

Klinisk Guideline: IVF/ICSI Laboratoriedelen.

Forfattere: Morten Rønn Petersen, Steen Laursen, Johnny Hindkjær, Marie Louise Grøndahl

Tovholder og korrespondance: Marie Louise Grøndahl

Status:

Diskuteret på DFS guidelinemøde den 10.-11.marts 2017

Endelig guideline: godkendes på DFS årsmødet den 12. marts 2017

Guideline skal revideres senest:

Indholdsfortegnelse

Indledning	3
Om evidens og kvalitet	3
Fokuseret spørgsmål 1	4
Baggrund og Afgrænsning af emnet	5
Pico 1-4 Evidens kvalitet og anbefalingens styrke	7
Overordnet konklusion	10
Fokuseret spørgsmål 2	11
Baggrund og Afgrænsning af emnet	11
Pico A-D Evidens kvalitet og anbefalingens styrke	14
Overordnet konklusion	22
Litteratursøgningsmetode	22
Referencer	23
Bilag	26

Indledning

I nærværende guideline behandles to fokuserede spørgsmål særskilt med et antal PICO spørgsmål hver. De fokuserede spørgsmål har det til fælles, at det drejer sig om timingen af aktion/håndtering af gameterne og embryonerne i relation til behandlingen. Hvornår er det optimalt at tage cumulus-oocyt-complexet (COC) ud i relation til administration af ovulations/oocytmodnings triggeren? Og hvor længe skal det befrugtede æg udvikle sig i dyrkningsmediet i laboratoriet, før det tilbageføres til livmoderen? Denne guideline adresserer udelukkende timing mellem trigger og ægudtagningen (OPU), men behandler ikke timingen før, så som hvornår det er mest optimalt at administrere triggeren i forhold til den kontrollerede ovarielle stimulation (COS) (Kyrrou et al., 2011).

Om evidensens kvalitet og anbefalingens styrke

I afsnit med PICO spørgsmål er graduering af evidensens kvalitet og anbefalingsstyrke baseret på GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation).

GRADE

Høj (++++). Vi er meget sikre på, at den sande effekt ligger tæt på en estimerede effekt.

Moderat (+++). Vi er moderat sikre på den estimerede effekt. Den sande effekt ligger sandsynligvis tæt på denne, men der er en mulighed for, at den er væsentligt anderledes.

Lav (++) Vi har begrænset tiltro til den estimerede effekt. Den sande effekt vil sandsynligvis være væsentligt anderledes end den estimerede effekt.

Meget lav (+) Vi har meget ringe tiltro til den estimerede effekt. Den sande effekt vil sandsynligvis være væsentligt anderledes end den estimerede effekt.

Stærk anbefaling for ↑↑ der gives en stærk anbefaling for, når de samlede fordele ved interventionen vurderes at være klart større end ulemperne.

Svag/betinget anbefaling for ↑ der gives en svag/betinget anbefaling for interventionen, når vi vurderer, at fordelene ved interventionen er marginalt større end ulemperne, eller den tilgængelige evidens ikke kan udelukke en væsentlig fordel ved en eksisterende praksis, samtidig med at det vurderes, at skadevirkningerne er få eller fraværende.

Svag/betinget anbefaling imod ↓ der gives en svag/betinget anbefaling imod interventionen, når vi vurderer, at ulemperne ved interventionen er større end fordelene, men hvor dette ikke er underbygget af stærk evidens. Vi anvender også denne anbefaling, hvor der er stærk evidens for både gavnlige og skadelige virkninger, men hvor balancen mellem dem er vanskelig at afgøre.

Stærk anbefaling imod ↓↓ der gives en stærk anbefaling imod, når der er evidens af høj kvalitet, der viser, at de samlede ulemper ved interventionen er klart større end fordelene. Vi vil også anvende en stærk anbefaling imod, når gennemgangen af evidensen viser, at en intervention med stor sikkerhed er nyttesløs.

God praksis √ God praksis bygger på faglig konsensus blandt medlemmerne af arbejdsgruppen, der har udarbejdet den kliniske retningslinje, og anvendes, når der ikke foreligger relevant evidens. Anbefalingen kan være enten for eller imod interventionen.

Oxford centre for Evidence-Based Medicine.

I afsnit, hvor der ikke er brugt GRADE er evidensen beskrevet med referencer til diverse metaanalyser, RCT og andre relevante studier og evidensstyrke er graderet i henhold til Oxford Centre for evidence-based Medicine Levels of Evidence (<http://www.cebm.net/?o=1025>).

Fokuseret spørgsmål 1

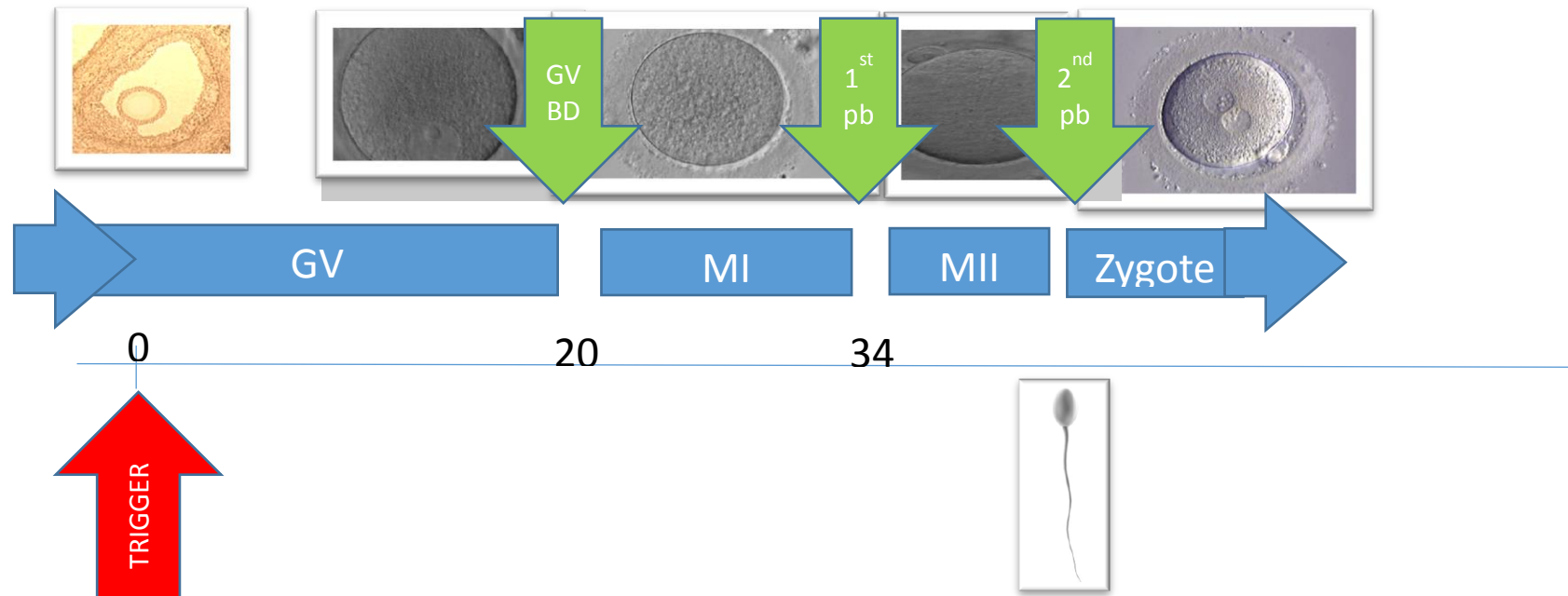
Har timingen mellem ovulationstrigger (hCG) administration og OPU betydning for outcome af IVF/ICSI behandling?

- Pico 1
Har timingen mellem ovulationstrigger administration og OPU betydning for outcome af IVF/ICSI behandling? (Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU være over 36 timer?)
- Pico 2
Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU være over 36 timer hos kvinder med < 50 % MII rate i forudgående beh?
- Pico 3
Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU differentieres efter kvindens alder?
- Pico 4
Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU differentieres efter COS protokol?

Baggrund

Oocytens udvikling sker gennem en op til 6 måneder lang vækst fra aktiveringen i den hvilende primordiale follikel til den pre-ovulatoriske follikel, hvor ovulationssignalet (LH-toppen i den naturlige cyklus hhv. ovulations trigger signalet i ART cykli), hvor aktiveringen af LH-receptorerne på granulosa og cumulusceller inducerer den finale modning via signalering gennem gap-junctions mellem cumuluscellerne og oocytten. Signalet aktiverer genoptagelsen af meiosen med germinal vesiklens breakdown (GVBD) og efterfølgende 1. meiotiske deling og udskydelse af 1. pollegme. (in review: Lyndia et al., 2013). Herefter fastholdes oocytten i anden meta fase (MII) indtil sædcellens indtrængen og aktivering via phospholipase C.

Tidslinjen (ovulationstriggeren: t=0 timer) for kernemodningen over GV – GVBD – MI – MII er angivet herunder i Figuren.



FIGUR: Timingen i kernemodningen af den humane oocyt i timer efter administration af ovulationstriggeren

Udover kernemodningen, som kan verificeres ved mikroskopering, tales også om den såkaldte cytoplasmatiske modning, hvilket bredt (og uspecifikt) dækker over oocytens evne (alt der gennem oogenesen er etableret i cytoplasmaet – organeller, mRNA, proteiner etc etc) til at styre processen/understøtte den tidlige embryonaludvikling. Den kompetente MII oocyt har således kapacitet efter ægløsningen til at blive befrugtet, gennemgå anden meiotiske deling med udskydelse af 2. pollegeme, passere den maternelle-embryonelle transition, etablere graviditet og resultere i fødsel af et rask barn.

Tidlige studier viser, at ovulation sker 36-40 timer efter hCG injection i forbindelse med kontrolleret ovariel stimulation (COS) (Edwards and Steptoe, 1975; Testart and Frydman, 1982).

For at undgå spontan ovulation i forbindelse med COS er OPU derfor ofte timet til 32-36 timer efter administration af ovulations trigger, hvor COC'et isoleres fra follikelvæsken og placeres i ekvibreret dyrkningsmedie og efterfølgende insemineres ved IVF eller ICSI, hvor cumuluscellerne forinden er fjernet enzymatisk og mekanisk (denudering).

Kan timingen i håndteringen af oocytten optimeres, således at en evt. sidste modning af oocytten in vivo (øget interval mellem hCG og OPU) eller in vitro (senere denudering og/eller ICSI) vil bidrage med øget oocyt kvalitet? Adskillige studier har fokuseret på timingen mellem hCG priming og OPU, og for denudering/ICSI og hvordan denne influerer på behandlings outcome såsom MII rate, befrugtningsrate, implantationsrate og graviditetsrate. Interessant rapporterer studier om OPU helt op til 38-41 timer efter hCG administration uden forekomst af spontan ovulation (Nargund et al, 2001; Bjercke et al, 2000; *lang protokol*), hvilket kunne tyde på senere ovulation end de tidlige studier (uden GnRH antagonist/korte COS protokoller) indikerede (Wang et al. 2011). Case reports med OPU op til 50 timer efter hCG administration med succesfuldt outcome (barn født) er publiceret (Hussain et al., 2016).

Afgrænsning af emnet

Denne guideline omhandler effekten af OPU timing i forhold til administration af hCG , hhv timing mellem OPU og denudering/ICSI i forbindelse med assisteret reproduktion (ART) outcome (MII rate, befrugtnings rate, implantationsrate og graviditetsrate).

Hvad indeholder denne guideline ikke: Effekten af OPU timing i forhold til administration af GnRH agonist som ovulationstrigger.

Pico 1

Har timing'en mellem ovulationstrigger administration og OPU betydning for outcome af IVF/ICSI behandling? (Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU være over 36 timer?)

Baggrund

Efter administration af ovulationstrigger (hCG) i COS cykli aktiveres den sidste modning af folliklen og oocytten. I forbindelse med IVF og ICSI foretages OPU X timer før ovulationen forekommer for efterfølgende at inseminere oocytterne in vitro.

Population

Patient population i IVF/ICSI behandling med forskellige årsager til infertilitet.

Intervention

Kort interval mellem ovulations trigger administration og OPU, [33-36] timer.

Sammenligning

Langt interval mellem ovulations trigger administration og OPU,]36-41] timer.

Gennemgang af evidens (bilag 1 og 2)

Denne guideline baserer sig primært på en enkelt metaanalyse (Wang et al. 2011, bilag 1) og desuden på større retrospektive studier.

Meta-analysen inkluderer 5 prospektivt randomiserede studier, men studierne er heterogene, hvad angår population, intervention og outcomes. Variationen i studieprotokoller, herunder timingsintervallerne, betyder, at ingen af studierne er fuldstændig sammenlignelige.

Der er **lav** (++) evidens for at MII raten øges ved langt interval mellem ovulations trigger administration og OPU (bilag 1, understøttet af retrospektive

studier bilag 2).

Der er **lav** (++) evidens for at langt interval mellem ovulations trigger administration og OPU ikke påvirker befrugtningensraten, implantationsraten eller ongoing graviditetsrate (bilag 1, understøttet af retrospektive studier bilag 2)

Ulempen, spontan ovulation, er ikke systematisk rapporteret i studierne, men flere studier fremhæver, at spontan ovulation ikke forekom i gruppen med langt interval mellem hCG administration og OPU (Nargund, 2001; Bjercke, 2000, Raziel, 2006). Bemærk at studierne, der rapporterer om spontan ovulation udelukkende repræsenteres af cykli med COS efter lang protokol.

Pico 2

Bør intervallet mellem ovulations trigger og OPU være over 36 timer hos kvinder med < 50 % MII rate i forudgående behandling?

Baggrund

Efter administration af ovulationstrigger i COS cykli aktiveres den sidste modning af folliklen og oocytten. I forbindelse med IVF og ICSI foretages OPU X timer før ovulationen forekommer for efterfølgende at inseminere oocytterne in vitro. I standard settings rapporteres sædvanligvis om en MII rate på 80%, når oocytens kerne modenhed observeres i forbindelse med ICSI. Hos nogle kvinder ses en væsentlig lavere MII rate.

Population

Patient population i ICSI behandling med forskellige årsager til infertilitet, hvor der ved forudgående behandling havde været under 50% MII rate.

Intervention

Kort interval mellem ovulations trigger administration og OPU, [33-36] timer (alder gns 35,3 år).

Sammenligning

Langt interval mellem ovulations trigger administration og OPU, [36-41] timer (alder gns 38,5 år).

Gennemgang af evidens (bilag 2)

Der findes kun et prospektivt randomiseret studie (Raziel et al , 2006), hvor 70 kvinder, der i forudgående cyklus havde < 50% MII rate ved ICSI, randomiseredes til OPU hhv under 36 timer og over 38 timer efter hCG administration. Der var signifikant lavere MII rate i gruppen med OPU efter 35 timer sammenlignet med over 38 timer.

Der er **meget lav** (+) evidens for at MII raten øges ved langt interval mellem ovulations trigger administration og OPU (bilag 2).

Pico 3

Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU differentieres efter kvindens alder?

Baggrund

Efter administration af ovulationstrigger i COS cykli aktiveres den sidste modning af folliklen og oocytten. Follikulogenesen ændres med kvindens alder, hvorfor der er fokus på, om timing såvel *in vivo* som *in vitro* skal tilpasses kvindens alder (Fitzgerald et al., 1994, Van Zonnenveld et al., 2003).

Gennemgang af evidens (bilag 2).

Der findes kun et retrospektivt studie, der i post hoc analyse i test for trend stratificeret for alder (p=0.09) i favør for sen OPU med kvindens stigende alder.

Der er **meget lav** (+) evidens for at tid mellem hCG trigger administration og OPU skal justeres i forhold til kvindens alder (bilag 2).

Pico 4

Bør intervallet mellem ovulations trigger (hCG) og OPU differentieres efter COS protokol?

Baggrund

Efter administration af ovulationstrigger i COS cykli aktiveres den sidste modning af folliklen og oocytten. De forskellige stimulations regimer og præparater påvirker follikeludviklingen og herunder potentielt den optimale timing af såvel *in vivo* som *in vitro* håndteringer og events.

Gennemgang af evidens (bilag 2).

På trods af at spontan ovulation sker oftere i ART cykli med GnRH antagonist protokol (kort) sammenlignet med GnRH agonist protokol (lang), især hos kvinder med lav ovariel reserve (Luo et al, 2016, Reichmann et al., 2014), foreligger der ikke studier, der prospektivt adresserer den optimale timing i de to stimulationsregimer. Studierne, der er inkluderet i meta-analysen, er alle med lang protokol, mens de senere retrospektive studier indeholder både korte og lange protokoller. Det ene af disse studier (Garor et al., 2015) med 614 (368 lange og 246 korte protokoller) ICSI cykli finder signifikant øget befrugtningssrate og ongoing graviditetsrate ved OPU over 36 timer efter hCG administration sammenlignet med under 36 timer. Analyseres effekten af tiden mellem OPU og hCG, ses effekten udelukkende i behandlingerne i den lange protokol (Garor et al., 2015).

Der er **meget lav (+)** evidens for at tiden mellem hCG trigger administration og OPU skal justeres i forhold COS (bilag 2).

OVERORDNEDE KONKLUSIONER

Ved OPU senere end 36 timer efter hCG priming er der **lav (++) kvalitets evidens** for, at MII raten øges og der er **lav (++) evidens** for, at længere interval (>36 timer) mellem ovulations trigger administration og OPU påvirker befrugtningssraten, implantationsraten eller ongoing graviditetsrate.

Der er **meget lav evidens (+)** kvalitet for af timing mellem OPU skal tilpasses hhv. kvindes alder og COS protokol.

Der er en mangel på godt designede RCT studier, som sammenligner forskellige timingsintervaller.

REKOMMANDATION

Svag/betinget anbefaling for (↑) interventionen i lang protokol.

Fokuseret spørgsmål 2

Øges kvindens graviditetschance ved 5/6 dages dyrkning sammenlignet med 2/3 dages dyrkning?

Intervention: Blastocyst (5/6 dages) dyrkning

Sammenligning: Cleavage stage (2/3 dages dyrkning)

- PICO A
Øges den kliniske graviditetsrate per behandling af frisk(e) embryon(er)?
- PICO B
Øges fødselsrate (levende barn) per behandling / Baby take home rate?
- PICO C
Øges den kumulativ graviditetsrate?
- PICO D
Nedsættes tiden fra behandlingsstart til graviditet / TTP, time to pregnancy?

Baggrund

Den primære praksis i human assisteret reproduktion (ART) har i mange år været at dyrke embryoner i laboratoriet i 2-3 dage efter befrugtning inden transferering tilbage til kvinden og kryopræserving af overskydende egnede embryoner på samme dag som transfereringen foretages. Der er nu en trend indenfor feltet mod at dyrke embryoner i laboratoriet til blastocyststadiet 5-6 dage efter befrugtning, hvilket dog ikke er nyt, idet det første barn, født efter befrugtning i laboratoriet, kom til verden efter blastocyst dyrkning (Steptoe and Edwards, 1978).

Gennem årene er der akkumuleret viden om forhold af betydning for at understøtte udviklingen af embryoner i laboratoriet. Forbedrede dyrkningsforhold i form af dyrkningsmedier og inkubatorer, samt en forbedret overlevelse efter nedfrysning med anvendelsen af vitrifikation, har øget interessen for dyrkning til blastocyststadiet. Det øgede fokus på problemer relateret til tvillingegraviditeter og hos de nyfødte tvillinger har

medvirket til ønsket om kun at transferere ét embryon tilbage for hermed at reducere frekvensen af tvillinger (Pinborg et al., 2005; Luke et al., 2015; Okun et al., 2014). Undersøges børn født som resultat af behandlinger med dyrkning i laboratoriet i hhv. dag 2/3 eller dag 5/6, påviser nogle studier en effekt på graviditetslængde og fødselsvægt, mens andre ikke gør (Ginström Ernstad et al., 2016; Maxwell et al., 2015; Luke et al., 2015; Okun et al., 2014).

Vanskeligt at lave guidelines indenfor et meget dynamiske og ungt fagområde

Under optimale forhold er kliniske guidelines lavet ud fra flere uafhængige meta-analyser baseret på et højt antal randomiserede kontrollerede studier indenfor det samme, gerne meget snævre, område. Sammenlignet med andre medicinske områder er ART en meget ung disciplin karakteriseret af en stor udvikling og variation over tid og mellem laboratorier rundt omkring i verden, blandt andet i forhold til stimulationsprotokoller (f.eks. varighed og hormonpræparat) og laboratoriepraksis (protokoller, dyrkningsmedier, utensilier, inkubatorer, atmosfære sammensætning etc.). Samtidig er populationen af ufrivilligt barnløse meget heterogen f.eks. i relation til alder, diagnose(r) og anden sygdom. Endvidere er tilgængeligheden af æg til forskning meget begrænset og bekostelig, og de etablerede dyremodeller er ikke repræsentative. Alle disse forhold vanskeliggør udformning af guidelines.

I udformning af guidelines er det derfor vigtigt, om muligt, alene at tage udgangspunkt i randomiserede kontrollerede studier (RCT) for at begrænse risikoen for forkerte konklusioner. Gruppen har derfor taget udgangspunkt i det Cochrane review, der blev publiceret i 2016, der alene baseres på RCT studier (Glujovsky et al., 2016).

Forhold omkring inklusion og eksklusion af patienter samt rapportering af data

Trods klassificering som RCT er de inkluderede studier stadig meget forskellige f.eks. mht. kriterier for inklusion og eksklusion, og kun 14 af de 27 studier benyttede de af Cochrane accepterede metoder beskrevet til fordeling af deltagere i de to behandlinger, mens deltagerne i de resterende 13 studier blev fordelt efter ikke accepterede metoder. Grundlæggende er det også umuligt at "blinde" for de deltagende klinikker, hvilken behandlingsgruppe patienterne tilhører, da de får foretaget transferering på forskellige dage efter aspiration. Der er derfor en høj risiko for introduktion af bias og dermed mulighed for forkert tolkning i denne type studier (Glujovsky et al., 2016).

Fertilitetsdata kan rapporteres på mange måder, hvorfor der i regi af Dansk Fertilitetsselskab (DFS) har været tradition for at indrapportere "graviditeter per påbegyndt behandling", for at reducere bias og deraf følgende fejltolkninger (PICO A+B). I de studier, der er udvalgt til at indgå i det omtalte Cochrane review, er alle data desværre ikke beskrevet så det er muligt at beregne "graviditeter per påbegyndt behandling". Dette er en potentiel fejlkilde. Ved sammenligning af graviditeter ved tilbagelægning på dag 2/3 versus dag 5/6 er data i stedet beskrevet som graviditeter per kvinde i behandling (PICO A+B). Inden de statistiske analyser blev udført er data korrigeret for antal cykli benyttet til etablering af en graviditet. Da der ligeledes i de efterfølgende subanalyser ikke var nogen forskel grupperne imellem mht. antal embryoner, patient prognose (god eller dårlig) eller tidspunkt for allokering, mener vi at data er tilstrækkelig valide til at indgå i analysen.

Ved sammenligning af kumulativ rate er data for begge grupper beskrevet per oocyt aspiration (PICO C). Termen klinisk graviditetsrate er benyttet da det faktiske tidspunkt for ultralydsscanning i graviditeten ikke er kendt (mellem uge 8-14).

Vi mener ikke at disse forhold forhindre sammenligning af de to behandlingsstrategier og dermed etablering af en guideline, men at de bør indgå i læserens samlede vurdering af den beskrevne evidens.

Biologiske forskelle mellem cleavage stage embryoner og blastocyster

Sammensmeltning (syngami) af ægget og sædcellens arvemateriale indikerer starten på et nyt individ, og det befrugtede æg (zygoten) gennemgår herefter en række udviklingstrin. De første to celledelinger finder sted indenfor de første to døgn og dannelsen af et 4-celle embryon kan forventes at ske 44 ± 1 timer efter befrugtning (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group, 2011). På dag 3 (68 ± 1 t) efter befrugtningen består et "normalt" udviklet embryon af 7-9 celler/blastomerer, mens embryoner med ≤ 6 eller ≥ 9 celler beskrives som henholdsvis "langsomme" og "hurtige" (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group, 2011). Dag 2 og 3 embryoner betegnes derfor som "cleavage stage" embryoner.

Indenfor det næste døgn sker endnu en til to celledelinger (i alt 16-32 celler), og der etableres meget tætte cellebroer (tight junctions) cellerne imellem, der gør det vanskeligt at identificere hver enkelt celle. Embryonet er nu på morulastadiet (92 ± 2 t), også kaldet et kompakt embryon.

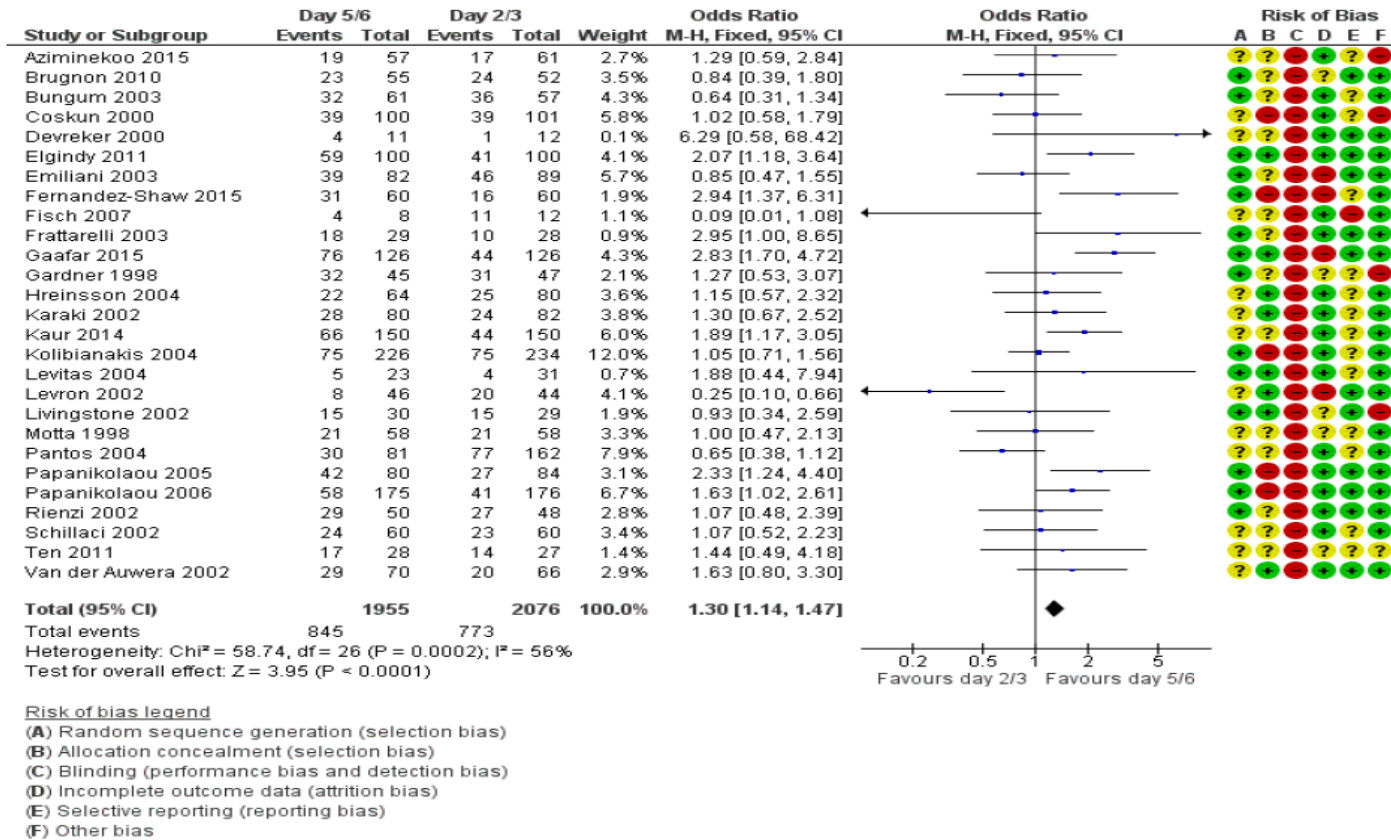
Med etablering af tight junctions mellem cellerne er det nu muligt for det udviklende embryo at starte etableringen af et væskefyldt hulrum, betegnet blastocølen. Blastocølen volumens øges kraftigt og hermed blastocystens diameter, hvorved den omkringliggende zona pellucida bliver tyndere. Herefter "klækker" embryoet og klemmer sig ud igennem zona pellucida. Dannelse af blastocølen sker gennem en aktiv Natrium/Kalium pumpe, der bruger ca. 60% af den ekspanderede blastocysts energi (Houghton et al., 2003). Samtidig med etablering af blastocølen sker der en differentiering af blastocystens 100-200 celler til den indre cellemasse (pluripotente celler), der giver oprindelse til fostret, og trophoblastcellelaget, hvorfra placenta dannes.

Selvom cleavage stage embryoner kan udvikle sig til blastocyster på yderligere blot 2-3 dage, er disse udviklingsstadier biologisk set meget forskellige. Hvor aktivering af det embryonale genom blot lige er begyndt i cleavage stage embryonerne på dag 3, er mange embryonale gener udtrykt i blastocysten, og proteinsyntesen i fuld gang (Wells et al., 2005; Telford et al., 1990). Samtidig er celledifferentieringen i blastocysten i fuld gang, og der er meget højere metaboliske krav for udviklingen af en blastocyst end et cleavage stage embryo (Houghton et al., 2003).

Gennem kontrolleret ovariel stimulation er det muligt at opsamle flere ubefrugtede oocytter end i en ikke stimuleret cyklus, og dermed øge chancen for udvikling af et eller flere levedygtige embryoner til oplægning/nedfrysning efter befrugtning og dyrkning i laboratoriet. Udvælgelse af det/de bedste embryoner, eller deseleksion af det/de dårligste, er derfor en vigtig del af arbejdet i laboratoriet. Hvis et embryo går i stå, defineret som manglende celledeling i 24 timer, kan videre udvikling med høj sikkerhed udelukkes og embryoet kan kasseres (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group, 2011).

Ved dyrkning til blastocyststadiet kombineres de større krav for det enkelte embryo med en længere dyrkningstid, hvilket muliggør en mere sikker deseleksion af embryoner med reduceret potentiale til at etablere en levedygtig graviditet.

PICO A. Klinisk graviditetsrate per kvinde



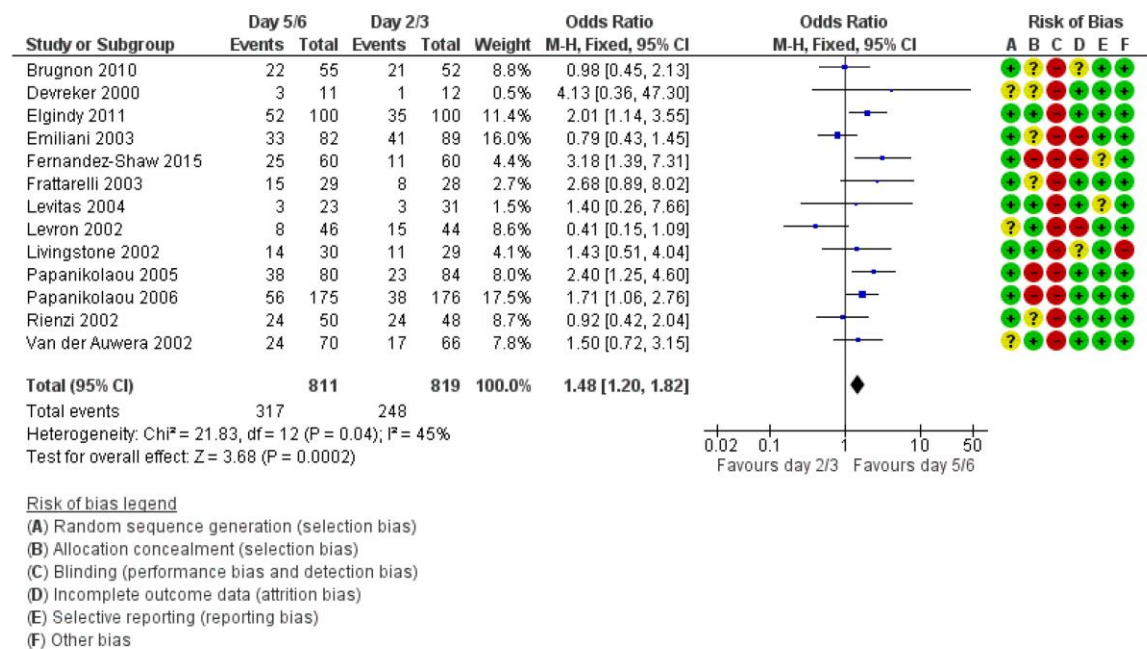
Figur 1. Blastocyst versus cleavage stage transfer. Klinisk graviditetsrate per kvinde (Glujovsky et al., 2016).

Den kliniske graviditetsrate var højere per kvinde efter transferering med friske blastocyster (43,2%) sammenlignet med friske cleavage stage embryoner (37,2%) (OR 1,3; 95% CI 1.14-1.47; 27 RCT studier, 4031 kvinder, I² = 56, moderat (+++) kvalitets evidens) (Figur 1).

Statistiske test for forskelle i undergrupperne viste ingen evidens for forskelle mellem grupperne mht. antal embryoner transfereret, prognose eller randomiseringsdagen. Sensitivitets analyser, der kun inkluderede studier med risiko for lav selektions bias (allocation concealment) viste samme tendens (OR 1,52; 95% CI 1.19-1,94: 8 RCT studier, 1097 kvinder), dog var heterogeniteten høj ($I^2=68\%$).

PICO B. Fødselsrate per kvinde/Baby take home rate (levendefødt, defineret som minimum uge 20)

Fødselsraten (levende) var højere per kvinde efter transferering af friske blastocyster (317/811=39,1%) sammenlignet med cleavage stage embryoner (248/819=30,3%) (odds ratio (OR) 1,48, 95% konfidensinterval (CI) 1,2 - 1,82, 13 RCT studier sammenlignet, 1630 kvinder, heterogenitet (I^2) = 45% og dermed **lav (++) kvalitets evidens**, primært pga. stor risiko for bias (Figur 2).



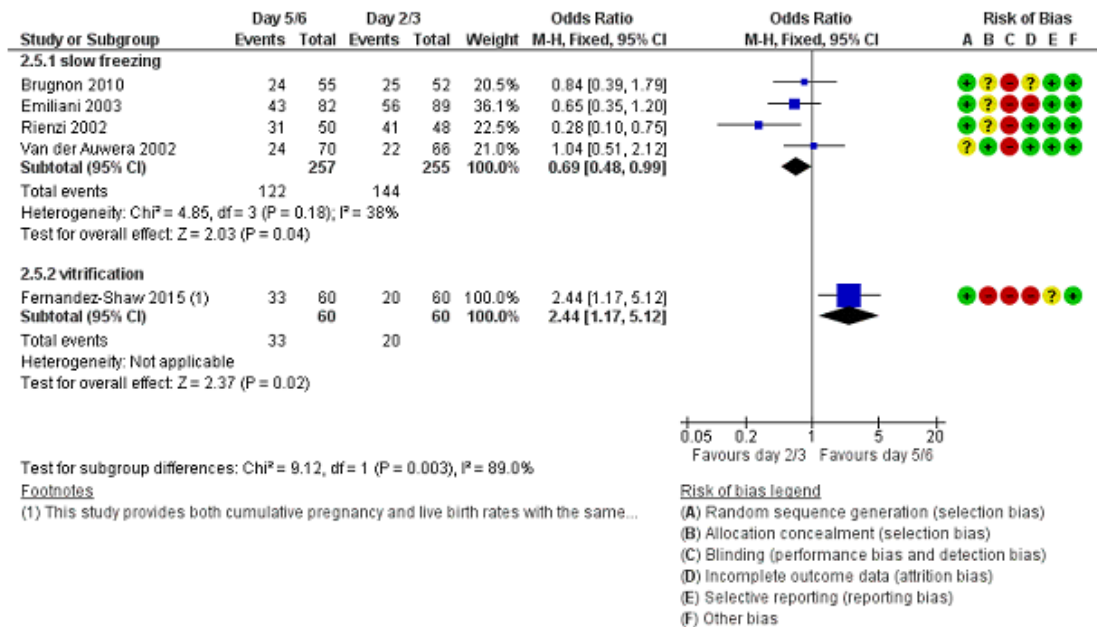
Figur 2 Forest plot sammenligning: Blastocyst versus cleavage stage transfering. Levende fødselsrate (efter 20. gestations uge) per kvinde (Glujovsky et al., 2016).

Statistisk test for forskelle i undergrupperne viste ingen evidens for en forskel mellem cleavage stage transfer og blastocyst transfer på antal embryoner transfereret, prognose eller dagen for randomisering.

PICO C. Kumulativ graviditetsrate (per oocyttaspiration for transfering dag 2/3 vs. dag 5/6)

Der var ingen påviselig forskel i den kumulative graviditetsrate afhængig af dyrkningsvarigheden efter tilbagelægning af friske og frosne/optøede embryoner produceret efter en oocyttaspiration (OR 0.89, 95% CI: 0.64-1.22; 5 RCT studier, 632 kvinder, **meget lav** kvalitets evidens).

Analysen af undergrupper viste ingen forskel afhængig af antal transfererede embryoner eller om patienterne kunne grupperes som god eller dårlig prognose patienter. I de 5 inkluderede studier var der en stor indbyrdes heterogenitet ($I^2=71\%$) og signifikant forskel ift. frysemetode (slow freeze eller vitrifikation). I studiet hvor vitrifikation blev brugt som frysemetode (Fernandez-Shaw et al., 2015), var den kumulative graviditetsrate højere efter blastocystdyrkning end ved transferering på dag 3 (OR 2.44, 95% CI 1,17-5,12). Ved anvendelsen af slow freeze til både cleavage stage og blastocyst kryopreservering var der højere graviditetsrate efter transferering af cleavage stage embryoner end blastocyster (OR 0,69, 95% CI 0,48-0,99) (Brugnon et al., 2010, Emiliani et al., 2003, Rienzi et al., 2002 and Van der Auwera et al., 2002). Det bemærkes at der alene var data fra 5 studier. Se figur 3.



Figur 3. Forest plot sammenligning. Kumulativ graviditetsrate efter blastocyst versus cleavage stage transferering. Kumulativ graviditetsrate opdelt afhængig af nedfrysningsmetode ("vitrifikation" eller "slow freeze") (Glujovsky et al., 2016).

Vitrifikation er i flere studier påvist at være en bedre kryopræserverings metode end slow freeze kryopreservering (Rienzi et al., 2016; AbdelHafez et al., 2010), men der er stadig en mangel på RCT indenfor dette område. Et nyligt publiceret retrospektivt studie, der benyttede vitrifikations til nedfrysning, påviste samme kumulative fødselsrater (52,6% for cleavage stage og 52,5% for blastocyst transferinger, $p=0,989$) (De Vos et al., 2016). Disse data er ikke inkluderet i ovenstående Forest plot analyse. Dog var antallet af transferinger færre per levende fødsel ved blastocyst transfering sammenlignet med cleavage stage transfer ($p<0.001$) (De Vos et al., 2016). Studiet fandt endvidere, at patienter, der ikke blev gravide i forbindelse med den friske cyklus, skulle gennemføre signifikant færre transferinger med frosne/optøede embryoner for at opnå en fødsel, hvis embryonerne var dyrket til blastocyststadiet sammenlignet med cleavage stage embryoner, hvorfor TTP (time to pregnancy) var signifikant kortere i denne gruppe (De Vos et al., 2016).

Frekvens af nedfrysning af embryoner efter dyrkning til dag 5/6 vs. 2/3.

Andelen af cykli hvori der var embryoner til nedfrysning var lavere ved dyrkning til blastocyststadiet end cleavage stadiet (OR 0.48, 95% CI 0.40-0.57; 14 studier, 2292 kvinder, $I^2 = 84\%$, **lav (++) kvalitet af evidens**). Med andre ord hvis 60% af deltagende kvinder havde cleavage stage embryoner til nedfrysning, vil det samme være gældende for mellem 37-46%, hvis der blev dyrket til blastocyst stadiet. Andelen af tilfælde hvor der ikke var embryoner af en tilstrækkelig kvalitet til tilbagelægning, var højere i gruppen med blastocyst transfering sammenlignet med cleavage stage (OR 2.50, 95% CI 1.76-3.55; 17 studier, 2577 kvinder, $I^2 = 36\%$, moderate kvalitet af evidens). I et tænkt scenarie med tilbagelægning af cleavage stage embryoner, og 1% sandsynlighed for at der ikke var noget embryon at lægge tilbage, ville det samme være tilfældet hos 2-4% hvis embryonerne var dyrket til blastocyststadiet.

PICO D. Tid fra behandlingsstart til graviditet (TTP, time to pregnancy)

Der er, forfatterne bekendt, ikke lavet RCT-studier, som undersøger TTP mellem cleavage stage og blastocyst dyrkning og som inkluderer vitrifikation af blastocyster. Et retrospektivt studie har vist en signifikant kortere TTP, hvis embryonerne dyrkes til blastocyster (De Vos et al., 2016).

Nedenfor er vist en samlet oversigt over odds ratios, konfidensintervaller og heterogenitet for de undersøgte effektparametre.

Effektmål	Odds ratio (OR)	95% konfidens-interval	Heterogenitet (I ²)
Levende fødselsrate per kvinde	1,48	1,2-1,82	45%
Kumulativ graviditetsrate per kvinde	0,89	0,64-1,22	71%
Klinisk graviditetsrate per oocytaaspiration	1,30	1,14-1,47	56%
TTP	na	na	na
Multiple graviditeter	1,05	0,83-1,33	30%
Abort risiko	1,15	0,88-1,50	0%
Antal embryoner til kryopræserving	0,48	0,40-0,57	84%
Aflysningsrate pga. ingen embryoner til transferering	2,50	1,75-3,35	36%

Tabel 1. Oversigt over odds ration, 95% konfidensintervaller for de undersøgte effektmål (blastocyst vs. cleavage-stage dyrkning).

Diskussion

I de 13 randomiserede kontrollerede studier (RCT), som rapporterede levende fødselsrater efter transferering med friske embryoner, fandtes en højere graviditetsrate per kvinde til fordel for blastocystdyrkning (lav evidens). Den kliniske graviditetsrate per kvinde var også højere efter transferering med friske blastocyster end med friske cleavage stage embryoner (moderat kvalitets evidens).

Der var ingen påviselig forskel i abortrisiko mellem blastocyst og cleavage stage transferering.

Der var ingen forskel i den kumulative graviditetsrate afhængig af udviklingsstadiet (lav kvalitets evidens, transferering af friske og frosne/optøede embryoner fra én ægudtagning) (Glujovsky et al., 2016). Et nyligt retrospektivt studie, som anvendte vitrifikation, fandt samme kumulative graviditetsrate i de to grupper (De Vos, Hum. Reprod, 2016), så det er pt. et åbent spørgsmål om blastocystdyrkning inkl. anvendelse af vitrifikation vil øge den kumulative fødselsrate.

Det skal endvidere understreges, at selvom de inkluderede 27 RCT studier alle sammenlignede resultater mellem cleavage stage og blastocyst dyrkning, var studierne forskellige f.eks. dag for randomisering, dyrkningsmedier, fryseprotokoller, antal embryoner per transferering samt embryo scorings kriterier.

Frekvensen af manglende transferering pga. dårlig embryo kvalitet var højere ved blastocystdyrkning end ved cleavage stage transfer (moderat kvalitets evidens). Dette skyldes sandsynligvis, at embryonudviklingen i nogle situationer går i stå, med manglende udvikling af transferable blastocyster til følge. Det er et dilemma, som jævnligt opstår i laboratoriet. Et dilemma, der bedst udtrykkes med spørgsmålet: "Er in vitro betingelserne for udvikling til blastocyststadiet lige så gode som *in vivo*?". Med andre ord, er udsagnet: "Hvis ikke dine/jeres embryoner udvikler sig til blastocyster in vitro, ville de heller ikke have etableret en graviditet ved transferering på 2/3 dagen" sandt? Eller lægger vi i nogle tilfælde et unødigt *in vitro* selektionspres på embryonerne ved at dyrke til blastocyststadiet? Det er sandsynligt, at den længere dyrkningstid i laboratoriet ved blastocyst dyrkning, kan påvirke embryo viabiliteten, f.eks. ved suboptimale dyrkningsbetingelser. Det er derfor vigtigt at laboratorierne er opmærksomme på sådanne forhold, hvorfor resultaterne efter blastocystdyrkning (blastocyst udviklingsraten, blastocyst kvaliteten så vel som ongoing implantationsrate) skal følges nøje.

Endvidere er det også et åbent spørgsmål, om patienterne hellere vil have besked om, at embryonerne ikke udviklede sig til blastocyster end have transfereret embryoner tilbage dag 2/3, uden at blive gravide.

Hver enkel klinik(ker) bestemmer antallet af embryoner/blastocyster, der transfereres i en given situation. Tendensen er dog, at jo senere transfereringen udføres (dag 5/6 vs. 2/3), jo færre embryoner transfereres. Dette kan skyldes, at der er færre transferable blastocyster end cleavage stage embryoner til rådighed, men også et ønske om at reducere antallet af flerfoldsgraviditeter (DFS retningslinjer for transferering, 2015). Ønsket om kun at transferere et embryon styrker incitamentet for blastocystdyrkning, idet der, uafhængig af laboratorieforhold, selekteres for det mest levedygtige embryon. Det er vigtigt at have in mente, at der herved indirekte selekteres for de *in vitro* forhold, der er tilstede, hvilket ikke behøver være de samme forhold som *in vivo*.

Konklusion på PICO A, B, C og D

Der er fundet moderat kvalitets evidens for, at transferering af blastocyster vs. cleavage stage embryoner giver højere kliniske graviditetsrate per kvinde (43,2% vs. 37,2%, OR: 1,3; 95% CI: 1.14-1.47; 27 RCT studier, 4031 kvinder, $I^2 = 56$).

Der er lav kvalitetsevidens for, at fødselsraten per kvinde (levende barn, baby take home rate) var højere efter transferering af friske blastocyster (39,1%) sammenlignet med cleavage stage embryoner (30,3%) (OR: 1,45; 95% CI: 1,20-1,82, 13 RCT studier, 1630 kvinder, $I^2 = 45\%$).

Der er ikke påvist forskel i den kumulerede graviditetsrate per ægudtagning ved dyrkning til blastocyst eller cleavage stage (OR 0.89, 95% CI: 0.64-1.22; 5 RCT studier, 632 kvinder, meget lav kvalitets evidens).

Der var ingen evidens for forskelle i multiple graviditeter i friske cykli (OR 1,05; 95% CI 0,83-1,33; 19 RCT studier; 3019 kvinder, $I^2 = 30\%$)

Heller ingen evidens for forskelle mellem grupperne mht. abortrisiko i friske cykli per par/kvinde (OR 1,15; 95% CI 0,88 – 1,50; 18 RCT studier, 2917 kvinder, $I^2 = 0\%$)

Antallet af embryoner til nedfrysning var lavere i blastocystgruppen end ved dyrkning til cleavage stage embryoner (lav kvalitets evidens, OR 0,48; 95% CI 0,40 – 0,57; 14 studier, 2292 kvinder, $I^2=84\%$).

Aflysningsraten af transferering pga. ingen egnede embryoner til transferering var højere ved dyrkning til blastocyster sammenholdt med cleavage stage embryoner (OR 2,50; 95% 1,75-3,35, 17 studier, 2577 kvinder; $I^2=36\%$, moderat kvalitets evidens).

OVERORDNEDE KONKLUSIONER:

Efter dyrkning til blastocyststadiet er der **moderat** (+++) kvalitets evidens for, at den kliniske graviditetsrate per kvinde øges og der er lav (++) kvalitets evidens for, at den levende fødselsrate per kvinde (baby take home rate) øges.

Der er **meget lav (+)** kvalitet evidens for, at den kumulative graviditetsrate øges ved blastocyst dyrkning.

Der er en mangel på godt designede RCT studier, som sammenligner kumulativ levende fødselsrater samt TTP efter henholdsvis cleavage stage og blastocyst dyrkning/transferering. Det må dog forventes at TTP bliver kortere ved dyrkning til blastocyststadiet da den kliniske graviditetsrate og fødselsrate for denne strategi er højere.

Gruppen opfordrer til at et nationalt multi-center studie initieres.

Litteratursøgningsmetode

Følgende søgemaskiner og registre blev brugt til indsamling af litteratur (fra Cochrane review 2016): Cochrane Gynaecology and Fertility Group Specialised Register of controlled trials, Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL; the Cochrane Library; 2016, Issue 4), MEDLINE, PUNMED, EMBASE, PsycINFO, CINAHL og Bio extracts samt "ongoing trials and the reference lists of studies retrieved". Litteratursøgningen blev foretaget per 1. august- 1. november 2016.

Reference Liste

References (Fokuseret spørsmål 1)

Bjercke et al. Comparison Between Two hCG-to-Oocyte Aspiration Intervals on the Outcome of In Vitro Fertilization Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Vol. 17, No. 6, 2000: 319-323

Lynda K. et al. Signaling Modalities During Oogenesis in Mammals. Current Topics in Developmental Biology, Volume 102, 2013 Elsevier Inc. ISSN 0070-2153

Edwards and Steptoe. Control of Human Ovulation, Fertilization and Implantation. Proc.roy.Soc.Med. 1974. Volume67. September.: 932-936

Testart and Frydmann. Minimum time lapse between luteinizing hormone surge or human chorionic gonadotropin administration and follicular rupture. Fertil Steril 1982;37:50–53

Wang et al. The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet (2011) 28:901–910

Reichman et al. Effect of time between human chorionic gonadotropin injection and egg retrieval is age dependent. Fertil Steril 2011;95: 1990–5.

Jamieson et al. In vivo and in vitro maturation of human oocytes: effects on embryo development and polyspermic fertilization. Fertil Steril. 1991 Jul;56(1):93-7.

Weiss et al. Lag time from ovulation trigger to oocyte aspiration and oocyte maturity in assisted reproductive technology cycles: a retrospective study. Fertil Steril 2014;102:419–23

Garor et al. Prolonging oocyte in vitro culture and handling time does not compensate for a shorter interval from human chorionic gonadotropin administration to oocyte pickup. Fertil Steril! 2015;103:72–5

Nargund et al. Human Chorionic Gonadotropin-to-Oocyte Collection Interval in a Superovulation IVF Program. A Prospective Study. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Vol. 18, No. 2, 2001: 87-90

Templeton et al. Oocyte recovery and fertilization rates in women at various times after the administration of hCG. J Reprod Fertil. 1986;76:771–8.

Hussain M, Akande V, Gordon U. (2016) Successful Pregnancy and Live Birth from Oocytes Retrieved After 50 Hours of Human Chorionic Gonadotropin Injection: A Case Report. J Reprod Med. 2016 Mar-Apr;61(3-4):163-6.

Reichman DE, Zakarin L, Chao K, Meyer L, Davis OK1, Rosenwaks Z. (2014) Diminished ovarian reserve is the predominant risk factor for gonadotropin-releasing hormone antagonist failure resulting in breakthrough luteinizing hormone surges in in vitro fertilization cycles. Fertil Steril.102(1):99-102.

References (Fokuseret spørsmål 2)

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Reproductive BioMedicine Online 22, 632-646.

Blake,D.A., Proctor,M., and Johnson,N.P. (2004). The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a Cochrane review. Human Reproduction 19, 795-807.

De Vos,A., Van Landuyt,L., Santos-Ribeiro,S., Camus,M., Van de Velde,H., Tournaye,H., and Verheyen,G. (2016). Cumulative live birth rates after fresh and vitrified cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in the first treatment cycle. Human Reproduction 31, 2442-2449.

Ginström Ernstad,E., Bergh,C., Khatibi,A., Källén,K.B.M., estlander,G.+, ilsson,S., and ennerholm,U.B. (2016). Neonatal and maternal outcome after blastocyst transfer: a population-based registry study. American Journal of Obstetrics and Gynecology 214, 378.

Glujovsky,D., Blake,D., Bardach,A., and Farquhar,C. (2012). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database of Systematic Reviews.

Glujovsky,D., Farquhar,C., Quinteiro Retamar,A.M., Alvarez Sedo,C.R., and Blake,D. (2016). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Houghton,F.D., Humpherson,P.G., Hawkhead,J.A., Hall,C.J., and Leese,H.J. (2003). Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Developmental Biology* 263, 360-366.

Kyrou D, Kolibianakis EM, Fatemi HM, Tarlatzis BC, Tournaye H, Devroey P. (2011). Is earlier administration of human chorionic gonadotropin (hCG) associated with the probability of pregnancy in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists? A prospective randomized trial. *Fertility and Sterility*, 96(5):1112-5

Luke,B., Stern,J.E., Kotelchuck,M., Declercq,E.R., Hornstein,M.D., Gopal,D., Hoang,L., and Diop,H. (2015). Adverse pregnancy outcomes after in-vitro fertilization: effect of number of embryos transferred and plurality at conception. *Fertility and Sterility* 104, 79-86.

Maxwell,S.M., Melzer-Ross,K., McCulloh,D.H., and Grifo,J.A. (2015). A comparison of pregnancy outcomes between day 3 and day 5/6 embryo transfers: does day of embryo transfer really make a difference? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32, 249-254.

Okun,N., Sierra,S., Douglas Wilson,R., Audibert,F., Brock,J.A., Campagnolo,C., Carroll,J., Cartier,L., Chitayat,D., Gagnon,A., Johnson,J.A., Langlois,S., Murphy-Kaulbeck,L., Kim MacDonald,W., Okun,N., Pastuck,M., Tan,L.Y., Poplak,V., and Robson,H. (2014). Pregnancy Outcomes After Assisted Human Reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 36, 64-83.

Pinborg,A., Lidegaard,+., la Cour Freiesleben,N., and Andersen,A.N. (2005). Consequences of vanishing twins in IVF/ICSI pregnancies. *Human Reproduction* 20, 2821-2829.

Steptoe,P.C. and Edwards,R.G. (1978). BIRTH AFTER THE REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO. *The Lancet* 312, 366.

Telford,N.A., Watson,A.J., and Schultz,G.A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 90-100.

Wells,D., Bermudez,M.G., Steuerwald,N., Thornhill,A.R., Walker,D.L., Malter,H., Delhanty,J.D.A., and Cohen,J. (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Human Reproduction* 20, 1339-1348.

Bilag 1 Summary of the findings, meta-analysis

OPU > 36 hours after administration of ovulation trigger (hCG) compared to OPU < 36 hours after administration of hCG

Patients: IVF and ICSI patients (mixed cause of infertility)

Setting: Short interval from hCG trigger to OPU (Short, < 36 hours (33-36 hours))

Comparison: Long interval from hCG trigger to OPU (>36 hours (37-41 hours))

Outcome	Relative effect (95% CL)	No of participants No of studies	Quality of the evidence
MII rate	OR 0.67 [0.62, 0.73] (P < 0.00001)	162 (90, 72*) 2 PRT	++
Fertilisation rate	OR 0.99 [0.94, 1.04] (P = 0.64)	392 (90,72,60,170) 4 PRT	++
Implantations rate	1.00 [0.63, 1.59](P=1.00)	242 (72,170) 2 PRT	++
Ongoing Pregnancy rate	0.79 [0.58, 1.08] (P = 0.13)	845 (72,60,170,533) 4 PRT	++

*2nd cycle in patients having low fertilization rate after 1st cycle.

Bilag 2

Summary of the findings, all studies

OPU from 33-36 hours after administration of ovulation trigger compared to OPU < 36-41 hours after administration of ovulation trigger

Patients: IVF and ICSI patients (mixed cause of infertility)

Setting: Short interval from administration of ovulation trigger to OPU (Short, < 36 hours (33-36hours))

Comparison: Long interval from hCG trigger to OPU (>36 hours (36-41hours))

Design	Author/	Interval (mean)	Nb of cycles	Nb patients	Age	MII rate	Fertilisation rate	Implant rate	Clinical Pregnancy	Nb cryo preserved	Comments
Retro-spective	Garor, 2015	<36h vs >36h	614 ICSI (368 GnRH-agonist)	421	<38	NS	61.8% vs 66.0% (p=0.012)*		35.4% vs 47.2% (P=0.005)*	NA	*If cycles were split in GnRH-agonist and antagonist COS: only significant difference in GnRH-agonist cycles.
Retro-spective	Reichman, 2011	<36.5 (36,1) vs >36.5 (36,7)	3,231 IVF first-cycle	3,231	<38 38-40 >40	NA	NS	NS	NS# Life born NS#	NA	#test for trend stratificeret for age: P=0.09 in favour for late OPU being beneficial with increasing age.
Retro-spective	Weiss, 2014	33,45-34,44 34,45-35,44 35,45-36,44 36,45-38,25	511 ICSI	511		Lower in i 33-34 group) (P=0.0013)		NA	NS	NS	
Pro-	Bokal,	34 vs 38	20	20		NS	IVF:	NA	NA	NA	

spective	2005		IVF	PCO patients		(more empty foll at 34 hrs)	decreased in 34 hrs ICSI: NS				
Pro-spective	Nargund, 2001	33-36 36-38 38-41	533 IVF first-cycle	533		NA	NS	NA	NS	NA	No ovulations prior til OPU (33-41 hrs) were observed
Pro-spective	Mansour	35 36 37	90 ICSI	90 (male)		Lower in 35 group	NS	NA	NA	NA	
Pro-spective	Bjercke, 2000	34 38	170 IVF	170 Tubal		NA (Nb COC NS)	NS	NS	NS	NA	No ovulations prior til OPU (33-38 hrs) were observed
Pro-spective	Raziel, 2006	35,3 38,5	72 ICSI	72 (previos cycles low MII rate)		Lower in 35 group	NS/NA	Lower in 35	Lower in 35	NA	No ovulations prior til OPU were observed
Pro-spective	Jamieson, 1992	34 39	60 IVF	60		?	76.8% vs 84.2% P < 0.05	NA	NA	NA	Sign. more zygotes with polyspermia in the 34 group