулятора, а микропипетки для хетчинга, биопсии или инъекции в правый; возможно одновременное использование трех микропипеток (хетчинг, биопсия)), в остальных случаях используются по две. Микроинструменты устанавливают на микроманипуляторе в рабочее положение непосредственно перед микроманипуляцией.

б. В случае работы с пипетками для денудации микроманипулятор не требуется. Микропипетки вставляются в специальный пипетер для денудации и, по сути дела, являются стерильными одноразовыми насадками. После выполнения этого этапа микропипетки для денудации готовы к использованию.

5. В случае использования масляного микроманипулятора, используя регуляторы масляного давления манипулятора, заполните верхнюю нерабочую часть (до изгиба колена микропипетки) микропипетки тяжелым маслом, которым запомнены трубочки регуляции давления микроманипулятора. Следите за тем, чтобы не в микропипетке не образовывалось пузырей, они помешают в Вашей дальнейшей работе. В случае использования воздушного микроманипулятора просто вставьте микроинструменты в иглы-держатели микроманипулятора в рабочее положение.

6. Выполните выбранную микроманипуляцию.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ ИЗДЕЛИЯ

А. ИКСИ (Пример выполнения микроманипуляции)

Микроинъекция.

1. Поместите по 1-2 ооциту в каждую каплю среды, используемой для ИКСИ.

2. Необходимо выбрать для инъекции морфологически нормальный сперматозоид с хорошей подвижностью (если такой имеется).

Прижать хвост выбранного сперматозоида инъекционной микропипеткой до полной остановки сперматозоида. Очень важно не повредить район шейки, т.к. именно там находится центриоль, которая имеет решающее значение для миграции хромосом в процессе деления. Неполная иммобилизация ведет к снижению уровня оплодотворения. После обездвиживания поместите сперматозоид хвостом вперед в инъекционную иглу.

3. Приподнимите инъекционную микропипетку и перевесите к верхней капле, содержащей ооцит; определите его положение. Установите острие микропипетки у плазматической мембраны ооцита.

4. Опустите пипетку со сперматозоидом так, чтобы создалась наилучшая видимость. Установите такой уровень давления, чтобы сперматозоид не двигался.

5. Опустите холдинговую микропипетку в то же поле зрения, где находится ооцит. Медленно аспирируйте среду в микропипетку и установите давление.

6. Поместите острие иглы инъекционной микропипетки таким образом, чтобы оно было напротив внутреннего отверстия холдинговой микропипетки. Аккуратно прикрепите ооцит так, чтобы полярное тело находилось в положении 7 или 11 часов. Как правило, отверстие микропипетки должно быть обращено в сторону полярного тела.

7. Снова тщательно сфокусируйте изображение (увеличение $\times 20$), поместите сперматозоид в самый кончик иглы инъекционной микропипетки и проткните зону пеллюцида.

8. Поместите иглу примерно на 50-75% диаметра ооцита и аспирируйте цитоплазму до момента разрыва оолеммы. После чего инъекцируйте сперматозоид в ооцит.

10. Аккуратно выньте иглу из ооцита и одновременно снизьте уровень давления в холдинговой микропипетке.

11. Освободите ооцит и поднимите холдинговую пипетку на максимальный уровень с помощью грубого регулятора. Холдинговая пипетка ни в коем случае не должна касаться капли со сперматозоидами.

13. После инъекции ооциты нужно промыть, а затем инкубировать в чистой среде для инкубирования в течение 16–18 часов.

- Если сперматозоид не удастся поймать быстро и/или эмбриолог не имеет достаточного опыта, то чашку с зиготами следует регулярно помещать обратно в инкубатор для уравнивания.

В случае, если эмбриолог не имеет достаточно опыта или предполагается, что случай будет тяжелым, то следует помещать в чашку меньшее, чем обычно, число ооцитов.

- Инъекцию следует проводить глубоко в ооцит, (50-75% диаметра), но ни в коем случае не проколоть мембрану ооцита с противоположной стороны. Убедитесь в том, что сперматозоид не покинул ооцит вместе с иглой при ее вынимании.
- Убедитесь в том, что оолема проколота, и что сперматозоид не оказался в перивителлиновом пространстве.

Постарайтесь занести в ооцит минимальное количество среды вместе со сперматозоидом

В. Протокол проведения процедуры хетчинга. (пример микроинъекции)

1. Хетчинг делают по показаниям (п.2) на первый, второй или третий день развития непосредственно перед переносом эмбрионов в полость матки.

2. Хетчинг делают только на эмбрионах, которые отобраны для переноса.

3. Отобранные для переноса эмбрионы помещают в чашку для переноса, четко подписывают на чашке фамилию пациентки и убирают её в CO₂ инкубатор.

4. Производят настройку микроманипулятора для хетчинга. Вставляют и выравнивают микроинструменты: присоску для удерживания эмбриона и микроиглу для надсечки зоны.

5. Устанавливают чашку с эмбрионами на нагревательный столик микроманипулятора. Опускают микроинструменты в лунку с эмбрионами, выбирают один из двух эмбрионов и слабо прикрепляют его к микропипетке для холдинга. С помощью микропипетки для хетчинга осторожно вращают эмбрион на присоске до тех пор, пока не будет найдено подходящее место для надреза (расстояние между blastomeres и оболочкой наибольшее). Снижая давление в ручке микроманипулятора, более плотно прикрепляют эмбрион к микропипетке для холдинга и прокалывают оболочку микропипеткой для хетчинга по типу стежка в выбранном месте..

Размер стежка приблизительно равен 1/6 – 1/5 размера эмбриона. Ослабляют давление в микропипетке для холдинга – эмбрион остается висеть с проколотой оболочкой на микропипетке для хетчинга. Теперь осторожно подводят микропипетку для хетчинга с эмбрионом под микропипетку для холдинга и начинают тереть иглой пипетки для хетчинга о микропипетку для холдинга, местом где на ней расположен стежок оболочки, пока оболочка не будет перетерта. Обычно достаточно 3–4 движения и эмбрион соскакивает с иглы. Тоже повторяют со вторым эмбрионом. Эмбрионы с надсеченной оболочкой убирают в CO₂-инкубатор до переноса в полость матки.

6. В процедуре размораживания эмбрионов хетчинг делают по описанному выше протоколу.

7. В процедуре биопсии эмбриона делают двойное рассечение блестящей оболочки в виде галочки для более свободного проникновения микропипетки для биопсии под блестящую оболочку.

С. Биопсия эмбриона

1. Чашку для биопсии с эмбрионами устанавливают на нагревательный столик манипулятора. Опускают микроинструменты в первую каплю с эмбрионом. В микропипетку для биопсии набирают небольшое количество среды, так чтобы мениск был в поле зрения. Эмбрион с помощью микроинструментов ориентируется на холдинговую микропипетку таким образом, чтобы выбрать наиболее удобное место для проведения биопсии:

– чтобы расстояние между blastomeres и зоной было максимально возможное – снижение риска повредить blastomer микропипеткой для хетчинга

- чтобы для биопсии был достигаем бластомер с явно очерченным ядром – исключить биопсию безъядерного бластомера

2. С помощью микропипетки для хетчинга делают два надреза зоны в выбранном месте.

3. Эмбрион после хетчинга ориентируют на холдинговой микропипетке таким образом, чтобы надсечка зоны была направлена на 3 часа. Микропипетку для биопсии подводят к разрезу зоны и, меняя высоту погружения, пытаются войти ею в отверстие. После проникновения микропипетки для биопсии внутрь пытаются захватить выбранный бластомер и, втянув его не более чем на 2/3 внутрь рабочей области микропипетки для биопсии, осторожно извлекают из эмбриона и выпускают на дно чашки как можно дальше от эмбриона. Процедура повторяется с оставшимися эмбрионами в этой чашке.

4. Когда всем трем эмбрионам в чашке будут проведена биопсия, чашку помещают на нагревательный столик ламинара. Из CO₂-инкубатора достают приготовленную заранее чашку для культивирования эмбрионов после биопсии и чашку для полоскания эмбрионов. В чашке для культивирования ставят над каплями со средой номера

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Микроинструменты следует хранить в чистом сухом помещении при температуре от 0С° до 40С°.