

Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske

Hrvatsko društvo kliničkih embriologa

Hrvatsko društvo za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju

PREPORUKE ZA KVALITETU I SIGURNOST U MEDICINSKI POMOGNUTOJ OPLODNJI

1. MEDICINSKI POMOGNUTA OPLODNJA

1.1. Klinički aspekti medicinski pomognute oplodnje

Medicinski pomognuta oplodnja (MPO) su biomedicinski postupci kojima se liječi dokazana neplodnost jednog ili oba partnera te se primjenom suvremenih, znanstveno provjerenih biomedicinskih dostignuća omogućava spajanje ženske i muške spolne stanice radi postizanja trudnoće i porođaja. MPO metodama se danas liječi 70-80% svih uzroka neplodnosti. Primjenjuju se tek onda kada su se sve ostale metode liječenja neplodnosti pokazale bezuspješnima.

MPO obuhvaća dobivanje, obradu i pohranu reproduktivnih stanica (jajnih stanica i spermija), reproduktivnih tkiva (tkiva jajnika i testisa) i embrija. U postupcima MPO koriste se svježe ili zamrznute gamete, zigote ili embriji. Parovi koji su u postupku liječenja neplodnosti MPO metodama mogu koristiti vlastite spolne stanice (partnerska donacija) i donirane spolne stanice ili embrije (nepartnerska donacija).

Postupke MPO u Republici Hrvatskoj obavlja zdravstvena ustanova koja je u skladu s odredbama važećeg Zakona o MPO dobila odobrenje za rad nadležnog tijela Ministarstva zdravlja. Zdravstvena ustanova mora zadovoljavati minimalne medicinsko-tehničke uvjete te imati zaposleno educirano osoblje za provođenje MPO postupaka u skladu sa važećim zakonom i pripadajućim pravilnicima.

Za kliničare potrebno je naglasiti sljedeće odrednice:

- MPO su metode liječenja neplodnosti koje se primjenjuju tek nakon što su svi prethodni postupci liječenja ostali bezuspješni
- Dopušteni su svi oblici liječenja neplodnosti metodama MPO

- Struka je obvezna koristiti za MPO prirodne, kontrolirane prirodne cikluse ili primijeniti protokole ovarijske stimulacije (OS) poštujući načela struke tako da se preveniraju rizici MPO, ovarijski hiperstimulacijski sindrom (OHSS) i višeploidne trudnoće.
- Visoka učestalost OHSS i višeploidnih trudnoća treba biti razlog za poseban inspeksijski nadzor u takvim centrima.
- Neplodni par uz stručni savjet, sugestiju i tumačenje sam odlučuje o pripremi ciklusa za IVF, protokolu OS, broju oocita za oplodnju, kriopohrani zametaka ili oocita, te embriotransferu jednog ili dvaju zametaka.
- Dopušteno je darivanje spermija, jajnih stanica i zametaka. Ostavljena je i mogućnost da sa 16 godina dijete identificira biološkog roditelja. Prije ponovnog postupka IVF obvezno je iskoristiti kriopohranjene zametke i jajne stanice.
- Obvezna je briga za onkofertilitetne postupke (za žene koje su zbog maligne bolesti morale odgoditi liječenje neplodnosti nema dobne granice za plaćanje postupka MPO od strane HZZO-a).

MPO je etički vrlo osjetljiva metoda liječenja neplodnosti koja ima za krajnji cilj terminski rođeno zdravo dijete. Kao takva, zahtjeva opis najvažnijih postupaka kojima se ostvaruje kvalitetan rezultat izražen brojem poroda živorođene djece u terminu. Pri svemu tome važna je i sigurnost pacijentice, donora i djece rođene nakon začeća nekom od metoda MPO. U partnerskoj donaciji sigurnosne postupke treba osigurati prije dobivanja spolnih stanica od partnera za MPO.

Cilj preporuka za MPO je postaviti standarde i postupnike za ostvarenje jednoploidne trudnoće sa zdravim djetetom koje će se roditi u terminu.

1.2. Zakonski okvir medicinski pomognute oplodnje u Republici Hrvatskoj i EU

Postupci medicinski pomognute oplodnje u Republici Hrvatskoj provode se prema Zakonu o medicinskoj pomognutoj oplodnji (NN 86/12) te u skladu s EU Direktivama za tkiva i stanice: Direktiva 2004/23/EC, 2006/17/EC, 2006/86/EC i Odluka 2010/453/EU.

Prije ulaska u postupak MPO, liječnik je dužan obavijestiti bračni/izvanbračni par o pojedinostima preporučenog dijagnostičkog, odnosno terapijskog postupka liječenja neplodnosti, izgledima za uspjeh, te mogućim posljedicama i opasnostima postupka. Za postupke MPO, koji uključuju prikupljanje spolnih stanica i tkiva, njihovu kultivaciju i oplodnju u uvjetima *in vitro*, kultivaciju zametaka u uvjetima *in vitro*, te kriopohranu spolnih stanica, tkiva i zametaka, zakonom su definirani obrasci pristanka. Obrazac o odabranom postupku, kojim ujedno izjavljuju da su obaviješteni o mogućim oblicima prirodnog planiranja obitelji, o mogućnostima liječenja neplodnosti, te o drugim načinima ostvarivanja roditeljstva, bračni/izvanbračni par slobodnom voljom potpisuje prije ulaska u postupak MPO.

1.3. Pacijenti

1.3.1. Partnerska donacija

1.3.1.1. Intervju

Preporučuje se da oba partnera prisustvuju razgovoru s liječnikom obzirom da je neplodnost zajednički problem i trebali bi zajedno odlučiti o predloženim pretragama i podržati jedan drugog. Preporučuje se savjetovanje prije, za vrijeme i poslije postupka MPO. To je posebno važno jer neplodnost, ispitivanje mogućih uzroka i liječenje neplodnosti mogu uzrokovati psihološki stres od kojeg se parovi teško oporavljaju.

1.3.1.2. Pristanak

U partnerskoj donaciji parovi započinju postupak MPO s ciljem ostvarenja zajedničke želje za djetetom. Parovima koji idu u MPO postupak potrebno je osigurati usmenu informaciju o nacionalnom zakonodavstvu koje regulira MPO, mogućnosti naknade štete, povrata novca i pokriva troškova. Moraju biti informirani o uspješnosti postupka temeljeno na procjeni prema njihovoj osobnoj anamnezi, stupnju invazivnosti postupka, mogućim rizicima (rizici stimulacije ovulacije, višeplođnih trudnoća, učestalosti abnormalnosti djece rođene poslije MPO). Partnerima treba svakako pružiti psihološku podršku i savjete. Preporuča se i korištenje informacijskog materijala koji bi trebao biti pristupačan parovima tijekom postupka MPO.

Za svaki postupak MPO treba postojati obrazac pristanka koji može vrijediti i za sljedeći ponovljeni postupak, ukoliko se okolnosti nisu promijenile. Ako je postupak MPO učinjen s prethodno kriopohranjenim gametama ili embrijima za svaki postupak je potreban novi pristanak da bi se spriječilo poticanje postupka od strane samo jednog partnera, a bez pristanka drugog. U pismenoj formi pristanka partneri trebaju pristati i na zamrzavanje prekobrojnih zametaka. Partneri moraju dobiti i detaljnu informaciju o krioprezervaciji i mogućim opcijama sudbine prekobrojnih zametaka. Važno je napomenuti da embriji smiju biti stvoreni samo zbog reprodukcije. Prema nacionalnom zakonodavstvu embriji mogu biti donirani drugom paru, odnosno korisniku prava na medicinski pomognutu oplodnju. U pristanku treba posebno specificirati i trajanje pohrane embrija. Potreban je poseban pristanak pacijenta ako se osim IVF/ICSI i krioprezervacije koriste dodatne tehnike.

Par ili svaki partner individualno treba u pisanoj formi potpisati pristanak za MPO i potvrditi da su dobili potpune informacije o:

- a) mogućnosti usvojenja djeteta ili nekoj drugoj alternativnoj mogućnosti
- b) nacionalnom zakonu o MPO
- c) mogućnosti povlačenja pristanka za postupak MPO
- d) mogućnosti da ne bude učinjen neki dio postupka MPO zbog medicinskih ili deontoloških razloga
- e) redoslijedu pojedinih postupaka tijekom MPO

- f) mogućim etičkim problemima tijekom postupka MPO
- g) šansama za uspješan ishod postupka MPO, stupnju invazivnosti, mogućim rizicima uključujući i vjerojatnost višepodne trudnoće
- i) mogućnosti razvoja OHSS i rizika u svezi s aspiracijom oocita kao što su krvarenje i infekcije ili perforacija mjehura i crijeva
- j) mogućnosti dobivanja prekobrojnih embrija
- k) genskim i infektivnim bolestima, o postupcima koje treba učiniti da bi dobili gamete od donora, o mogućnosti kriopohrane gameta i embrija, o mogućim opcijama sudbine embrija
- l) ukupnoj cijeni postupka MPO

Žena koja ide u postupak MPO može odlučiti donirati svoje jajne stanice i mora biti upozorena na sve moguće opcije poslije MPO.

1.3.1.3. Anamneza i klinički pregled

Treba uzeti kompletnu anamnezu (obiteljsku, zdravstveni problemi, kirurški zahvati, spolni život, korištenje kontracepcije i prethodne trudnoće) u oba partnera. To može pomoći da se odrede uzroci neplodnosti para, preporuča odgovarajuće pretrage te temeljem dijagnoze odabere i najbolji način liječenja. Važna je i informacija o učestalosti odnosa, dispareuniji i spolnoj disfunkciji. Oba partnera treba i klinički pregledati.

1.3.1.4. Dijagnostika ženske neplodnosti

Procjena ovulacije -Treba uzeti detaljnu anamnezu menstrualnog ciklusa, uključujući dob menarhe, duljinu ciklusa, trajanje i učestalost menstruacija te prisutnost i jakost dismenoreje i dispareunije. Dokazati redovitost i kvalitetu ovulacija. Ovulacijsku disfunkciju i njezino porijeklo treba dijagnosticirati adekvatnim hormonskim pretragama prema pravilima struke.

Procjena ovarijskih rezervi - Ovarijsku rezervu potrebno je procijeniti biokemijskim testovima (FSH, E2, AMH) i ultrazvučnim pregledom jajnika i procjenom broja antralnih folikula (AFC).

Procjena prohodnosti jajovoda - Za procjenu anatomije maternice i prohodnosti jajovoda treba učiniti ambulantno HyCoSy (kontrasna histerosonografija) i/ili HSG (histerosalpingografija). Kod nejasnog nalaza HyCoSy ili HSG treba učiniti LPSC (laparoskopiju) i *dye* test za procjenu i potvrdu prohodnosti jajovoda i/ili potvrdu mjesta, etiologije i stupnja oštećenja prohodnosti jajovoda. Tom prilikom treba obratiti pažnju na druge moguće uzroke neplodnosti poput endometrioze. U pacijentica s oštećenim jajovodima potrebno je učiniti i test na *Chlamydia trachomatis*.

Procjena uterinih abnormalnosti - Ako postoji sumnja na postojanje uterinih abnormalnosti poput submukoznih mioma, polipa, adhezija ili septuma, prilikom ultrazvučnog pregleda ili HSG, preporuča se učiniti HSC (histeroskopiju). U nekim slučajevima potrebno je istovremeno raditi i LPSC.

Serologija - Imunološki testovi na *Rubellu* mogu biti učinjeni prije postupka MPO i ukoliko je nalaz seronegativan preporuča se cijepljenje.

1.3.1.5. Dijagnostika muške neplodnosti

Dijagnostika muške neplodnosti treba sadržavati analizu kvalitete sjemena koja će se provesti prije uključivanja bračnog/izvanbračnog para u postupak MPO. Referentne vrijednosti moraju se zasnivati na kriterijima donešenim u priručniku Svjetske zdravstvene organizacije "*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*" i Opatijskom konsenzusu 2014. Hrvatskog društva kliničkih embriologa. Kako bi se potvrdila dijagnoza kvalitete sjemena, potrebno je učiniti analizu još jednom u razmaku od dva mjeseca. Rezultati analize trebaju biti jedan od kriterija u odabiru prikladne metode MPO.

U slučaju dijagnoze oligoastenozoospermije ($<5 \times 10^6$ /mL spermija) te azoospermije, potrebno je pacijente uputiti na dodatne pretrage kod liječnika specijaliste urologa/androloga. Jaka oligoastenozoospermija i azoospermija mogu biti uzrokovane oštećenjem funkcije testisa zbog traume, infekcije, varikokele, deficita gonadotropina ili abnormalnosti gena, poput Klinefelterovog sindroma ili delecije Y kromosoma. Stoga u muškaraca s azoospermijom i jakom oligozoospermijom treba učiniti testove probira na abnormalnosti gena. U slučaju pozitivnog nalaza potrebno je učiniti konzultacije kod genetičara. U pacijenata s opstruktivnom azoospermijom treba učiniti probir na cističnu fibrozu ili abnormalnosti renalnog trakta.

1.3.1.6. Kriteriji za uključivanje/isključivanje u postupak MPO

Potrebno je učiniti procjenu zdravstvenog stanja para da bi se procijenila njihova prikladnost za liječenje neplodnosti MPO. Odnos korist/rizik treba procijeniti individualno.

1.3.1.7. Testiranje u partnerskoj donaciji

Cilj testiranja je spriječiti prenošenje infektivne ili genske bolesti od jednog partnera na drugog.

Prije partnerske donacije potrebno je učiniti sljedeće testove:

- a) anti-HIV-1 i anti-HIV-2
- b) HbsAg i anti-HBc
- c) anti-HCV (antitijela na hepatitis C)
- d) sifilis- specifični ili nespecifični treponema test

Uzorke krvi za serologiju treba uzeti prije prve donacije i to do 3 mjeseca prije. Za daljnju partnersku donaciju testove treba ponoviti unutar 2 godine. Pozitivni rezultati ne sprečavaju partnersku donaciju. Stroga pravila treba u takvoj situaciji poštovati da se spriječi kontaminacija osoblja. U slučaju pozitivnih testova na HIV-1 i 2, hepatitis B ili hepatitis C mora biti izolirana pohrana.

1.3.2. Nepartnerska donacija

Cilj je obrade u nepartnerske donacije osigurati da se prepoznaju i isključe iz takvog postupka osobe čije gamete mogu uzrokovati zdravstveni rizik u primatelja, kao što su nositelji infekcija i genskih bolesti. Isto tako je važno osigurati da proces donacije ne utječe štetno na zdravlje donora.

Osobe koje doniraju spermije ili oocite moraju učiniti sljedeće:

- a) konzultacije i savjetovanje s profesionalnim zdravstvenim osobljem
- b) ispuniti upitnik o zdravstvenoj anamnezi
- c) psihološku procjenu
- d) liječničko ispitivanje uključujući ginekološki pregled s ultrazvučnim pregledom u slučaju žena donora, ali i klinički genitalni pregled muškaraca
- e) laboratorijsko testiranje, uključujući i probir na infektivne bolesti
- f) odrediti Kg i Rh
- g) genetsko testiranje je indicirano ako postoji obiteljsko opterećenje kod donora. Preporuča se tada učiniti kariotip osobe.
- h) analizu sjemena u slučaju donora sjemena
- I) procjenu ovulacije i rezerve jajnika, uključujući i hormonski status u donora oocita
- j) informacijsku privolu o svakom postupku donacije

1.3.2.1. Kriteriji za isključenje donora oocita

Kriteriji za isključenje donora oocita iz postupka donacije su:

- 1) dob <18 godina ili >36 godina.
- 2) pozitivni rezultati pretraga za genske ili infektivne bolesti.
- 3) osobni zdravstveni rizik.
- 4) neprikladna osoba za donaciju temeljem intervjua.

1.3.2.2. Kriteriji za isključenje donora spermija

Kriteriji za isključenje donora spermija iz postupka donacije su:

- 1) dob <18 godina >45 godina.
- 2) pozitivni rezultati testova na infektivne ili genske bolesti.
- 3) rizik za osobno zdravlje.

4) neprikladan za donaciju temeljem učinjenog intervjua.

U slučaju **donacije embrija** partneri koji doniraju embrij moraju se smatrati nepartnerskim donatorima i tada za njih vrijede pravila za tu kategoriju donacije.

1.3.2.3. Ponavljana donacija

Ovo je posebno važno za donore oocita. Broj doniranih gameta kao i broj donacija ovisi o broju djece ostvarenih doniranim gametama i/ili obitelji kojima su donirane gamete, medicinskom i psihološkom riziku za donora i zakonu u zemlji gdje je donacija ostvarena. Centri za IVF trebaju registrirati žene donore, ostvarene uspješne trudnoće s njihovim doniranim oocitama i temeljem svoga registra odrediti koliko puta još mogu učiniti donaciju.

1.3.2.4. Testiranje u nepartnerskoj donaciji

Cilj testiranja je spriječiti prenošenje infektivne ili genske bolesti od donora na primatelja i plod.

- a) anti-HIV-1 i anti-HIV-2 (antitijela na HIV-1 i HIV-2)
- b) HbsAg i anti-HBc
- c) anti-HCV (antitijela na hepatitis C)
- d) sifilis - treponema specifični ili nespecifični test
- d) u muških donora – Chlamydia trachomatis iz ejakulata i iz urina

Svi uzorci seruma moraju biti uzeti u vrijeme donacije.

Donacija spermija, temeljem učinjenih testova, sigurna je najmanje 180 dana poslije zadnjeg davanja sjemena. Nakon toga treba ponoviti testove. Isti princip vrijedi i za donaciju oocita dozvoljavajući sigurnu upotrebu krioprezerviranih oocita do 180 dana od donacije ili s ponovljenim testovima nakon toga vremena. Smatra se da donacija oocita počinje s prvim danom početka stimulacije ovulacije i uzorke krvi za testiranje treba uzeti u to vrijeme.

1.4. Dobivanje spolnih stanica

Prije započinjanja postupaka sakupljanja spolnih stanica potrebno je s posebnom pažnjom identificirati pacijenta te provjeriti da li su izvršeni svi potrebni testovi i potpisani svi potrebni pristanci.

1.4.1. Spermiji

1.4.1.1. Prikupljanje sjemena ejakulacijom

Ejakulacijom se spermiji mogu dobiti: masturbacijom, retrogradnom ejakulacijom i elektroejakulacijom.

Prikupljanje sjemena prije MPO postupka uključuje identifikaciju pacijenta, prikupljanje i obradu sjemena za jedan od MPO postupaka ili kriopohranu. Pacijente se savjetuje da 2 do 7 dana prije davanja uzorka sjemena apstiniraju od ejakulacije. Potrebno je osigurati miran sanitarni prostor za davanje uzorka sjemena.

Uobičajeno je da pacijent sjeme prikuplja masturbacijom u sterilnu čašicu u ustanovi za MPO na dan predviđenog postupka. U slučaju da pacijent nije u mogućnosti dati sjeme u ustanovi, moguće je uzorak donijeti od kuće.

U slučaju retrogradne ejakulacije, pacijenta se uputi o terapiji koja će pripomoći smanjenju kiselosti urina, te mu se objasni postupak prikupljanja uzorka.

1.4.1.2. Prikupljanje spermija kirurškim putem

Mikrokirurški zahvat na epididimisu i testisu vrši se u slučaju odsustva spermija u ejakulatu, te u nekim slučajevima kada je indicirano da će spermiji dobiveni iz testisa biti bolje kvalitete od onih iz ejakulata. Odluku da li će se primjeniti navedeni zahvati donosi liječnik specijalist urolog/androlog na temelju prikupljenih nalaza pacijenta.

Mikrokirurški zahvat aspiracije epididimisa (engl. *microsurgical epididymal sperm aspiration*, MESA) radi se zbog opstrukcije *vas deferensa*. Perkutana aspiracija epididimisa (engl. *percutaneous epididymal sperm aspiration*, PESA) je varijanta zahvata pri kojem se pomoću igle aspirira sadržaj epididimisa bez incizije.

Spermiji iz testisa mogu se dobiti metodom biopsije tkiva testisa (engl. *testicular sperm extraction*, TESE). Dobivanje spermija iz tkiva testisa može se vršiti i perkutano (engl. *testicular sperm aspiration*, TESA) uz pomoć igle.

1.4.1.3. Prikupljanje jajnih stanica

Prikupljanje jajnih stanica uključuje identifikaciju pacijentice, prikupljanje (aspiraciju folikula) i postupanje sa prikupljenim jajnim stanicama (kriopohrana, *in vitro* kultivacija, oplodnja). Potrebno je osigurati da je sala namjenjena za aspiraciju folikula pored laboratorija. Tijekom aspiracije folikula potrebno je osigurati odgovarajući tlak uređaja za aspiraciju te odgovarajuću temperaturu držača za epruvete s folikularnim aspiratom.

1.4.1.4. Prikupljanje tkiva jajnika

Prikupljanje tkiva jajnika uključuje identifikaciju pacijentice, prikupljanje tkiva jajnika (operativni postupak kojeg provodi ginekolog), te postupanje s prikupljenim reproduktivnim tkivima (kriopohrana, kultivacija *in vitro*, izolacija spolnih stanica, postupak oplodnje).

1.5. Metode MPO

Standardni postupci medicinski pomognute oplodnje su: inseminacija, izvantjelesna oplodnja (engl. *in vitro fertilisation*, IVF), intracitoplazmatska mikroinjekcija spermija (engl. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI), kultivacija spolnih stanica i zametaka u uvjetima *in vitro*, prijenos zametaka u maternicu (engl. *embryo transfer*, ET), kriopohrana spolnih stanica, tkiva i zametaka, biopsija polarnih tjelešaca, zametaka i blastocisti te pomognuto izlijeganje zametaka.

1.5.1. Inseminacija (AIH ili AID)

Inseminacija podrazumijeva postupak unošenja obrađenog sjemena u spolne organe pacijentice u periovulacijsko vrijeme. Inseminacija može biti sa sjemenom partnera (engl. *arteficial insemination husband*, AIH) ili sa sjemenom donora (engl. *arteficial insemination donor*, AID). Postupak inseminacije uključuje identifikaciju pacijentice/donora, identifikaciju sjemena i postupanje sa muškim spolnim stanicama. Sjeme se može unijeti u maternicu (engl. *intrauterine insemination*, IUI) ili u jajovod (engl. *intratubal insemination*, ITI).

1.5.2. Izvantjelesna oplodnja (IVF)

IVF je metoda oplodnje izvan tijela gdje se spolne stanice spajaju *in vitro* te kultiviraju do prijenosa zametaka u maternicu pacijentice. Konvencionalni postupak izvantjelesne oplodnje uključuje identifikaciju pacijenata, identifikaciju spolnih stanica i postupanje sa spolnim stanicama. Tijekom konvencionalnog IVF postupka jajne stanice se inseminiraju obrađenim sjemenom obično 2 do 5 sati nakon aspiracije folikula (38 do 42 sata nakon poticanja ovulacije). Broj jajnih stanica koje se smiju oploditi je predviđen Zakonom o MPO. Potrebno je prirediti minimalnu koncentraciju pokretnih spermija od 1×10^5 /ml kako bi se izbjeglo dodavanje prevelikog volumena inseminacijske suspenzije.

1.5.3. Intracitoplazmatska mikroinjekcija spermija (ICSI)

ICSI je metoda izvantjelesne oplodnje u kojoj se jedan spermij unosi u citoplazmu jajne stanice svladavanjem bifazne barijere koju čine zona pellucida i stanična membrana jajne stanice. ICSI postupak uključuje identifikaciju spolnih stanica i postupanje sa spolnim stanicama. Broj jajnih stanica koje se smiju oploditi predviđen je Zakonom o MPO.

Prvi korak u pripremi jajnih stanica za ICSI postupak je otklanjanje stanica kumulusa i korone radijate uporabom enzima, a zatim i mehanički pomoću kalibriranih kapilara. Potrebno je upotrijebiti kapilaru odgovarajućeg promjera kako se jajne stanice tijekom postupka ne bi oštetile. Slijedeći korak je procjena zrelosti jajnih stanica.

Uspjeh ICSI postupka ovisi o zrelosti i kvaliteti jajne stanice, odabiru i imobilizaciji vijabilnih spermija te prolasku mikropipete za injektiranje kroz membranu jajne stanice

prije ispuštanja spermija u citoplazmu. U slučaju da u uzorku sjemena nakon obrade nema pokretnih spermija, uputno je primijeniti test vitalnosti.

1.5.4. Kultura spolnih stanica i provjera fertilizacije

Kultura spolnih stanica podrazumijeva uzgoj spolnih stanica u uvjetima *in vitro*. To je vrlo osjetljiva metoda pri kojoj posebnu pozornost treba obratiti na održavanje stabilnog pH, osmolarnosti i temperature kako bi se održala homeostaza biološkog materijala. Nakon 16 do 20 sati od postupka IVF ili ICSI provjerava se oplodnja jajnih stanica. Bilježi se morfološki izgled zigota i neoplođenih jajnih stanica. Iz kulture se izdvajaju zigote s nepravilnim brojem prozjgri.

1.5.5. Kultura zametaka i prijenos zametaka u maternicu

Kultura zametaka i prijenos zametaka u maternicu uključuje kulturu zametaka, pripremu i postupak prijenosa zametaka. Kultivacija zametaka je osjetljiva, treba obratiti pozornost na održavanje stabilnog pH, osmolarnosti i temperature da bi se održala homeostaza biološkog materijala. Tijekom kultivacije zametaka potrebno je pratiti i bilježiti morfološki razvoj zametaka (broj i izgled blastomera, stupanj fragmentacije, izgled citoplazme, razvoj faze kompaktacije, razvoj i kvaliteta blastocisti). Zametci se mogu kultivirati i prenositi u materiče do 7. dana. Prije prijenosa zametaka potrebno je identificirati pacijenticu i pripadajuće zametke kako bi se spriječilo miješanje uzoraka. Broj prenešenih zametaka predviđen je Zakonom o MPO. Preostali kvalitetni zametci mogu se kriopohraniti.

1.5.6. Zamrzavanje i odmrzavanje spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka

Pohrana spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka na dulje razdoblje uz zadržavanje njihove funkcionalnosti ima važnu primjenu u metodama MPO-a. Glavni razlog kriopohrane spolnih stanica jest očuvanje plodnosti pacijenata, a kod zametaka je to smanjenje višeplođnih trudnoća nakon postupaka izvantjelesne oplodnje.

Zamrzavanje, kriopohrana i odmrzavanje spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka uključuje identifikaciju spolnih stanica, identifikaciju reproduktivnih tkiva, identifikaciju zametaka, pripremu i postupak zamrzavanja, označavanje i skladištenje, pripremu i postupak odmrzavanja. Oznaka kojom se obilježava zamrznuti biološki materijal treba sadržavati jedinstveni identifikacijski broj pacijenta/donora od kojeg materijal potječe i oznaku zamrzavanja (datum ili redni broj) kako bi se osigurala sljedivost materijala. Najčešće korištene tehnike zamrzavanja biološkog materijala su metoda kontroliranog zamrzavanja i vitifikacija.

Ustanova treba osigurati redoviti nadzor razine tekućeg dušika u kriospremnicima. Nakon odmrzavanja biološkog materijala potrebno je evidentirati kvalitetu i preživljenje odmrznutih uzoraka.

1.5.7. Biopsija polarnih tjelešaca, zametaka i blastocista

Biopsija polarnih tjelešaca, zametaka i blastocista je postupak *in vitro* kojim se putem kemijskih, mehaničkih ili laserskih metoda izoliraju polarna tjelešca jajne stanice, blastomere zametka ili stanice trofoektoderma blastociste u svrhu preimplantacijske genetičke dijagnostike. Nakon provedenog genetskog savjetovanja bračnog/izvanbračnog para i preporuke koju daje kvalificirana osoba za genetsko savjetovanje ovaj postupak se preporuča u slučajevima kada se želi isključiti mogućnost prijenosa genetske bolesti ili kromosomskih nepravilnosti na potomstvo. Postupak uključuje identifikaciju pacijenata, identifikaciju spolnih stanica, identifikaciju zametaka, postupak biopsije polarnog tjelešca, postupak biopsije blastomera, postupak biopsije trofoektoderma. Sa stanicama i zamecima koji će se genetski testirati mora se manipulirati individualno te pažljivo označiti tijekom svakog koraka postupka. Uzorak dobiven biopsijom treba analizirati u genetskom laboratoriju.

1.5.8. Pomognuto izlijeganje zametaka/blastocista (AH)

Pomognuto izlijeganje (engl. *assisted hatching*, AH) zametaka/blastociste je postupak *in vitro* koji kemijskim, mehaničkim ili laserskim metodama oslabljuje čvrstu mehaničku barijeru zone pelucide te na taj način olakšava izlijeganje blastociste. Postupak pomognutog izlijeganja vrši se na preporuku, ukoliko je izostala trudnoća u više od tri postupka prijenosa kvalitetnih zametaka.

1.6. Prijenos biološkog materijala u drugu ustanovu

Prijenos biološkog materijala (jajnih stanica, sjemena, tkiva testisa, zametaka) iz jedne ustanove u drugu definiralo je Nacionalno povjerenstvo za MPO te je propisan hodogram i obrasci („Obrazac za prijenos bioloških uzoraka iz jedne zdravstvene ustanove u drugu zdravstvenu ustanovu“, „Podaci o biološkom materijalu koji se prenosi“).

Obrasci moraju sadržavati sve tražene podatke i biti potpisani od strane: partnera koji žele nastaviti liječenje u drugoj ustanovi na području RH, ustanove u kojoj se nalazi kriopohranjen biološki materijal te ustanove u koju se prenosi biološki materijal. Ustanove uz potpis moraju i pečatom ovjeriti obrasce. Oba uredno ispunjena obrasca, uz zamolbu partnera ovjerenu kod javnog bilježnika, šalju se na odobrenje Nacionalnom povjerenstvu za MPO.

Nakon što se dobije odobrenje od Nacionalnog povjerenstva, ustanove se dogovaraju o danu i satu primopredaje. Na dan primopredaje potrebno je ispuniti, potpisati i ovjeriti pečatom ustanove obrazac „Podaci o izdavanju, prijenosu i zaprimanju biološkog uzorka“.

Preporuča se da prijenos biološkog materijala u tekućem dušiku vrši ustanova specijalizirana za transport biološkog materijala koja posluje po standardima dobre distribucijske prakse (*Good Distribution Practice, GDP*), dobre skladišne prakse (*Good Storage Practice, GSP*), dobre proizvodne prakse (*Good Manufacturing Practice, GMP*) i dobre kliničke prakse (*Good Clinical Practice, GCP*).

Nakon izvršenog prijenosa biološkog materijala po jedan primjerak dokumentacije šalje se Nacionalnom povjerenstvu, pacijentima i ustanovama uključenim u postupak prijenosa.

2. SUSTAV UPRAVLJANJA KVALITETOM

Sustav upravljanja kvalitetom u području MPO-e koordinirane su aktivnosti namijenjene upravljanju i nadzoru organizacije po pitanju kvalitete, koje moraju omogućiti dosljedan rad sa spolnim stanicama i tkivima u skladu s tehničkim i zakonskim zahtjevima. Podrazumijevaju napisanu organizacijsku strukturu i definirane odgovornosti svih osoba uključenih u procese koji obuhvaćaju obradu spolnih stanica i tkiva za kliničku primjenu. Sustavni pristup upravljanja kvalitetom mora se provoditi i održavati tijekom cijelog procesa MPO, stoga obuhvaća niz mjera, od identifikacije pacijenta, preko laboratorijskog rada sa spolnim stanicama i tkivima, do kliničke aplikacije prema pacijentu. Sustav upravljanja kvalitetom mora obuhvatiti upravljanje kvalitetom u područjima: organizacijske strukture (odgovornosti i ovlaštenja, opisa radnih mjesta i uloga), upravljanja dokumentacijom i zapisima, kontrole kvalitete, kvalifikacije prostora i opreme, validacije procesa, slijedivosti te izvješćivanja o nesukladnostima, štetnim događajima i reakcijama. Sustavni pristup upravljanja kvalitetom mora se provoditi i održavati tijekom cijelog procesa MPO stoga obuhvaća niz mjera, od identifikacije pacijenta, preko laboratorijskog rada sa spolnim stanicama i tkivima do kliničke primjene prema pacijentu.

2.1. Osoblje

U ustanovama koje obavljaju djelatnost medicinski pomognute oplodnje zaposleni su: ginekolozi sa subspecializacijom iz humane reprodukcije, magistri biologije educirani kao klinički embriolozi, medicinske sestre i laboratorijski tehničari. Osoblje mora biti u dovoljnom broju i kvalificirano za obavljanje svih postupaka MPO za koje ustanova ima odobrenje Ministarstva zdravlja sukladno zahtjevima ustanovljenog sustava kvalitete.

Svaka zdravstvena ustanova koja se bavi MPO treba imati organizacijski dijagram (organigram) koji opisuje hijerarhijsku strukturu s jasno definiranim i dokumentiranim radnim zadacima i odgovornostima osoblja te načinima izvješćivanja.

Svaka ustanova mora odrediti osobu odgovornu za upravljanje sustavom kvalitete koja je neovisna od Odgovorne osobe za upravljanje odjelom/centrom. Odgovorna osoba za sustav upravljanja kvalitetom odgovorna je za planiranje i održavanje periodične kontrole djelotvornosti sustava upravljanja kvalitetom te za imenovanje internog revizora.

Najmanji broj djelatnika određuje se prema broju postupaka i definiran je Zakonom o MPO: za izvođenje do 250 postupaka godišnje potreban je najmanje jedan ginekolog i jedan klinički embriolog, za izvođenje do 500 postupaka godišnje potrebna su najmanje dva ginekologa i dva klinička embriologa, za izvođenje više od 500 postupaka godišnje

potrebna su najmanje tri ginekologa, tri klinička embriologa i jedan laboratorijski tehničar.

Svim djelatnicima treba osigurati početnu i/ili daljnju izobrazbu, što je potrebno i dokumentirati. Kompetencije osoblja moraju se periodički ocjenjivati kako je specificirano u sustavu kvalitete.

2.1.1. Klinički embriolozi

Svaki magistar biologije, nakon dvije godine iskustva na postupcima MPO i odgovarajućeg broja izvedenih postupaka MPO, stječe licencu kliničkog embriologa prema pravilima Hrvatskog društva kliničkih embriologa. Za sve magistre biologije koji se uvode u rad laboratorija za biologiju humane reprodukcije potrebno je izraditi plan edukacije prema smjernicama i pravilnicima Hrvatskog društva kliničkih embriologa. Voditelj laboratorija za biologiju humane reprodukcije mora biti klinički embriolog licenciran od strane Hrvatskog društva kliničkih embriologa u statusu kliničkog embriologa – mentora.

2.2. Radni prostor

Radni prostori u kojima se izvode postupci MPO moraju odgovarati propisima utvrđenim Pravilnikom o uvjetima u pogledu prostora, medicinsko-tehničke opreme i sustava kvalitete za provođenje postupaka medicinski pomognute oplodnje (NN/70/2013).

U radne prostore smije ulaziti samo ovlašteno osoblje. Veličina radnog prostora mora biti dostatna za svu opremu, nesmetano odvijanje svakog procesa i siguran rad svih djelatnika. S radnih površina moraju se ukloniti svi nepotrebni predmeti kako bi one bile dostupne za čišćenje.

2.2.1. Sala za aspiraciju

Sala za aspiraciju se mora nalaziti u neposrednoj blizini IVF laboratorija. Također je potrebno osigurati u blizini kabinu ili prostor u kojem će se pacijentica skinuti, tj. pripremiti za zahvat, te krevet na kojem će se pacijentica nakon zahvata, ukoliko je potrebno, neko vrijeme odmarati - soba za oporavak. Veličina sale za aspiraciju mora biti dovoljna kako bi se osim ginekološkog stola i ostalog niže navedenog kod opisivanja uređaja i materijala (2.3.1.) osiguralo i dovoljno mjesta za anesteziologa i anesteziološkog tehničara, te anesteziološke aparate za pacijentice kojima će se aspiracija izvoditi u općoj anesteziji.

2.2.2. IVF laboratorij

IVF laboratorij mora se nalaziti u neposrednoj blizini prostorije za prikupljanje jajnih stanica odnosno prostorije u kojoj se izvodi prijenos zametaka. Dizajn laboratorija treba

osiguravati optimalne uvjete za rukovanje spolnim stanicama i zamecima tijekom svih koraka u MPO postupku.

U IVF laboratoriju odvijaju se sljedeće djelatnosti:

1. priprema potrebnog materijala za postupke MPO
2. priprema sjemena za postupke MPO
2. prikupljanje jajnih stanica iz folikularne tekućine
3. inseminacija jajnih stanica (oplodnja IVF)
4. injiciranje spermija u citoplazmu jajne stanice (oplodnja ICSI)
5. ocjenjivanje kvalitete jajnih stanica, zigota i zametaka
6. priprema za prijenos zametaka
7. zamrzavanje i odmrzavanje spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka
8. biopsija polarnog tjelešca, blastomera, trofoektoderma

2.2.3. Prostorija za kriopohranu

Prostorija za kriopohranu mora biti zasebna prostorija odvojena od IVF laboratorija. Iz sigurnosnih razloga prostorija mora imati ventilaciju kako bi se omogućio dotok svježeg zraka. Prostorija i kriospremници moraju biti osigurani od nekontroliranog ulaza neovlaštenog osoblja.

Za potpunu zaštitu pohranjenih uzoraka te sigurnost djelatnika u prostoriji za kriopohranu mora postojati uređaj za mjerenje razine kisika s alarmom koji će se oglasiti kada razina kisika padne ispod kritične. Mora se osigurati mjerenje razine tekućeg dušika u kriospremnicima.

2.2.4. Kvalifikacija i validacija čistog prostora

Čisti prostor je prostor kontroliranih uvjeta u čestičnom i mikrobiološkom pogledu koji je potreban za obradu spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka (IVF laboratorij). Svrha čistog prostora je osigurati uvjete za rukovanje jajnim stanicama, spermijima i zametcima pri kojima će se izbjeći mogućnost kontaminacije koja može uzrokovati štetu u MPO postupku. Čisti prostor je pojam proizašao iz dobre proizvođačke prakse u izradi biomedicinskih proizvoda. Visok stupanj čistoće okoliša ostvaruje se radom u besprašnim komorama. U bezprašnoj komori zahtijeva se kvaliteta zraka u kojoj broj čestica i broj mikrobnih kolonija prema GMP odgovara najmanje klasi C, a pripadajućem okolišu zahtijeva se barem klasa D prema GMP.

Prostor i bezprašne komore se trebaju validirati jedanput u 24 mjeseca kako bi se dokazala ispravnost uređaja i čistoća zraka.

Odsustvo znakova infekcije u izvantjelesnoj kulturi potvrda je kontinuirane odgovarajuće kvalitete zraka u mikrobiološkom smislu. Kvaliteta zraka se dokazuje mikrobiološkim nadzorom jednom godišnje. S kritičnih površina treba uzimati briseve najmanje jednom godišnje. Kod nepovoljnih nalaza treba poduzeti odgovarajuće mjere te nakon postizanja ispravnih rezultata ponovo uzeti briseve za dva mjeseca.

Ulazni filteri i HEPA filteri se mijenjaju prema uputama proizvođača, a češće u slučaju potrebe. U čistom prostoru treba osigurati redovito i pravilno čišćenje i dezinfekciju, smanjen protok osoblja, te odvajanje infektivnog otpada od komunalnog.

U čistom prostoru potrebno je nositi standardnu zaštitnu odjeću te po potrebi koristiti jednokratne rukavice bez pudera. Unutar čistog prostora treba uvesti posebna pravila ponašanja (shema kretanja materijala i proizvoda) i rada.

2.3. Uređaji i materijali

U svakom centru za humanu reprodukciju na raspolaganju mora biti dostatan broj uređaja kako bi se rad mogao nesmetano odvijati. Najmanji broj opreme definiran je Pravilnikom o minimalnim uvjetima za MPO. Svaki centar može učiniti onoliko postupaka koliko mu dozvoljava njegov kapacitet. Kapacitet centra predstavlja odnos broja postupaka s brojem ginekologa, kliničkih embriologa, medicinskih sestara, laboratorijskih tehničara i opreme.

Potrebno je definirati kritičnu opremu, a kritične parametre pratiti zadovoljavajućom učestalosti što je potrebno i dokumentirati. Mora biti osiguran dostupan ovlašteni servis. Svi uređaji koji se koriste moraju imati upute za rukovanje. Njihovo održavanje i kontroliranje funkcionalnosti mora se obavljati redovito, što je potrebno i dokumentirati.

Svaki laboratorij mora voditi računa o sljedivosti primijenjenih medija i materijala koji se koriste u skladu s općim smjernicama za laboratorijski rad, a skladište prema uputama proizvođača. Mediji se slijede prema LOT-u ili serijskom broju proizvodnje.

Svaka zdravstvena ustanova koja se bavi postupcima medicinski pomognute oplodnje mora imati ugovor s nekom drugom zdravstvenom ustanovom za reorganizaciju posla i zamjenu osoblja u slučaju nužde (popravci uređaja, preuređenje prostora, požar). U tom slučaju, ako je potrebno, druga ustanova ima obavezu preuzeti brigu o zamrznutom biološkom materijalu.

2.3.1. Prostorija za aspiraciju

Prostorija za aspiraciju mora imati ginekološki stol, adekvatni ultrazvučni aparat jer se aspiracije izvode pod kontrolom ultrazvuka, električnu aspiracijsku (vakuum) pumpu, grijač za epruvete u koje se aspirira folikularna tekućina, pribor za punkciju jajnika i aspiraciju (spekule, igle sa punkciju i aspiraciju, vodilice, epruvete), te anesteziološki

aparatus sa svim potrebnim za opću anesteziju (EKG monitoring sa oksimetrom i tlakomjerom, aspirator, set za reanimaciju i defibrilator).

2.3.2. IVF laboratorij

Minimalna oprema koju svaki IVF laboratorij mora imati je: 2 CO₂ inkubatora, invertni mikroskop s mikromanipulatorom, centrifuga, bezprašna komora s lupom, hladnjak za pohranu medija, svjetlosni mikroskop za analizu sjemena, eksterni uređaj za provjeru temperature i razine CO₂ u inkubatorima.

U svim aktivnim inkubatorima treba biti uključen alarm koji će se oglasiti nakon duljeg znatnog odstupanja od zadanih parametara.

U IVF laboratoriju mora biti osigurana neprekidna opskrba strujom (UPS).

2.3.3. Prostorija za kriopohranu

Minimalna oprema koju prostorija za kriopohranu mora imati je: uređaj za mjerenje razine kisika u krioprostoriji, 2 spremnika za pohranu zamrznutog biološkog materijala, 1 spremnik za tekući dušik.

2.3.4. Kvalifikacija i validacija uređaja

Kvalifikacija uređaja se obično vrši kod primitka nove opreme, preinake opreme, promjene uvjeta okoline ili preseljenja opreme. Kvalificiraju se svi funkcionalni parametri koji su važni za ispravan rad te svi ostali elementi koji su podložni regulatornim propisima. Za očuvanje kvalifikacijskog statusa potrebno je redovito održavanje i čišćenje uređaja. Za svaki uređaj potrebno je imati dostupan priručnik o radu. Kalibracija uređaja, izmjena potrošnih dijelova uređaja, te servisi vrše se ovisno o preporukama proizvođača. Svi postupci kvalifikacije i validacije uređaja moraju biti dokumentirani.

2.4. Indikatori kvalitete rada

Indikatori kvalitete ključni su za razvoj sustava kvalitete i njegovo održavanje. Kod odabira indikatora treba se odlučiti za one koji donose mjerljivu korist IVF centru na području rada koje se želi pratiti i poboljšati (efikasnost programa, financije, zadovoljstvo radnika, pacijenata itd.). Preporuča se uvesti redovite radne sastanke osoblja uključenog u MPO kako bi se preispitala zaduženja, njihova sljedivost i učinkovitost.

Ovdje su navedeni prijedlozi za indikatore kvalitete centra i IVF laboratorija, a svaki centar/laboratorij treba pronaći ono što najviše odgovara njegovom načinu rada i cilju.

Indikatori kvalitete IVF centra mogu biti:

- postotak trudnoća izražen prema dobi pacijentice (do 30, 30-35, 35-40, 40-42, od 42 god.),
- postotak trudnoća izražen prema broju prijenosa zametaka,
- postotak implantacije,
- udio biokemijskih trudnoća,
- udio kliničkih trudnoća,
- udio spontanih pobačaja,
- postotak višeplođnih trudnoća,
- postotak poroda.

Indikatori kvalitete IVF laboratorija mogu biti:

- procjena početne pozicije izražena postotkom MII jajnih stanica,
- postotak oplodnje u konvencionalnom postupku IVF,
- postotak oplodnje u postupku ICSI izražen omjerom 2PN zigota / jajnih stanica u fazi MII,
- postotak oštećenih jajnih stanica nakon postupka ICSI,
- postotak ciklusa sa smanjenim stupnjem oplodnje (npr. 25% ili 50%),
- postotak nastalih zametaka,
- kvaliteta zigota, zametaka 2., 3., 5. dan,
- postotak fragmentiranih zametaka,
- postotak razvoja blastociste,
- postotak prenešenih i zamrznutih zametaka (u odnosu na broj MII jajnih stanica ili 2PN zigota),
- postotak preživljavanja jajnih stanica i/ili zametaka nakon odmrzavanja.

2.5. Kontrola kvalitete

Sustav kvalitete podrazumijeva organizacijsku strukturu, definirane odgovornosti, postupke, procese i resurse potrebne za uvođenje sustava upravljanja kvalitetom i njegovu provedbu, a uključuje sve aktivnosti koje izravno ili posredno pridonose kvaliteti. Sustav kontrole kvalitete podrazumijeva kvalifikaciju (utvrđivanje valjanosti) uređaja, standardnih operativnih postupaka, dokumentacije, čistog prostora, čišćenja i dezinfekcije prostora,

validaciju uređaja i prostora, nadzor kvalificiranih sustava, kontrole izmjena te rekvalifikaciju. Kontrolom kvalitete uspostavlja se i kontrola sljedivosti biomaterijala te reagensa korištenih u radu. Kontrolu kvalitete uspostavlja imenovana odgovorna osoba za sustav kvalitete, a obavlja se uz pomoć svih zaposlenika.

Standardni operativni postupci (SOP) ili upute propisuju na koji se način odvijaju određene aktivnosti u laboratoriju. U SOP se trebaju navesti svi postupci uključeni u medicinski pomognutu oplodnju. Revizija SOP-a se treba odvijati po potrebi, a pregled SOP-ova jedanput godišnje. Stare verzije SOP-a se trebaju arhivirati i čuvati.

Sva kritična oprema mora se redovito održavati, servisirati, čistiti i dezinficirati te se o tome treba voditi odgovarajuća evidencija. Pravilan rad uređaja i sustava treba redovito pratiti i u slučaju promjena reagirati. Nova i popravljena oprema treba biti testirana prilikom instalacije i validirana prije uporabe. Rezultati testiranja moraju biti dokumentirani.

Svaka promjena koja utječe na kvalitetu ili sigurnost pacijenta treba biti kritički razmotrena te odobrena ili odbijena te dokumentirana. Dokumentirati se trebaju preinake na opremi, nova namjena uređaja, promjene prostora, promjena procesa te novi proces ili način rada.

Za svaki uređaj potrebno je propisati vrijeme ili uvjete redovite rekvalifikacije (uobičajeno 6-12 mjeseci). Za svako testiranje potrebno je dobiti dokumentaciju.

2.5.1. Sljedivost uzoraka i materijala koji se koriste za rad

Prilikom zaprimanja uzoraka spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka potrebna je pažljiva identifikacija uzorka. Svaka manipulacija biomaterijalom treba biti zabilježena te je potrebna identifikacija osoblja koje je izvršilo manipulaciju. Sustav obilježavanja uzoraka mora biti pregledan i jasan svim zaposlenicima koji manipuliraju uzorcima. Svi korišteni uzorci u jednom postupku dobivaju svoj jedinstveni identifikacijski broj (šifra postupka) koji bi se trebao zabilježiti u svim evidencijama vezano uz taj postupak medicinske oplodnje ili kriopohrane.

Serijski brojevi materijala i lijekova korištenih u postupku trebaju biti pregledno navedeni za pojedine postupke ili za vrijeme protoka materijala u laboratoriju. Rad s uzorcima različitih pacijenata treba biti vremenski i prostorno odvojen kako bi se izbjeglo miješanje i zamjena uzoraka. U svim postupcima treba voditi računa o sljedivosti uzoraka spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka.

2.6. Dokumentacija

Svi postupci medicinski pomognute oplodnje koji se izvode moraju biti dokumentirani. Dokumentacija mora sadržavati sljedeće osnovne podatke:

- identifikacija bračnog/izvanbračnog para
- identifikacija spolnih stanica, spolnih tkiva, zigota i zametaka

- vrsta postupka medicinski pomognute oplodnje
- korišteni kritični materijal (npr. vrsta medija)
- djelatnici koji su obavljali postupak ili koji su svjedočili postupku

Dokumentacija mora biti u pisanom ili elektronskom obliku, a zabilješke jasne, neizbrisive i dostupne u svakom trenutku. Postojeću dokumentaciju moguće je voditi pomoću odgovarajućeg računalnog programa.

Svi postupci moraju biti opisani u standardnom operativnom postupku (SOP) s pripadajućim obrascima. Svi djelatnici moraju biti upoznati sa sadržajem SOP-ova i odgovorno postupati u skladu s njima.

2.6.1. Obrasci definirani zakonom i pravilnicima

Sukladno Zakonu o medicinski pomognutoj oplodnji i podzakonskim aktima, svaka zdravstvena ustanova ovlaštena od Ministarstva zdravlja RH za obavljanje postupaka medicinski pomognute oplodnje ima obavezu koristiti obrasce koji su definirani važećim Zakonom i pravilnicima.

Obrasci kojima pacijenti pristaju na neki postupak liječenja i obrasci koji se odnose na biološki materijal moraju biti propisno ispunjeni, potpisani od strane pacijenta i nadležnog liječnika te predani u ustanovu prije samog postupka. Nakon obavljenog postupka ispunjeni obrasci prilažu se u karton pacijenta.

Kako bi se osigurala kontrola obavljenih postupaka i onih koji su u tijeku te osigurala sljedivost postupanja s biološkim materijalom, u ustanovi moraju postojati uputstva za rad u pisanom obliku za sve postupke koji se primjenjuju. Svi djelatnici moraju biti upoznati s uputstvima za rad kojeg obavljaju te postupati u skladu s njima.

U ustanovi moraju postojati jasno napisana uputstva za rukovanje svim uređajima koji se koriste na hrvatskom jeziku. Uputstva se moraju nalaziti na dostupnom mjestu.

Za čišćenje radnog prostora i opreme ustanova mora imati SOP. Dužnost je kliničkog embriologa naučiti osoblje zaduženo za čišćenje kako pravilno postupati u prostoru IVF laboratorija.

U ustanovi moraju postojati definirani obrasci u koje se bilježe svi postupci koji su obavljani kod pojedinog pacijenta. Obrazac treba sadržavati: šifru postupka, podatke o pacijentu, podatke o postupku, osobe koje su obavile postupak, datum i vrijeme izvođenja postupka, ako je potrebno navesti i materijale koji su pri postupku korišteni te kakav je bio ishod postupka. Ispunjeni obrasci o obavljenim postupcima moraju biti pohranjeni u povijest bolesti svakog pacijenta, te lako dostupni. Ovi podatci mogu se pohranjivati i u elektroničkom obliku.

Svaka ustanova mora voditi evidenciju o naručenom i isporučenom potrošnom materijalu iz koje trebaju biti vidljivi svi važni podatci o materijalu.

U svrhu kontrole kvalitete postupaka i sljedivosti rada s biološkim materijalom potrebno je voditi evidenciju serijskih brojeva kritičnih materijala (lijekova, medija, otopina za zamrzavanje i odmrzavanje). Serijski brojevi kritičnih materijala koji su korišteni u pojedinim postupcima moraju se zapisati na obrasce postupaka za svakog pacijenta.

2.6.2. Pohrana podataka u elektroničkom obliku

Preporučuje se podatke o MPO postupcima te sve ostale važne podatke koji su spremljeni u elektroničkom obliku ujedno pohranjivati i u vanjskoj ustanovi koja se bavi pružanjem usluge pohrane podataka. Ustanova koja pruža uslugu pohrane podataka mora dnevno vršiti „back up“ podataka.

2.6.3. Kvalifikacija dokumentacije

Sustav upravljanja dokumentacijom predstavlja osnovu sustava kvalitete. Jasna i dobro definirana dokumentacija osigurava provođenje sustava, informiranost zaposlenih, osigurava kvalitetu proizvoda ili usluge, sljedivost svih provedenih aktivnosti te mogućnosti nadzora. Važeća dokumentacija je ona za koju je obvezna primjena. Popis važeće dokumentacije treba ažurirati po potrebi te odrediti period pregleda i/ili revizije u skladu sa zahtjevima poslovanja ili regulatornim zahtjevima. Vrijeme čuvanja dokumenata i zapisa treba definirati internim uputama i uskladiti sa zakonskim propisima i regulatornim zahtjevima. Dopune i različite izmjene već izdanog i distribuiranog dokumenta obavljaju se na isti način kao i početna izrada dokumenta. Izmijenjeni se dokument označava na propisani način (oznaka nove verzije, poništavanje stare verzije), dok se kratki opis izmjena treba navesti u Pregledu revizija/izmjena. Nevažeći dokumenti se trebaju ukloniti iz važeće dokumentacije te arhivirati i čuvati.

2.7. Odgovornosti i zaduženja

2.7.1. Odgovornosti

Odgovornost djelatnika koji sudjeluju u postupcima MPO je rukovanje s uzorcima i materijalima te provođenje postupaka MPO u skladu sa propisanim SOP-ovima.

Za identifikaciju pacijentice prilikom davanja terapije odgovorna je medicinska sestra koja izvodi postupak.

Za identifikaciju davatelja uzorka sjemena i zametaka prilikom prijenosa u maternicu odgovoran je djelatnik koji predaje odnosno djelatnik koji preuzima uzorak.

Za pripremu materijala za postupke MPO odgovoran je tehničar/klinički embriolog koji izvodi postupak.

Za analizu i obradu sjemena za postupke MPO odgovoran je tehničar/klinički embriolog koji izvodi postupak.

Za izvođenje postupaka MPO, zamrzavanje i odmrzavanje spolnih stanica i zametaka, te kriopohranu i evidenciju kriopohranjenih spolnih stanica, tkiva i zametaka odgovoran je klinički embriolog koji izvodi navedene postupke.

Za identifikaciju pacijentice prilikom punkcije folikula i prijenosa zametaka odgovoran je liječnik s užom specijalizacijom iz humane reprodukcije.

Odgovorna osoba za upravljanje odjelom određuje i kontrolira sljedivost materijala i provjerljivost svakog koraka postupka.

2.7.1.1. Odgovorna osoba za upravljanje sustavom kvalitete

Odgovorna osoba mora ispunjavati slijedeće uvjete i kvalifikacije:

- a) mora posjedovati diplomu, certifikat ili drugi dokaz formalnog obrazovanja u području medicinskih ili bioloških znanosti stečen na priznatom sveučilištu
- b) mora imati najmanje dvije godine praktičnog iskustva u području MPO

Odgovornosti odgovorne osobe za sustav kvalitete su:

- a) odgovara da su humana tkiva i stanice namijenjene za primjenu u ljudskom tijelu s kojima se rukuje u centru testirane, obrađene, pohranjene i distribuirane u skladu s direktivama EU i nacionalnim zakonodavstvom
- b) odgovorna je za planiranje i održavanje periodične kontrole djelotvornosti sustava upravljanja kvalitetom te za imenovanje internog revizora.
- c) dostavlja informacije nadležnom tijelu Ministarstva zdravlja

2.7.2. Radna zaduženja

2.7.2.1. Radna zaduženja ginekologa sa subspecijalizacijom iz humane reprodukcije

Radna područja ginekologa sa specijalizacijom iz humane reprodukcije su:

- postavljanje dijagnoze neplodnosti
- detaljno upoznavanje neplodnog para sa metodama pomognute oplodnje
- individualno odabiranje najbolje metode pomognute oplodnje za svaki par prema MPO smjernicama i pravilima struke
- prethodna priprema za MPO koja ponekad uključuje osim osnovnih detaljnih anamnestičkih podataka, te hormonskih i laboratorijskih pretraga i ultrazvučnih kontrola i dodatne zahvate ukoliko su potrebni: histerosonosalpingografija koja može biti rentgenska i ultrazvučna, tzv. rtg-HSG ili sono-HSG, biopsija endometrija, histeroskopija i/ili laparoskopija
- provođenje odabrane metode kroz:

- a) stimulaciju ovulacije pacijentice odabranim lijekovima;
- b) serijsko ultrazvučno praćenje rasta i razvoja folikula (folikulometrije);
- c) pravodobno tempiranje i provođenje punkcije jajnika, tj. aspiracije folikula
- d) embriotransfer
- kontrola rezultata nakon završenog postupka kroz kontrolne BHCG i ultrazvučne kontrole
- vođenje dokumentacije o svakom paru, postupcima, rezultatima i uspješnosti postupaka

2.7.2.2. Radna zaduženja kliničkih embriologa

Radna područja kliničkog embriologa su embriologija, andrologija, kriobiologija, reproduktivna genetika, etika i legislativa u MPO, osiguranje kvalitete i postavljanje sustava kvalitete u MPO. Navedeno se u praksi očituje kroz specifične vrste radnih zadataka kao što su:

- prikupljanje jajnih stanica i sjemena pacijenata u postupku MPO
- procjena kvalitete spolnih stanica
- priprema spolnih stanica i radnih uvjeta za oplodnju *in vitro*, te njihova kultivacija
- poticanje oplodnje
- mikromanipulacija spolnim stanicama
- održavanje vijabilnosti spolnih stanica, reproduktivnog tkiva i zametaka tijekom postupka MPO
- zamrzavanje, kriopohrana, odmrzavanje biološkog uzorka
- kultivacija zametaka
- praćenje razvoja zametaka u kulturi *in vitro*
- odabiranje zametaka za prijenos i dogovor o postupanju s preostalim zametcima
- razumijevanje humane reproduktivne biologije, embriologije, neplodnosti i MPO
- primjenjivanje znanja o osiguranju kvalitete, etičnosti i zakonskoj regulaciji koja se tiče rukovanja sa spolnim stanicama i zametcima
- briga i održavanje opreme
- vođenje dokumentacije

2.8. Unutrašnja i vanjska revizija

Unutrašnju i vanjsku reviziju potrebno je planirati i raditi periodično kako bi se kontrolirala djelotvornost sustava upravljanja kvalitetom te provjerilo dosljedno izvršavanje svih predviđenih postupaka. Revizija omogućuje identifikaciju kritičnih točaka procesa ili točaka procesa koje se mogu poboljšati s namjerom poboljšanja cijelog procesa liječenja.

Sve provedene kontrole moraju se dokumentirati i arhivirati kako bi se mogla dokazati djelotvornost ustanove i svih postupaka koji se u njoj provode.

Revizije se ostvaruju kroz:

- unutrašnju reviziju
- vanjsku reviziju
- vanjsku reviziju po zahtjevu.

Unutrašnju reviziju izvodi djelatnik ustanove, neovisan o procesu koji je predmet revizije, te kvalificiran kao unutrašnji revizor. Unutrašnji revizor je odgovoran za izradu i ostvarivanje godišnjeg plana revizije, odobrenog od strane odgovorne osobe ustanove ili odjela. Plan mora obuhvatiti najmanje jedan ciklus kontrole procesa ustanove.

Vanjsku reviziju izvode za to ovlaštene osobe u svrhu kontrole procesa i shodno evidentiranoj problematici.

Ako se utvrdi neophodnost provjeravanja sukladnosti sustava upravljanja kvalitetom (npr. zbog reklamacije pacijenta), interni revizor može zatražiti od ravnatelja ustanove ili voditelja odjela odobrenje za izvođenje izvanredne revizije.

Nesukladnosti i primjedbe proizašle iz procesa revizije predstavljaju se i diskutiraju s odgovornom osobom odjela koji je bio predmetom revizije, definiraju se mogući zahtjevi za poduzimanje korektivnih i/ili preventivnih mjera.

Unutrašnji revizor može predložiti korektivne mjere, ali odgovornost za njihovo definiranje i izvršenje je na odgovornim osobama odjela ili ustanove.

Revizor izrađuje se izvještaj o reviziji koji sadrži sve primjedbe i nesukladnosti proizašle iz revizije kao i primjedbe intervjuiranih osoba. Kopija revizijskog izvještaja dostavlja se odgovornoj osobi za sustav kvalitete.

2.9. Okoliš i higijena u MPO

2.9.1. Čišćenje i dezinfekcija

Čišćenje i dezinfekcija se trebaju održavati redovito i sukladno s pravilima čišćenja u pojedinim prostorijama (pripaziti na čisti prostor). Sredstva koja se pri tom koriste ne smiju

utjecati na rad opreme i na kvalifikacijski status. Otpad se treba odvajati na infektivni i komunalni otpad.

Klinički embriolozi/tehničari, zaduženi su za čišćenje radnih površina i opreme na način i učestalosti navedenom u SOP-u. Osoblje zaduženo za čišćenje mora biti obučeno za kretanje i čišćenje čistih prostora (uključujući podove, zidne obloge, vrata, prozore, stolice).

2.9.2. Rizik od infekcija

Prije ulaska u postupak MPO, bračni/izvanbračni partneri su testirani u skladu sa Zakonom o MPO. Postupci medicinski pomognute oplodnje za pacijenticu i njezinu trudnoću ne sadrže veće rizike od prijenosa uzročnika bolesti iz partnerovog sjemena nego što su prisutni kod spontanog začeća.

Prilikom izvođenja svih navedenih metoda MPO važno je održavanje primjerene stalne temperature i koncentracije plinova u okolišu jajnih stanica i zametaka u pojedinim stadijima njihova razvitka.

Djelatnici laboratorija trebaju nositi standardnu zaštitnu odjeću i obuću.

Sredstva za čišćenje i dezinfekciju otrovna su za stanice pa stoga predstavljaju opasnost za kulturu spolnih stanica i zametaka. Zbog toga treba primijeniti sljedeće preporuke u odnosu na opće smjernice o higijeni:

- za pranje i dezinfekciju radnih površina i prostora koriste se sredstva preporučena za uporabu u IVF laboratorijima, a postupak se provodi prema SOP-u ustanove
- nije preporučeno čišćenje i dezinfekcija prostora i oprema ukoliko postoji opasnost da su djelovanju sredstava za čišćenje i dezinfekciju izloženi spolne stanice/reproduktivna tkiva/zameci.
- higijensko pranje i brisanje ruku mora se obaviti prije početka rada i prilikom napuštanja radnog područja
- postoji li sumnja u kontaminaciju klicama, treba obaviti dokumentiranu provjeru čistoće ruku, radnih površina, inkubatora i spremnika s tekućim dušikom. Prema nalazima u slučaju potrebe, trebaju se provesti korektivne mjere.

Bračni/izvanbračni par je obavezan prije ulaska u postupke medicinski pomognute napraviti pretrage za HBsAg, anti HCV, HIV Ag/At kombinirani test.

U slučaju kada su rezultati testiranja pacijenata na hepatitis B, hepatitis C ili HIV pozitivni, u laboratoriju se mora isključiti rizik od unakrsne zaraze i zaraze osoblja te uspostaviti sustav zasebne pohrane takvog biološkog materijala. Optimalno rješenje ovog problema je opremanje zasebnog laboratorija za visokorizične uzorke (po vrstama infekcija) jer se na taj način značajno smanjuje rizik od prijenosa infekcije. Takav pristup često nije moguć zbog visokih troškova, stoga bi bilo razumno odvojiti vrijeme izvođenja takvih postupaka (odrediti tjedne u godini kada se obavljaju postupci za pacijente s indikacijom pojedine

zarazne bolesti). Ukoliko je zaražena osoba u postupku, a nije odvojena prostorno, tada postupak aspiracije i transfera zametaka raditi nakon svih postupaka tog dana, a spolne stanice i zametke kultivirati u odvojenom inkubatoru. Sve radne površine i inkubator moraju biti nakon toga dezinficirani prema napatku infektologa. Bez obzira na model rješenja ovog problema, preporučuje se uporaba mini-inkubatora koji imaju zasebne zatvorene elemente za svaki uzorak (fizički odvojene), postupci medicinski pomognute oplodnje trebali bi se odvijati u besprašnim komorama biološke razine sigurnosti II.

3. BIONADZOR (BIOVIGILANCIJA) U MPO

Bionadzor u MPO podrazumijevaju posebnu pažnju i oprez pri rukovanju sa spolnim stanicama, spolnim tkivima i zametcima, potrošnim materijalom namjenjenim za staničnu kulturu (hranilišta, plastika za kultiviranje, pribor za rukovanje i manipulaciju biološkim materijalom), uređajima (inkubatori, besprašne komore, mikromanipulatori, spremnici za kriopohranu) i lijekovima (farmakovigilancija, npr. kod slučajeva OHSS).

Spolne stanice i zametci imaju specifične karakteristike o kojima uvijek treba voditi računa:

- jajne stanice i zametci prisutni su u ograničenom broju
- spolne stanice i zametci posebno su osjetljivi na vanjske čimbenike (temperatura, pH, sastav hranilišta itd.)
- neodgovarajuće postupanje sa spolnim stanicama, spolnim tkivima i zamecima može se odraziti na primatelja i na potomstvo
- štetni ishodi povezani s gubitkom spolnih stanica ili zametaka mogu dovesti do gubitka prilike za začeće

Bionadzor u MPO treba obuhvatiti:

- sljedivost spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka
- sljedivost potrošnog materijala i postupaka koji utječu na kvalitetu spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka
- sljedivost postupaka koji mogu dovesti do zamjene bioloških uzoraka
- komplikacije tijekom liječenja
- prekogranično upravljanje ozbiljnim štetnim reakcijama i događajima

Ozbiljne štetne reakcije (OŠR, engl. *serious adverse reactions-SARs*) i ozbiljni štetni događaji (OŠD, engl. *serious adverse events-SAEs*) definirani su u Direktivama

2004/23/EC i 2006/86/EC. Svaka pogrešna identifikacija spolnih stanica, zamjena ili gubitak spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka predstavlja ozbiljan štetan događaj. U slučaju heterologne oplodnje prenošenje genetske bolesti na potomke predstavlja ozbiljnu štetnu reakciju.

3.1. Opći kriteriji za izvještavanje o ozbiljnim štetnim reakcijama i događajima

Sve štetne reakcije ili događaji koji mogu utjecati na kvalitetu i sigurnost spolnih stanica, spolnih tkiva i zametaka moraju se zabilježiti i o njima se mora obavijestiti Ministarstvo zdravlja RH. Zdravstvene ustanove dužne su obavijestiti Ministarstvo zdravlja RH u slijedećim slučajevima:

- neodgovarajuće spolne stanice, spolna tkiva ili zametci otpušteni su za kliničku upotrebu (čak i ako nisu korišteni)
- dogodio se štetni događaj koji je utjecao na druge pacijente ili donore
- došlo je do zamjene spolnih stanica, spolnih tkiva ili zametaka
- dogodio se gubitak sljedivosti spolnih stanica, spolnih tkiva ili zametaka
- došlo je do kontaminacije ili unakrsne kontaminacije
- došlo je do gubitka/uništenja spolnih stanica, spolnih tkiva ili zametaka (npr. zbog kvara inkubatora ili greške pri manipulaciji) koji je rezultirao gubitkom mogućnosti za začeće u jednom ciklusu liječenja

Zamjena uzoraka rezultat je grešaka pri rukovanju sa spolnim stanicama, spolnim tkivima ili zametcima i može se dogoditi u bilo kojem koraku kliničkog ili laboratorijskog rada. U izvještaju Ministarstvu zdravlja treba navesti razloge koji su doveli do zamjene (npr. pogrešna identifikacija pacijenta, pogrešno označavanje uzorka) kao i posljedice koje su nastale (npr. gubitak sljedivosti, gubitak spolnih stanica, spolnih tkiva ili embrija, prenošenje bolesti). Potrebno je istražiti koji su uzroci doveli do štetnog događaja ili reakcije. Sve pacijente koji su uključeni u štetni događaj ili reakciju potrebno je što prije obavijestiti te im osigurati potporu, savjetovanje i liječenje.

Svi štetni događaji ili reakcije koji se dogode tijekom liječenja, posebno teški sindrom hiperstimulacije jajnika (engl. OHSS), trebaju se prijaviti Ministarstvu zdravlja.

3.2. Prijenos genetskih bolesti ne-partnerskom donacijom

Ne-partnerski donori mogu nesvjesno biti nosioci genetičkih bolesti. Zbog toga ne-partnerske donore, kao i primatelje, treba informirati o mogućnosti prijenosa genetičke bolesti. Ne-partnerske donore treba savjetovati da moraju obavijestiti zdravstvenu ustanovu ukoliko im je dijagnosticirana neka genetička bolest. Primatelje ne-partnerskih donacija treba savjetovati da obavijeste liječnika koji liječi njihovo dijete o načinu njegovog začeća,

kako bi se istraga o uzroku nastalog genetičkog defekta mogla provesti na pravi način. Ako je potrebno, uporabu spolnih stanica određenog donora treba obustaviti.