



MANUALE PER LA GESTIONE DI UN LABORATORIO DI PMA

COORDINATO DA
Fiorenza Bariani
Rosanna Ciriminna
Laura Rienzi



CIC Edizioni Internazionali



MANUALE PER LA GESTIONE DI UN LABORATORIO DI PMA

COORDINATO DA
Fiorenza Bariani
Rosanna Ciriminna
Laura Rienzi



CIC Edizioni Internazionali

Il contenuto del volume rispecchia esclusivamente l'esperienza degli Autori.

Ogni possibile sforzo è stato compiuto nel soddisfare i diritti di riproduzione.
L'Editore è tuttavia disponibile per considerare eventuali richieste di aventi diritto.

La massima cura possibile è stata prestata per la corretta indicazione dei dosaggi dei farmaci eventualmente citati nel testo, ma i lettori sono ugualmente pregati di consultare gli schemi posologici contenuti nelle schede tecniche approvate dall'Autorità competente.

© Copyright 2017



CIC Edizioni Internazionali

www.gruppocic.com

Lungotevere Michelangelo, 9 - 00192 Roma

ISBN 978-88-9389-003-8

Tutti i diritti riservati. È vietato riprodurre, anche parzialmente, pubblicare o diffondere sotto qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo, questa pubblicazione senza l'autorizzazione dell'editore. È sempre obbligatoria la citazione della fonte.

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 10% di ciascun volume dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633.

Le fotocopie effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da CLEA-Redi, Centro Licenze e Autorizzazioni per le Riproduzioni Editoriali, Corso di Porta Romana 108, 20122 Milano, e-mail autorizzazioni@clearedi.org e sito web www.clearedi.org.

INDICE

AUTORI

5

PREFAZIONE

7

CAPITOLO 1

9

LA GESTIONE PER LA QUALITÀ NELL'OTTICA
DEL MIGLIORAMENTO CONTINUO

CAPITOLO 2

29

REQUISITI AMBIENTALI E CONTROLLI,
DISEGNO DEL LABORATORIO

CAPITOLO 3

49

ACCESSO AL LABORATORIO, FLUSSI DI ENTRATA/USCITA
DI PERSONALE E MATERIALI

CAPITOLO 4

63

PULIZIE E SANIFICAZIONE DEI LOCALI
E DELLE ATTREZZATURE

CAPITOLO 5

81

GESTIONE ATTREZZATURE E STRUMENTAZIONE,
TARATURA E CALIBRAZIONE STRUMENTI

CAPITOLO 6

119

LO STOCCAGGIO IN AZOTO LIQUIDO

CAPITOLO 7

143

IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E TRACCIABILITÀ
NEL LABORATORIO DI FECONDAZIONE IN VITRO

CAPITOLO 8

161

MOVIMENTAZIONE E TRASPORTO
DI GAMETI ED EMBRIONI TRA CENTRI

CAPITOLO 9

183

TRATTAMENTO DELLE COPPIE POSITIVE O
SIERODISCORDANTI ALLO SCREENING VIROLOGICO

CAPITOLO 10

207

STRUMENTI PER IL MIGLIORAMENTO

APPENDICE

233

AUTORI E COORDINATORI

Roberta Barbaro

Centro Ambra Palermo

Fiorenza Bariani

Centro Nazionale Trapianti, Roma

Cristina Bottazzi

Ospedale Evangelico Internazionale
Struttura Semplice Medicina
della Riproduzione, Genova

Nilla Calza

Ginecologia e Fisiopatologia
della Riproduzione Umana Azienda
Ospedaliero-Universitaria
S.Orsola-Malpighi, Bologna

Antonio Carniato

Consulente per il Centro Nazionale
Trapianti, Roma

Sandrine Chamayou

UMR Centro Hera, Catania

Sara Chigioni

Humanitas Research Hospital,
Dipartimento di Ginecologia
e Medicina della Riproduzione
Humanitas Fertility Center, Milano

Patrizia M. Ciotti

Ginecologia e Fisiopatologia
della Riproduzione Umana Azienda
Ospedaliero-Universitaria
S. Orsola-Malpighi, Bologna

Rosanna Ciriminna

Centro Ambra Palermo

Lucia De Santis

Laboratorio Scienze della Natalità,
Istituto Scientifico Universitario
Ospedale San Raffaele, Milano

Silvia De Stefani

Centro di Fecondazione Assistita
Clinica Nuova Ricerca, Rimini (RN)

Elena Gismano

Bart's Health NHS Trust St.
Bartholomew's Hospital - Centre for
Reproductive Medicine, London

Maria Giulia Minasi

Medicina della Riproduzione,
European Hospital, Roma

Leonardo Notarangelo

Ginecologia e Fisiopatologia della
Riproduzione Umana Azienda
Ospedaliero - Universitaria
S. Orsola-Malpighi, Bologna

Simone Palini

Ospedali Riuniti Marche Nord presidio
Ospedaliero di Muraglia, Pesaro

Valerio Pisaturo

Ospedale Evangelico Internazionale
Struttura Semplice Medicina
della Riproduzione, Genova

Laura Rienzi

Centro Genera di Medicina
della Riproduzione, Clinica Valle Giulia,
Roma

Filomena Sacarselli

Medicina della Riproduzione,
European Hospital, Roma

Catello Scarica

Centro GENERA di Medicina
della Riproduzione, Clinica Valle Giulia,
Roma

Annalisa Sebastianelli

Centro Sterilità di Coppia,
la Crioconservazione dei gameti
e l'Andrologia - UOC Ostetricia e
Ginecologia - Osp. S. M.Goretta, Latina

Aldo Volpes

Andros Clinica Day Surgery - Unità di
Medicina della Riproduzione, Palermo

PREFAZIONE

La **SIERR** (Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca), che rappresenta la maggior parte degli embriologi italiani ed il **CNT** (Centro Nazionale Trapianti), organismo di riferimento per l'applicazione nei *tissues establishments* dei Decreti Legislativi 191/2007 e 16/2010, già nel 2012 hanno collaborato alla stesura di un Manuale che affrontasse e approfondisse i requisiti di qualità e sicurezza richiesti dalla normativa, traducendoli nella realtà specifica dei laboratori di PMA.

Il Manuale, come già precisato nella I edizione, vuole essere una guida per i Centri alla corretta interpretazione e applicazione dei requisiti organizzativi, tecnologici, ambientali richiesti per il laboratorio.

Nella redazione del Manuale si è fatto riferimento alle esperienze pregresse anche di altri paesi e di settori affini, come quello dei tessuti e delle ISO, nell'idea di arrivare a definire alcune procedure di buona pratica di gestione del laboratorio, che non hanno la pretesa di essere "la norma" ma solo dei suggerimenti di riferimento per chi quotidianamente si trova ad affrontare le difficoltà nel proprio lavoro.

A distanza di qualche anno, dopo aver testato nella pratica le indicazioni della prima edizione, abbiamo pensato di fare una rilettura e un aggiornamento dei vari capitoli, anche alla luce dell'evoluzione normativa del settore. Questa II edizione del "Manuale per la gestione del laboratorio di PMA" ha richiesto un lungo lavoro di revisione da parte del CNT, di tutti gli Autori e dei coordinatori designati dalla SIERR.

La versione definitiva è stata approvata dal CNT, dal Consiglio Direttivo e dal Comitato Scientifico della SIERR, inoltre è stata anche sottoposta ai Soci SIERR attraverso la pubblicazione sul sito della SIERR per 15 giorni.

La presente edizione si è dotata anche di una nuova veste grafica, con la quale si è cercato di schematizzare quanto più possibile gli argomenti trattati in modo da agevolare al massimo la consultazione.

Buon lavoro a tutti!

La SIERR ringrazia CIC Edizioni Internazionali S.r.l. per il supporto nella fase editoriale e di editing.

CAPITOLO 1

LA GESTIONE PER LA QUALITÀ NELL'OTTICA DEL MIGLIORAMENTO CONTINUO

OBIETTIVI

Ogni Centro di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) deve mettere a punto un **Sistema Documentato di Gestione per la Qualità** che dovrà considerare nella formulazione della documentazione **4 fattori**: risorse umane, strumentali, materiali e procedure. Il successo del Centro sarà raggiunto assicurando un **5° fattore** rappresentato dal miglioramento continuo. L'utilizzo di strumenti di analisi quali indicatori di processo, analisi delle non conformità, delle azioni correttive e preventive, monitoraggio costante degli strumenti, analisi di processo FMEA/FMECA e RCA, audit, riesame del SGQ, permetterà di assicurare al centro un miglioramento continuo (**Flow chart**).

INDICE

- **Sistema di Gestione per la Qualità**
- **Gestione Risorse umane**
- **Gestione Strumenti**
- **Gestione Materiali**
- **Gestione dei Documenti e procedure**
- **Conclusioni**
- **Referenze**
- **Allegati (esempi di modulistica utilizzabile nell'ambito del SGQ)**

SISTEMA GESTIONE QUALITÀ IN PMA

Miglioramento continuo



SISTEMI DI VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ

- indicatori di processo
- analisi di processo
- azioni preventive e correttive
- riesame della direzione
- audit



GESTIONE DELLA DOCUMENTAZIONE E PROCEDURE OPERATIVE STANDARD

- Controllo e distribuzione dei documenti di riferimento
- Controllo delle registrazioni
- Elenco della documentazione



GESTIONE E APPROVVIGIONAMENTO DEI MATERIALI CRITICI

- Scheda prodotto
- Gestione ordini, consegne e magazzino
- Monitoraggio scorte minime



GESTIONE E MONITORAGGIO DELLE APPARECCHIATURE CRITICHE

- Programma di gestione e manutenzione
- Monitoraggio parametri critici
- Pulizia



GESTIONE RISORSE UMANE

- Organigramma con responsabilità
- Mansionario
- Addestramento
- Mantenimento e rivalutazione delle competenze

SISTEMA DI GESTIONE PER LA QUALITÀ

Un “Sistema di Gestione per la Qualità” (SGQ) è la struttura organizzativa che ha la funzione di definire chiaramente le responsabilità, le procedure, le risorse rilevanti nell’organizzazione del Centro e le attività che direttamente o indirettamente possono dimostrare la capacità del Centro di fornire con regolarità un servizio che soddisfi i requisiti dei pazienti e quelli cogenti applicabili (1).



In un laboratorio in cui il SGQ è in atto e applicato efficacemente, le procedure devono rispecchiare le reali modalità di svolgimento delle attività e periodicamente devono essere messe in atto delle azioni di controllo dell’efficacia del SGQ: per questo vengono utilizzati per esempio strumenti di calibrazione per il controllo delle apparecchiature e standard di riferimento per verificare che i risultati dei processi soddisfino i requisiti attesi.

L’assicurazione della qualità è l’insieme delle attività e delle procedure sistematiche svolte all’interno di un SGQ, necessarie per garantire che quel servizio possa soddisfare le caratteristiche di qualità richieste. In altre parole l’assicurazione della qualità si riferisce al modo in cui viene svolto il lavoro. Il **miglioramento della qualità** è quella parte del SGQ che si basa sulla continua crescita dell’efficacia e dell’efficienza del sistema e viene raggiunto quando tutta l’organizzazione cerca e persegue attivamente l’opportunità di miglioramento della qualità.



Per quanto riguarda la strutturazione del SGQ, la documentazione ha un grande rilievo perché identifica la modalità secondo cui la struttura fornirà al personale interessato tutte le informazioni necessarie per la corretta esecuzione delle attività. Questa deve comprendere almeno:

DOCUMENTAZIONE SGQ

MANUALE DELLA QUALITÀ (documento che illustra il SGQ)

Dichiarazione documentata sulla **Politica e obiettivi del Centro** e Campo di applicazione;

PROCEDURE DOCUMENTATE per la gestione e il controllo del SGQ:

- Controllo documentazione e registrazione
- Verifiche ispettive interne (audit)
- Formazione e addestramento del personale
- Gestione delle non conformità e delle azioni correttive e preventive, eventi /reazioni avverse gravi

PROCEDURE E ISTRUZIONI OPERATIVE STANDARD (POS - IOS)

Descrivono le modalità di esecuzione di tutte le attività critiche del processo: attività cliniche, attività di laboratorio, gestione delle strutture e delle apparecchiature, tracciabilità

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- Linee guida, Leggi di settore, Direttive Europee, Delibere e circolari regionali e nazionali
- Manuali di sicurezza
- Manuali degli strumenti

Documenti di registrazione

- Modulistica (es. cartella clinica, schede di laboratorio, scheda e registro di crioconservazione, consenso informato, scheda registrazione manutenzione e monitoraggio strumenti, schede pulizia locali e strumenti, scheda registrazione e immagazzinamento prodotti)

- Registrazione e valutazione delle attività svolte (es. rapporti di audit, di non conformità, di azioni preventive e correttive, riesame della direzione, scheda indicatori di processo laboratorio/centro)
- Registrazione relative all'addestramento, fascicoli competenze e formazione personale (es. piano di sviluppo competenze, scheda di valutazione)

Il **Responsabile qualità (RQ)** è colui a cui spetta di implementare il SGQ, scrivere, coordinare e distribuire il manuale della qualità.



Nel Centro di PMA deve essere nominato un RQ se possibile diverso dal Responsabile del Centro/Laboratorio.

La sua funzione è quella di supervisionare periodicamente e aggiornare ogni procedura in maniera tale da assicurarsi che vengano eseguite tutte le fasi del processo nel rispetto di quanto previsto dalle procedure stesse e dalle normative vigenti. Nella sua qualità di coordinatore del manuale, potrà contare sulla collaborazione ed il supporto di tutti i soggetti coinvolti nel Centro. Tutte le procedure e i regolamenti del Centro una volta prodotti dovranno essere approvati dal Responsabile del Centro.



Il Responsabile del Centro (RC) deve assicurare che l'attività complessiva del Centro sia conforme ai requisiti di legge. Il RC deve assicurare la corretta implementazione del SGQ con l'obiettivo di assicurare che i requisiti del paziente siano identificati e soddisfatti.

In un'ottica di miglioramento continuo, il modo più efficace per raggiungere l'obiettivo prefissato è attraverso la gestione di tutte le attività e le risorse del Centro come un processo organico.



Questo significa che ogni singolo passo deve essere coperto da una procedura operativa standard (POS).

Tutte le procedure composte in un quadro unitario possono evidenziare dei punti critici nelle diverse fasi del processo che si focalizzano, per quanto riguarda il campo di applicazione dei D.Lgs. 191/07 e 16/2010, nell'accettazione del campione, raccolta/prelievo dei gameti, manipolazione, crioconservazione, stoccaggio fino alla distribuzione delle cellule.

Una delle attività più rilevanti del SGQ è la **verifica e il monitoraggio periodico** del sistema stesso attraverso l'uso di strumenti quali le **ispezioni e gli audit**. L'**audit** è una verifica dell'organizzazione del Centro/laboratorio PMA e dei suoi documenti per controllare se il lavoro svolto è conforme ai requisiti del SGQ stabiliti dal Centro e se il SGQ è efficacemente mantenuto, in conformità alle prescrizioni della legge (D.Lgs. 191).



Nell'audit deve essere sempre pianificato e specificato il team di audit, le persone auditate, il luogo e la data dove si terrà l'audit.

Deve esistere una procedura dell'audit che stabilisca come si svolge, il suo campo di applicazione, le responsabilità e le modalità operative.

L'attività di audit è fondamentale perché permette, attraverso la revisione critica del sistema, la sua costante valutazione e il miglioramento dei processi e dell'attività. Gli audit possono essere di sistema (se coinvolgono tutte le attività e i processi) o specifici. Gli audit si distinguono in interni ed esterni. Generalmente viene verificato:

- quali sono le condizioni ambientali nel laboratorio;
- se il personale lavora in modo appropriato;
- cosa succede in laboratorio in termini di flussi di entrata/uscita di persone e di materiale;
- se i prodotti utilizzati in laboratorio sono appropriati e adatti per l'uso;
- come vengono eseguite le attività;
- come sono registrate le informazioni;
- come sono analizzati i dati.

L'audit interno è svolto in modo autonomo da una persona interna dell'organizzazione che ha ricevuto una adeguata formazione nell'esecuzione degli audit.

L'audit esterno è svolto da un auditor qualificato professionalmente che è completamente indipendente dall'organizzazione presso cui viene eseguito l'audit.

In questa categoria possono rientrare anche i controlli e le **ispezioni** effettuate periodicamente dalle autorità competenti (CNT) per verificare la conformità alle leggi e norme (art. 7 D.Lgs. 191/07).



Le verifiche devono essere eseguite almeno ogni due anni. In seguito all'audit, deve essere prodotto un verbale, che viene letto e approvato da tutti i partecipanti e successivamente firmato dal RC (Allegato 1).



Si consiglia di conservare la copia del verbale dell'audit in un registro "archivio verbali" archiviato dal RQ.

Le ispezioni e gli audit sono degli strumenti in grado di controllare e monitorare cosa sta succedendo evidenziando eventuali **non conformità** dovute ad un mancato adempimento specificato dalla norma o dalle procedure (es. paziente che inoltra un reclamo, un problema che insorge in relazione al prelievo di sostanze o di gameti, errore correggibile nell'identificazione di un paziente, malfunzionamento di un apparecchio, modulistica che non viene compilata correttamente, ecc.).



Le non conformità possono essere rilevate da qualsiasi componente dello staff del centro che deve documentare la non conformità compilando un apposito modulo, con indicazione del relativo trattamento (Allegato 2).

Qualsiasi non conformità si verifichi deve essere segnalata al RC e al RQ, a cui spetta la valutazione se intraprendere un'azione correttiva al fine di risolvere il problema in modo radicale o preventiva per evitare che si ripeta.

La richiesta di una azione correttiva e/o preventiva può essere suggerita anche dal personale durante lo svolgimento di una attività oppure in fase di audit, durante un riesame del SGQ o essere evidenziata durante un'analisi degli indicatori di qualità. L'azione correttiva si reputa necessaria anche nel caso di mancato raggiungimento di un obiettivo definito del Centro.



La richiesta e i risultati degli interventi preventivi e/o correttivi devono essere documentati e valutati dopo l'attuazione (Allegato 3).

I Centri inoltre devono inoltre notificare tempestivamente al CNT e alla propria Regione le reazioni o eventi avversi gravi, così come previsto e secondo la definizione dei D. Lgs. 191/2007 e 16/2010.

Nelle diverse fasi del processo esiste il rischio potenziale che si verifichino degli eventi dannosi per la salute, che coinvolgono cellule, gameti o embrioni, con danni immediati al paziente e/o all'operatore.



Gli eventi dovranno essere raccolti, analizzati e classificati come non conformità o eventi o reazioni avverse gravi.

A titolo di esempio, non esaustivo, si riportano alcuni eventi avversi gravi possibili nel processo di PMA, da notificare alle autorità competenti:

- **scambio di gameti o embrioni** per scambio di provette o errata identificazione (bambino generato con gameti di persone diverse dalla coppia);
- **errato congelamento o scongelamento** per errore umano o guasto attrezzature (perdita delle cellule);
- **rottura di paillettes con perdita del materiale;**
- **perdita di etichette o mancata registrazione** durante la crioconservazione (perdita di gameti o embrioni);
- **malfunzionamento impianto azoto** (perdita di gameti/embrioni)
- **scongelamento paillettes liquido seminale, ovociti, embrioni durante trasporto al Centro** (perdita di gameti/embrioni).

Per ridurre la possibilità che si verifichino questi eventi dannosi è importante mettere a punto delle strategie e delle tecniche che permettono di stimare e misurare il rischio per poi gestirlo adeguatamente e cercare di ridurlo (2). Per indagini più approfondite delle criticità di un processo si possono utilizzare delle tecniche di analisi quali, per esempio, la **Failure Mode and Effects Analysis (FMEA per un'analisi proattiva)** e la **Root Cause Analysis (RCA per un'analisi retrospettiva)**, che permettono di identificare e gestire i rischi così da migliorare il processo.



Il RC supportato dal RQ e dei referenti dei diversi settori, deve procedere al Riesame periodico per valutare l'efficacia del SGQ e garantire la piena conformità a tutte le normative di riferimento.

È importante identificare in questa riunione le aree e i processi che possono essere migliorati e modificati. Nel riesame si dovranno considerare tutte le informazioni e i documenti che rappresentano indicatori utili per definire le azioni volte al miglioramento del SGQ. I risultati del riesame sono poi comunicati a tutto il personale del Centro. Possono essere valutati i seguenti documenti, divisi per area di attività:

prodotto/processo

- Analisi dei dati e delle tendenze degli indicatori di performance clinici e di laboratorio
- Controlli di qualità interni
- Interventi di manutenzione straordinaria su apparecchiature per dimostrare la loro vetustà o inadeguatezza
- Carichi di lavoro e loro variazioni

qualità

- Esito degli audit e delle verifiche ispettive istituzionali
- Analisi delle non conformità ed eventuali reazioni/eventi avversi gravi

- I risultati delle azioni preventive e correttive adottate
- Feedback da parte dei pazienti (reclami e soddisfazione dei pazienti)

miglioramento

- Analisi degli obiettivi pianificati
- Bisogni formativi e necessità da parte della struttura di competenze specifiche
- Relazioni sulle attività svolte e sui progetti futuri da parte del RC.



Si consiglia di eseguire il Riesame almeno una volta l'anno e archiviare il verbale (Allegato 4).

GESTIONE RISORSE UMANE



Nel SGQ del Centro deve essere stilato un organigramma che definisca con precisione i ruoli e le responsabilità di ogni operatore, nonché le relative relazioni funzionali (Tab.1). Il personale deve essere in numero sufficiente alle esigenze del Centro e qualificato per la mansione da svolgere.

Ogni operatore deve avere una scheda personale aggiornata che descriva le mansioni che è autorizzato a svolgere e la sua formazione iniziale e periodica (qualifica, responsabilità, curriculum formativo, piano formativo, aggiornamento quale partecipazione a conferenze, seminari, corsi di studio ufficiali). Tutti i membri dell'equipe devono essere istruiti sui loro specifici compiti e le loro responsabilità e periodicamente aggiornarsi sui cambiamenti delle procedure e delle normative di riferimento.

Tabella1. Esempio di descrizione delle figure del Laboratorio di Embriologia (3).

QUALIFICA

**Responsabile
di Laboratorio**

Embriologo

Tecnico di Laboratorio

RESPONSABILITÀ

- Assicura che il laboratorio è in linea con gli standard richiesti in termini di sicurezza, spazio e pulizia
- Assicura che le POS sono aggiornate e accurate, secondo le *best practices Internazionali*
- Sviluppa e revisiona gli indicatori di performance
- Assicura che lo staff partecipi all'interno del proprio dipartimento al riesame di casi clinici
- Autorizza l'introduzione di nuove tecniche in accordo con il RC
- Validazione dei processi
- Supervisione e formazione del personale di laboratorio
- Partecipa nella programmazione dei cicli
- Assicura la manutenzione degli strumenti
- Ha inoltre tutte le responsabilità di un embriologo
- Trattamento di gameti ed embrioni e crioconservazione
- Garantire il corretto funzionamento delle attrezzature
- Collabora alla definizione degli Indicatori clinici di performance
- Supporto nelle procedure di Laboratorio
- Operazioni di controllo di qualità ambientale e degli strumenti, gestione del magazzino



Deve essere messo in atto un programma di addestramento periodico (piano sviluppo competenze) che valuti le competenze di ciascuno all'inizio e a intervalli periodici e i cui risultati devono essere registrati.

È importante quindi definire per ciascuna figura professionale i **criteri specifici di valutazione della formazione** per verificarne l'efficacia ma anche il mantenimento nel tempo delle competenze (**Allegato 5**).



Per quanto riguarda le Risorse umane il SGQ deve considerare la seguente documentazione:

RISORSE UMANE

- Organigramma /funzionigramma
- Schede personale (qualifica e responsabilità)
- Piano di sviluppo competenze (POS)
- Criteri di valutazione dell'efficacia della formazione (POS)
- Schede di valutazione individuale formazione
- Istruzioni operative e Manuali di informazione sulla sicurezza (D.L. 81/08)

GESTIONE STRUMENTI



Per quanto riguarda la strumentazione, il SGQ deve assicurarsi che sia presente almeno la seguente documentazione:

GESTIONE STRUMENTI

- Programma di gestione/manutenzione delle attrezzature (POS)
- Scheda registrazione manutenzione per ogni attrezzatura (rapporti taratura, controlli microbiologici/particellari)
- Scheda monitoraggio dei parametri critici delle apparecchiature (T, CO₂, O₂)
- Pulizia periodica degli strumenti, disinfezione (POS)
- Schede registrazione pulizia periodica degli strumenti
- Norme di funzionamento per ogni attrezzatura critica
- Certificati di conformità di ogni attrezzatura critica

GESTIONE MATERIALI



Un SGQ adeguato deve prevedere per la gestione dei materiali la seguente documentazione:

GESTIONE MATERIALI

- Gestione ordini (POS)
- Scheda registrazione prodotti
- Gestione consegna e verifica materiale
- Gestione immagazzinamento (conservazione materiale)
- Monitoraggio costante delle scorte

GESTIONE DEI DOCUMENTI E PROCEDURE

Tutti i documenti del Centro vengono utilizzati per controllare le attività svolte nel Centro definendo il metodo per la corretta esecuzione dei compiti e mansioni.



Prima di essere emessi, devono essere verificati e autorizzati per la loro emissione.

Tutti i documenti (documenti di riferimento e POS delle attività del Centro) devono contenere una chiara indicazione di chi esegue quella particolare attività e come, dove, quando e perché viene svolta.

È importante riportare l'esecuzione di ogni fase della procedura, in maniera tale che ogni passaggio possa essere chiaramente descritto e sia identificata la persona che svolge il lavoro e quali sono i dati relativi ai prodotti e materiali che vengono a contatto con il materiale umano da utilizzare. L'utilizzo dei diagrammi di flusso consente di identificare correttamente la sequenza delle varie attività, nonché le interazioni fra i diversi processi.

È importante garantire la standardizzazione delle procedure e la rintracciabilità in tutte le sue fasi dal prelievo alla distribuzione.



Si consiglia di redigere la documentazione sulla base di un modello predefinito per le varie tipologie di documento (Allegato 6).

Questo è un esempio di identificazione di ogni documento, in cui viene riportato il logo del Centro unitamente all'indicazione del tipo di documento (es: Manuale Qualità, Procedure di Sistema, Istruzioni Operative, ecc.), il titolo, la numerazione di controllo, la data di emissione e di revisione e i numeri di pagina.

NOME CENTRO PMA E LOGO	TIPO DI DOCUMENTO	Approvato da: 	Cod. P...
Emissione: Revisione:	TITOLO		Pag...



La documentazione relativa al SGQ deve essere disponibile a tutto il personale del Centro su supporto cartaceo o in formato elettronico (in questo caso deve essere prevista una procedura di back up periodica che permetta di evitare la perdita dei dati) e, dietro richiesta, per tutti coloro che sono autorizzati ad ispezionare il Centro.



Deve essere prevista una procedura di controllo dei documenti di riferimento (MQ, Procedure Documentate, POS, modulistica Centro) per garantire che venga utilizzata solo l'ultima versione in corso. I documenti obsoleti non devono circolare, ma una copia deve essere conservata dal RQ nell'archivio "storico" (cartaceo e/o in formato elettronico).



Si consiglia, una volta aggiornato un documento, di eliminare i documenti obsoleti e di identificare la nuova versione con numero e data di revisione.



In caso di modifiche dei documenti queste devono essere verificate, datate e riapprovate.



È consigliabile rivedere la documentazione del SGQ almeno ogni tre anni.

Una procedura di controllo meno rigida può essere prevista per le **specifiche** (documenti esterni quali manuali, regolamenti e normative) che possono essere aggiornati da qualsiasi operatore del Centro e distribuiti senza l'autorizzazione del RC a tutto lo staff per via e-mail o in formato cartaceo.



Si consiglia, per facilitare la reperibilità dei documenti, di redigere un elenco di tutta la documentazione, con indicato la modalità di archiviazione (Allegato 7).

Le diverse **registrazioni del SGQ** (rapporti, schede, valutazione delle attività svolte, addestramento e competenze del personale) possono essere disponibili sia in formato cartaceo che elettronico.



L'accesso alle registrazioni (es. di cellule, pazienti, indicatori di monitoraggio, schede di registrazione e immagazzinamento dei prodotti) deve essere limitato ai soggetti autorizzati.



Tutte le registrazioni critiche per la sicurezza e la qualità dei prodotti devono essere conservate per almeno 10 anni dopo l'uso clinico o lo smaltimento, mentre i dati necessari per la tracciabilità e quelli clinici vanno conservati per almeno 30 anni.

CONCLUSIONI

Per la riuscita di un buon SGQ una volta definita tutta la documentazione riguardante la gestione del personale, delle attrezzature, dei materiali e delle procedure operative, l'utilizzo di strumenti di analisi della qualità assicurerà al centro di PMA un miglioramento continuo.

Ad oggi non è stata ancora emanata una disposizione univoca in materia di standardizzazione dei sistemi qualità dei laboratori di PMA. Per la scelta del modello del SGQ gli operatori del settore si affidano a linee guida proposte da commissioni di esperti (4, 5) o da documenti ufficiali di società scientifiche o a norme ISO (6-8). L'obbligatorietà di un SGQ è stata introdotta con la Direttiva Europea del 2004/23/EC, ma non è richiesta l'adozione di un particolare modello di SGQ, né la certificazione da parte di un ente terzo.

REFERENZE

1. David Mortimer, Sharon T. Mortimer. *Quality and Risk Management in the IVF Laboratory*. Cambridge University Press, 2008.
2. Australia and New Zealand Standard "Risk Management" AS/NZS4360:1999 revisionato nel 2004, (Standard Australia 1999 e 2004).
3. The Alpha Consensus Meeting on the professional status of the clinical embryologist: proceedings of an expert meeting. *Reprod Bio Med Online* 2015;30:451-461.
4. Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L, for Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*. 2008;23:1253-1262.
5. Gianaroli L, et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*. 2000;15:2241-2246.
6. ESHRE position paper on the EU tissues and Cells Directive EC/2004/23; November 2007.
7. "La medicina della Riproduzione. Ed. Borini and Ubaldi. CIC Edizioni Internazionali, Roma 2010.
8. ISO. *International Standard ISO 9001:2015*. Geneva, 2000.

CAPITOLO 2

REQUISITI AMBIENTALI E CONTROLLI, DISEGNO DEL LABORATORIO

PRINCIPI GENERALI

Sono di seguito descritti i requisiti ambientali che un laboratorio di PMA deve possedere e le relative modalità con cui effettuare i controlli, con riferimento ai decreti legislativi 6 novembre 2007 n. 191 e 25 gennaio 2010 n. 16. Sono inoltre descritte le caratteristiche progettuali di un laboratorio di PMA, tenendo in considerazione i requisiti di sicurezza previsti dalle norme di riferimento generali. Il capitolo non tiene conto di eventuali ulteriori requisiti strutturali e ambientali previsti da normative regionali specifiche.

INDICE

- **Introduzione**
- **Conta delle particelle aerotrasportate**
 - Strumenti per la conta delle particelle aerotrasportate
 - Numero di rilevazioni
 - Volume d'aria da campionare
 - Posizionamento dello strumento per la conta delle particelle aerotrasportate
 - Frequenza dei controlli
- **Conta delle contaminazioni microbiologiche**
 - Metodi di campionamento
 - Terreni di coltura utilizzati
 - Numero di rilevazioni
 - Siti del laboratorio dove effettuare la conta microbiologica
 - Frequenza dei controlli
- **Strutturazione di un laboratorio di PMA**
- **Referenze**

REQUISITI AMBIENTALI E CONTROLLI, DISEGNO DEL LABORATORIO

Normative di riferimento relative ai requisiti ambientali nei laboratori dei centri di PMA

D.Lgs. 191/2007
D.Lgs. 16/2010

Metodiche e tempistiche da utilizzare per il monitoraggio dei requisiti ambientali

Descrizione delle modalità di esecuzione dei controlli (conta delle particelle aerotrasportate e conta delle contaminazioni microbiologiche) e relative tempistiche

Strutturazione di un laboratorio di PMA

Caratteristiche strutturali che in fase di progettazione un laboratorio deve prevedere per facilitare il rispetto dei limiti imposti per legge

INTRODUZIONE

Il laboratorio di PMA è realizzato secondo una tecnica per cui l'atmosfera del locale è tenuta in costante sovrappressione, controllata con gradiente crescente verso le zone a maggior pulizia, allo scopo di evitare l'immissione di flussi inversi potenzialmente inquinanti. La filtrazione e la distribuzione dell'aria, i materiali costruttivi, le procedure di comportamento del personale, di pulizia e di manutenzione sono tali da consentire il controllo di particelle solide (vitali e non vitali) presenti nell'atmosfera, in modo tale che questa concentrazione corrisponda ai livelli definiti. Il rispetto dei requisiti progettuali del laboratorio di PMA qualificato e controllato assicura qualità e sicurezza delle cellule trattate.

La zona di accesso al laboratorio PMA deve essere classificata grado D, come il laboratorio e quindi monitorata con gli stessi controlli ambientali dei parametri fisici e microbiologici.

La sala di criobiologia non è ambiente classificato GMP, a meno che non si apra direttamente nel laboratorio PMA: in tal caso deve mantenere il grado di pulizia D e quindi deve essere controllata nei parametri fisici e con i test microbiologici.

I requisiti minimi che un laboratorio per la lavorazione di cellule riproduttive deve possedere sono descritti nel decreto legislativo 25 gennaio 2010 n. 16 che fa riferimento al *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008)*.

La classificazione della qualità dell'aria deve essere effettuata all'installazione; il monitoraggio e la riqualifica devono essere effettuate con frequenza definita utilizzando:

- la conta delle particelle aerotrasportate
- la conta delle contaminazioni microbiologiche.

CONTA DELLE PARTICELLE AEROTRASPORTATE



Nell'ambiente in cui vengono eseguite le lavorazioni è richiesta una qualità dell'aria con un numero di particelle equivalente a quelli di grado A di cui all'allegato 1 della guida europea alle buone pratiche di fabbricazione (GMP), con un ambiente di fondo almeno equivalente a GMP di grado D.

Per assicurare il grado D in laboratorio, la stessa classe deve essere mantenuta anche nell'ambiente di accesso al laboratorio stesso.

Vengono di seguito riportati i limiti descritti nelle GMP Annex 1 (update 2008).

Limiti di concentrazione massima (particelle/m³ d'aria) per particelle di dimensioni maggiori o uguali alle dimensioni descritte in tabella

	<i>At rest</i>		<i>In operation</i>	
Grado	0.5 µm	5.0 µm	0.5 µm	5.0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Non definito	Non definito

Lo stato *at rest* del laboratorio vuol dire che gli strumenti sono installati e operativi, ma non è presente, all'interno del laboratorio, il personale. La valutazione della conta particellare *at rest* deve essere effettuata dopo un periodo di 15-20 minuti dalla fine delle attività.

La condizione *in operation* prevede, oltre le condizioni degli strumenti nello stato *at rest* (in funzione) che il personale sia presente e operante all'interno del laboratorio. Se le operazioni di controllo dell'aria possono essere dannose per le cellule in lavorazione, tale controllo può essere effettuato in corso di una simulazione, dove però devono essere rispettate le condizioni abituali di lavoro.

Per i laboratori di PMA deve essere effettuato un controllo particellare dell'aria *in operation* solo all'interno delle cappe a flusso laminare (grado A). Non essendo definito il limite di particelle per il grado D (vedi tabella) tale tipo di controllo non è richiesto per il locale circostante. Poiché talvolta i certificati rilasciati dalle ditte che effettuano i controlli della qualità dell'aria riportano valori riferiti alla norma ISO, riportiamo di seguito la classificazione ISO 14644-1.

Classe	0.1 µm	0.2 µm	0.3 µm	0.5 µm	1 µm	5.0 µm
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1.000	237	102	35	8	-
ISO 4	10.000	2.370	1020	352	83	-
ISO 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO 7	-	-	-	352.000	83.200	2.930
ISO 8	-	-	-	3.520.000	832.000	29.300
ISO 9	-	-	-	35.200.000	8.320.000	293.000

Comparando le due tabelle si può notare che il grado A della classificazione GMP equivale circa alla classe ISO 5, mentre il grado D della classificazione GMP equivale circa, nello stato *at rest*, alla classe ISO 8.



Si consiglia di esprimere i risultati dei controlli secondo le indicazioni dell'Annex 1 delle GMP, a cui si riferisce la normativa.

STRUMENTI PER LA CONTA DELLE PARTICELLE AEROTRASPORTATE

Lo strumento utilizzato per la conta particellare (Fig. 1) deve essere corredato da un certificato di taratura rilasciato anche dal costruttore. La taratura del costruttore deve essere eseguita ad intervalli regolari; copia del certificato di taratura deve essere rilasciata insieme ai risultati della stampata dei dati macchina.



Figura 1
Esempio di contaparticelle.

NUMERO DI RILEVAZIONI

Il numero minimo di punti di campionamento è ricavato dalla tabella in funzione della superficie della camera bianca espressa in metri quadrati. Se il valore della superficie cade tra due valori consecutivi della tabella, si deve selezionare il maggiore dei due (ISO 14644-1:2015 punto A.4.1).

Tabella dei punti di campionamento in funzione della superficie della camera bianca

Area della clean room m ² ≤	N. minimo di punti di campionamento N _L
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10

"Dove sono necessarie informazioni sulla stabilità della concentrazione delle macroparticelle, di dimensione $\geq 5 \mu\text{m}$, fare tre o più misurazioni in punti selezionati in intervalli di tempo concordati tra cliente e fornitore. (ISO 14644-1:2015 punto C.5)"

VOLUME DI ARIA DA CAMPIONARE

Per il grado A, la rilevazione per ogni singolo campione deve essere effettuata su almeno un m^3 di aria, mentre per il grado D il volume dei campioni prelevati in corrispondenza di ciascun punto deve essere pari ad almeno 2 litri, con un tempo di campionamento minimo di 1 min per ogni punto (ISO14644:2015 parte 1, punto A 4.4).

POSIZIONAMENTO DELLO STRUMENTO PER LA CONTA DELLE PARTICELLE AEROTRASPORTATE

Premesso che i parametri di numero di particelle (e anche di colonie microbiche, vedi di seguito) previsti per il grado A dalle GMP possono essere rispettati solo utilizzando una cappa a flusso laminare, a tale scopo rilevazioni della conta particellare vanno effettuate all'interno della stessa.

"La camera bianca o zona pulita è suddivisa in una griglia di sezioni di uguale superficie, il cui numero è pari al numero di punti di campionamento derivato dalla tabella. Dentro ogni sezione verrà selezionato un punto di campionamento "rappresentativo" delle caratteristiche della sezione (ISO 14644-1:2015 punto A.4.2)".

La cappa ha raggiunto la classificazione specificata per la pulizia dell'aria se il valore medio delle concentrazioni delle particelle considerate misurate in corrispondenza del punto

di campionamento non supera i limiti di concentrazione stabiliti.

Per quanto riguarda invece i punti di campionamento nell'ambiente di fondo (grado D), il responsabile del laboratorio identifica le zone critiche in cui tali rilevazioni devono essere effettuate (in vicinanza degli incubatori, delle cappe stesse, del micromanipolatore, zone di passaggio, aree potenzialmente più sporche, bocchette di immissione ed estrazione dell'aria, ecc.).

FREQUENZA DEI CONTROLLI

La frequenza dei controlli è in relazione al tipo di attività svolta (lavorazione in serie o senza soluzione di continuità).

Nel caso di lavorazione in serie e se il laboratorio chiude l'impianto di trattamento aria tra una serie e la successiva, i controlli devono essere effettuati in tempo utile per analizzare i risultati e verificare quindi la conformità della struttura prima dell'inizio della serie.

Se la verifica di grado non risultasse idonea, verrà eseguita una manutenzione straordinaria degli ambienti fino al ripristino delle condizioni richieste, che devono essere documentate.

Se invece il centro di PMA lavora senza soluzione di continuità, la verifica del rispetto dell'ambiente di fondo (grado D) ha una frequenza minima annuale.

La conta particellare all'interno delle cappe a flusso laminare (grado A) deve essere eseguita con cadenza minima semestrale. In caso di eventi particolari (contaminazioni, installazione di nuove apparecchiature...) sarà cura del responsabile del laboratorio attivare i controlli senza attendere le scadenze previste.

Limiti suggeriti per il monitoraggio della contaminazione in condizione operative

Grado	Microrganismi aerei ufc/m ³	Microrganismi per deposizione (diametro 90 mm) ufc/4 ore	Piastre per contatto (diametro 55 mm) ufc/piastra	Impronta delle 5 dita del guanto ufc/guanto
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

METODI DI CAMPIONAMENTO

- Valutazione *Air sample* (Microrganismi aerei).
 Si effettua tramite campionamenti "attivi" dell'aria e a tale scopo sono utilizzati particolari aspiratori che permettono all'aria di depositare le eventuali particelle vitali sulle piastre di coltura montate sull'apparecchio (es. campionatore SAS). Volume minimo di aria prelevato: grado A = 1000 litri, grado D = 200 litri, in un tempo inferiore a 15'.
 Parametro: ufc/m³.
- Valutazione *Settle plates* (Microrganismi per deposizione)
 Si effettua tramite campionamenti "passivi" dell'aria utilizzando piastre di coltura del diametro di 90 mm esposte per tutta la durata della lavorazione, se questa è inferiore alle 4 ore. Se la lavorazione richiede tempi più lunghi il controllo deve essere di almeno 4 ore; tuttavia, le piastre esposte sotto cappa per un periodo così lungo potrebbero disidratarsi, per cui si consiglia di esporre eventualmente in sequenza due piastre, ciascuna per 2 ore.
 Parametro: ufc/4 ore.
- Valutazione *Contact plates* (Piastre per contatto)
 Si effettua per il campionamento delle superfici e a tale

scopo sono utilizzate piastre di coltura del diametro di 55 mm che vengono messe a contatto diretto con i siti di campionamento facendo aderire il terreno della piastra alla superficie per alcuni secondi senza compiere alcun movimento lineare o circolare.

Parametro: ufc/piastra.

Per siti di campionamento particolari, poco compatibili con la rilevazione mediante piastre "a contatto", è possibile utilizzare tamponi sterili. La superficie di contatto accessibile deve essere $\sim 25 \text{ cm}^2$, Il tampone imbevuto di soluzione sterile viene strisciato sull'area di campionamento. Il risultato così ottenuto è espresso in cfu/piastra, con limite di accettabilità definito in GMP per le piastre a contatto.

- Valutazione Impronta delle dita del guanto (Piastre per contatto)

Il test è utilizzato per verificare la pulizia dell'ambiente di lavorazione e può essere anche utilizzato come qualifica del personale.

L'impronta delle 5 dita del guanto su piastra a contatto deve essere applicata per ca. 5-10 secondi, facendo attenzione a non danneggiare la superficie di agar.

TERRENI DI COLTURA UTILIZZATI

Sono utilizzati terreni di coltura semplici e/o arricchiti e/o selettivi per la conta microbiologica totale e per ricerche microbiche specifiche (es.: lieviti e muffe).

Le piastre devono essere incubate nel tempo più breve possibile al fine di garantire che i microrganismi rimangano vitali fino al momento in cui la piastra è trasferita in un ambiente di rilevamento della crescita.

Le piastre possono essere conservate e trasportate in un am-

biente a temperatura controllata 2-10°C per un tempo non superiore a 24 ore.

I terreni di coltura delle piastre devono essere corredati dei certificati del test di promozione della crescita e di idoneità del metodo.

Metodologia dell'Incubazione = 3-5 gg a 20-25° C seguita da un'ulteriore incubazione a 30-35° C per altri 2-3 gg: questo metodo consente di rilevare la maggior parte di batteri e funghi.

NUMERO DI RILEVAZIONI

Per determinare il numero di campioni per il controllo sia della contaminazione dispersa nell'aria che delle superfici, si deve tener conto del volume dell'ambiente, della superficie e delle caratteristiche strutturali del laboratorio.

Si consiglia di effettuare i seguenti controlli:

- campionamento attivo dell'aria: n. di punti come per la conta delle particelle
- campionamento passivo dell'aria: sotto cappa, in attività
- piastre a contatto: da 5 a 10 punti di campionamento.

SITI DEL LABORATORIO DOVE EFFETTUARE LA CONTA MICROBIOLOGICA

La conta microbiologica deve essere effettuata all'interno delle cappe a flusso laminare per la valutazione del rispetto del grado di contaminazione (grado A).

Il campionamento attivo dell'aria deve essere eseguito all'interno della cappa sia *at rest* che *in operation* (magari in attività routinaria simulata).

Per quanto riguarda invece la valutazione del rispetto dei parametri dell'ambiente di fondo (grado D), il responsabile del

laboratorio identifica i punti in cui effettuare la verifica (piani di lavoro, pavimento, superfici verticali, apparecchiature, pass box, carrelli, sedie, bocchette di immissione ed estrazione aria, interfoni, maniglie, porte...) in funzione della struttura del laboratorio stesso, del tipo di strumenti presenti e dell'impatto che possono avere in termini di rischio di contaminazione alcuni passaggi di lavorazione, la presenza di personale o di altro materiale.

Il controllo della biocontaminazione deve essere effettuato anche all'interno degli incubatori.

FREQUENZA DEI CONTROLLI

La frequenza dei controlli dei test microbiologici per la valutazione della biocontaminazione può essere così schematizzata:

1. ARIA

A. Campionamento attivo (es. SAS)

- Cappa a flusso laminare: ogni 6 mesi
- Locale grado D: almeno ogni anno

B. Campionamento passivo (piastre per deposizione)

- Cappa a flusso laminare: *in operation*, durante la lavorazione
- Locale grado D: almeno ogni anno

2. SUPERFICI

- Cappa a flusso laminare:

- *At rest*: ogni 6 mesi
- *In operation*: a termine della processazione
- Locale grado D: almeno ogni anno

Dato che i risultati dei controlli sono disponibili dopo più di cinque giorni e cioè dopo che il transfer degli embrioni in

utero è stato eseguito, non è possibile assicurare che un ciclo di PMA già concluso sia stato eseguito nel rispetto del grado A di contaminazione microbica.

La valutazione quotidiana dello stato di limpidezza e purezza dei terreni di coltura costituisce comunque un valido supporto alla validazione del processo.

Nel caso di contaminazione, il responsabile del laboratorio informerà il responsabile clinico del centro PMA. Questo evento deve essere considerato come "Non Conformità" e quindi come tale deve essere trattato all'interno del Sistema Qualità del centro PMA.

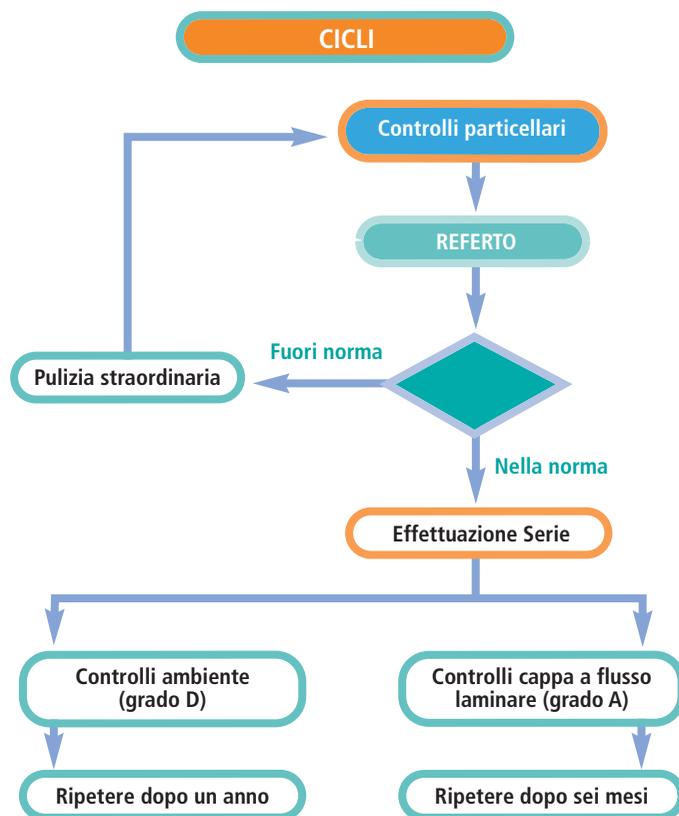
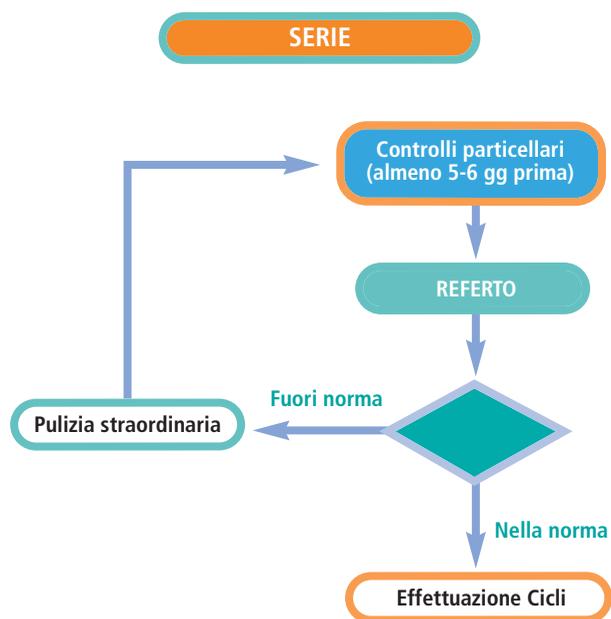
Tutti i controlli microbiologici, compresa l'incubazione delle piastre, possono essere effettuati nel proprio Centro di PMA e letti dal biologo o figura equipollente del Centro stesso.

Nei Centri in cui l'attività viene svolta "in serie", dopo il periodo di chiusura dell'unità di trattamento d'aria e alcuni giorni prima dell'inizio dell'attività si deve provvedere alla riqualifica dell'ambiente, con controlli ambientali sia dei parametri fisici che di quelli microbiologici. L'attività sarà ripresa solo a risultati conformi alle specifiche predefinite.

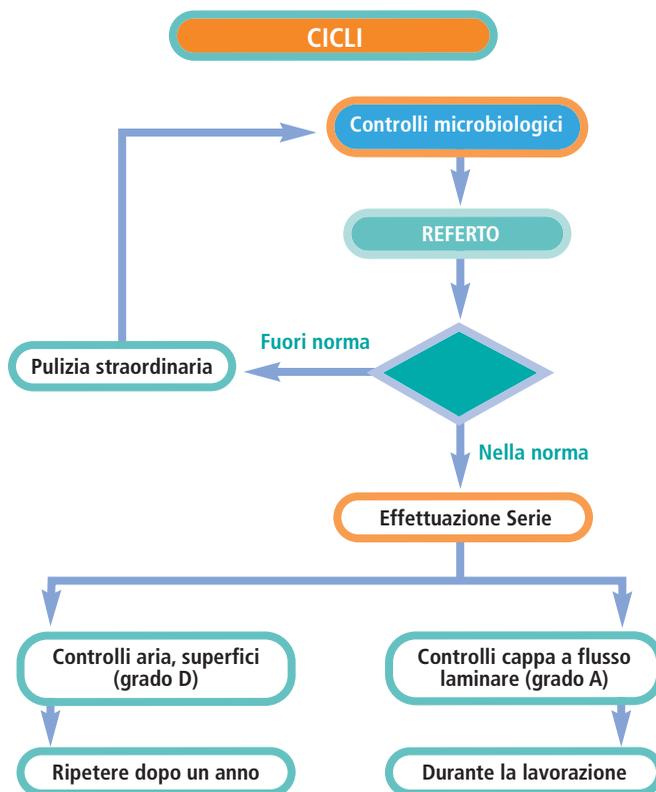
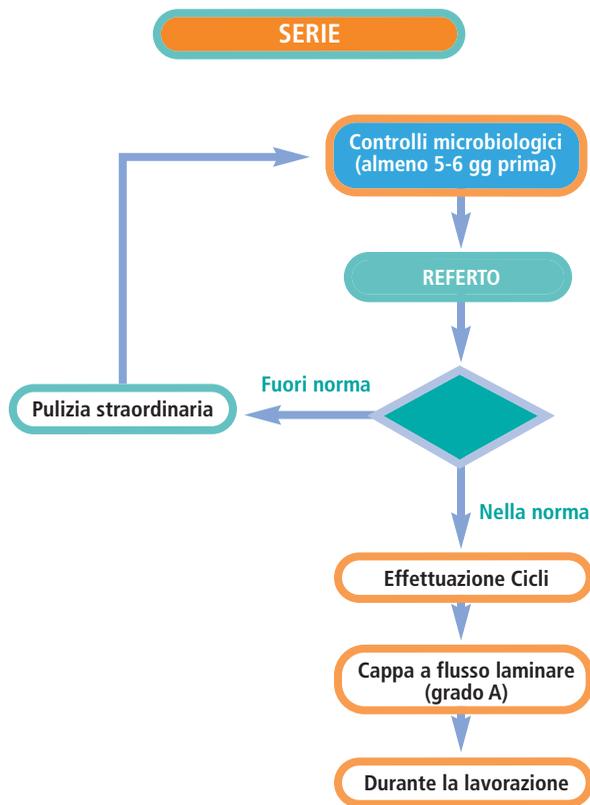
In ogni caso in cui la verifica di grado non risultasse idonea (per la conta particellare e/o per la carica microbica), verrà eseguita una manutenzione straordinaria degli ambienti fino al ripristino delle condizioni richieste, che devono essere documentate.

Qualora le piastre rivelassero ripetutamente la presenza di risultati fuori specifica nelle stesse sedi e/o in seguito alla manutenzione/pulizia straordinaria, è opportuno valutare la tipizzazione dei microrganismi.

CONTROLLI PARTICELLARI



CONTROLLI MICROBIOLOGICI



STRUTTURAZIONE DI UN LABORATORIO DI PMA

La progettazione di un laboratorio di PMA deve prevedere determinate caratteristiche per facilitare il rispetto dei limiti imposti per legge.



Il laboratorio deve essere progettato in maniera tale da facilitare la pulizia e quindi, per esempio, con pareti a superficie liscia e regolare con raccordi con il pavimento arrotondati, prese elettriche da incasso, controsoffitti in materiale non poroso sigillati, lampade complanari, le bocchette di mandata dell'aria a soffitto e le griglie di ripresa a livello del pavimento, con un numero adeguato di ricambi d'aria (10-20) che permettono un flusso adeguato per la pulizia del locale.

Per evitare alte concentrazioni di VOC (*Volatile Organic Compounds*) nell'aria all'interno del laboratorio, bisognerebbe tener conto del tipo di colle e di vernici utilizzate (basse emissioni di VOC).



Per mantenere una qualità dell'aria controllata non devono esserci aperture verso l'esterno (finestre). È auspicabile che nel locale sia ridotta il più possibile la presenza di superfici o di recessi in cui possa accumularsi polvere, così come dovrebbe essere introdotto nel locale solo il materiale di volta in volta necessario per la lavorazione, evitando quanto più possibile il deposito anche di documenti cartacei.

La disposizione della strumentazione deve essere tale da permettere facilmente la pulizia sia degli ambienti che degli strumenti stessi.

Il laboratorio dovrebbe essere ubicato in contiguità con la sala adibita al prelievo degli ovociti per consentire un passaggio diretto delle provette contenenti il liquido follicolare in laboratorio (Fig. 2).

L'aerazione deve essere strutturata in modo che, all'interno del laboratorio, la pressione dell'aria sia superiore a quella dei locali adiacenti meno puliti, al fine di impedire l'infiltrazione di aria esterna dai locali adiacenti a minor pulizia.

La differenza minima di pressione tra due locali collegati deve essere almeno di 10 Pa.

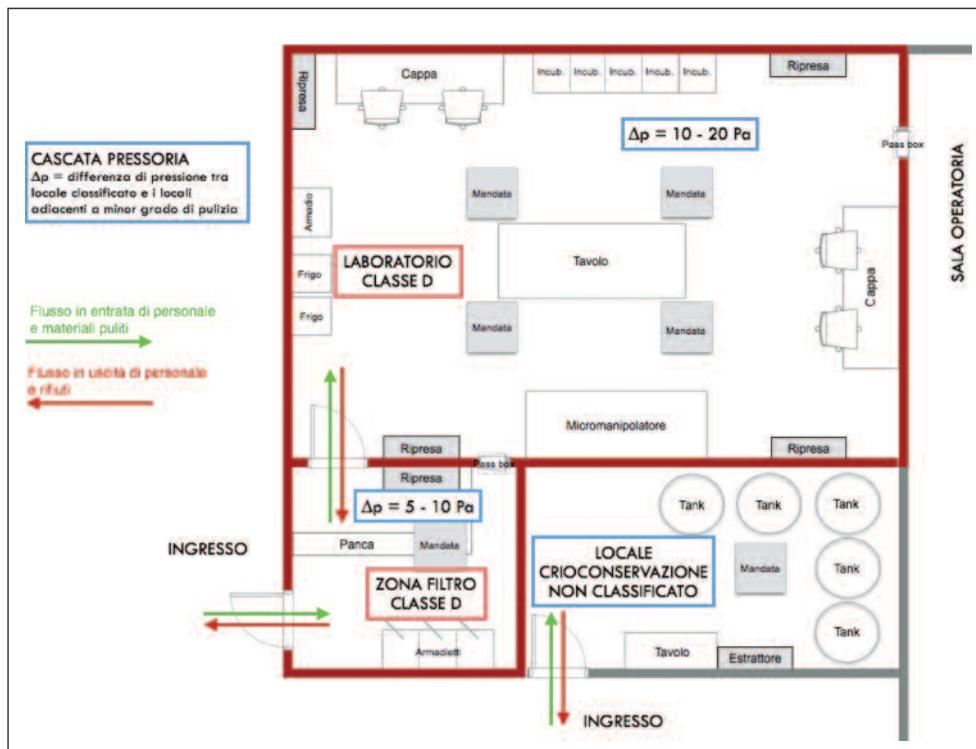


Figura 2
Esempio di Laboratorio di PMA.

L'aria deve essere immessa in laboratorio dopo che è stata sottoposta a filtrazione con filtri assoluti terminali ad alta efficienza (HEPA: *High Efficiency Particulate Air* con un filtraggio aria del 99.97% e che trattiene particelle con diametro $> 0.3\mu$). Per ridurre la percentuale di VOC, sia nell'aria del laboratorio che all'interno degli incubatori, è possibile utilizzare un ulteriore sistema di filtraggio a base di carbonio attivato e permanganato di potassio. Altrettanto importante è il ricambio dell'aria. Facendo riferimento alle normative EN ISO 14644-4, il numero di ricambi di aria/ora nella classe ISO 8 (che, come detto, corrisponde al grado D delle GMP) deve essere ≥ 10 . Per quanto riguarda i valori di temperatura ambiente, questi devono essere compresi tra 18° C e 24° C, mentre l'umidità deve essere compresa tra il 40% ed il 60%.

REFERENZE

- Decreto legislativo 6 novembre 2007 n. 191 (GURI n. 261 del 9 novembre 2007).
- Decreto legislativo 25 gennaio 2010 n. 16 (GURI n. 40 del 18 febbraio 2010).
- EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008).
- UNI EN ISO 14644 Camere bianche ed ambiente associato controllato
- UNI EN ISO 14698 Camere bianche ed ambienti associati controllati. Controllo della biocontaminazione.
- Manuale per le Banche dei Tessuti (I edizione settembre 2009).
- EDQM Guide ed. 2 2015.

CAPITOLO 3

ACCESSO AL LABORATORIO, FLUSSI DI ENTRATA/USCITA DI PERSONALE E MATERIALI

OBIETTIVI

Questo capitolo descrive le procedure da utilizzare affinché i flussi di entrata e di uscita di personale e di materiali possano essere gestiti adeguatamente in piena conformità a quanto suggerito dai documenti di riferimento nazionali ed internazionali (DE 2004/23, DE 2006/17/CE, D.Lgs. 2007/191 e DE 2006/86) che regolano la donazione, la lavorazione ed il trasferimento di cellule e tessuti all'interno della Comunità Europea. A tal fine è necessario che il laboratorio sia dotato di un layout funzionalmente adeguato (Vedi sezione di riferimento e piantina allegata di questo manuale).

La Società Europea di Riproduzione Umana ed Embriologia (ESHRE), ha pubblicato nel 2016 l'aggiornamento delle proprie linee guida - *ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories*, che sintetizza bene i punti della normativa tessuti che coinvolgono un centro di riproduzione assistita.

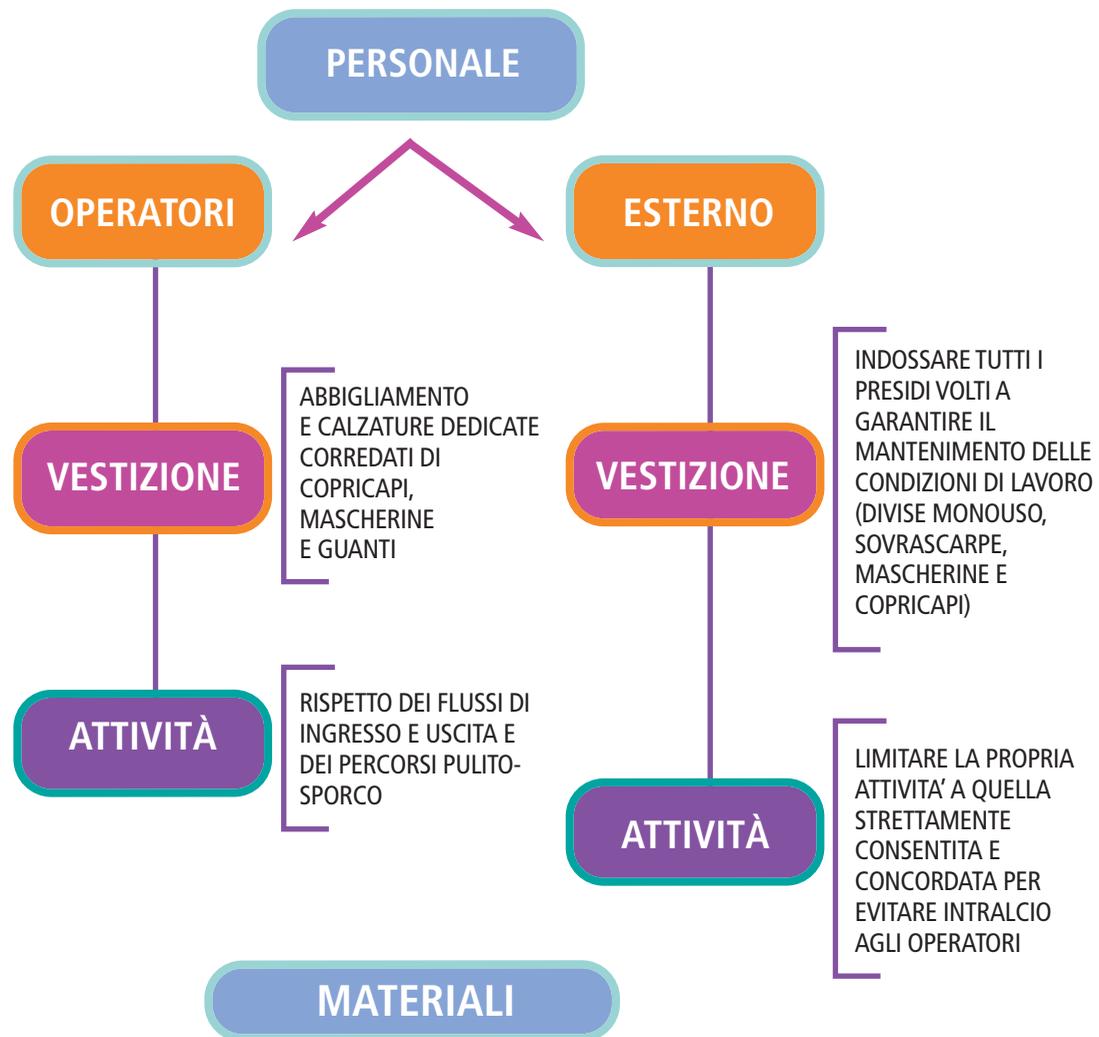
Il D.Lgs. n° 16/2010 in Italia, nel recepire la norma, ha puntualizzato con molta precisione le modalità di comportamento e le regole cui attenersi in quanto istituto dei tessuti.

INDICE

- **Accesso al laboratorio**
- **Flusso dei materiali**
- **Abbigliamento e DPI**



NORME DI COMPORTAMENTO PER L'ACCESSO E LO SVOLGIMENTO DELL'ATTIVITÀ



- lo stoccaggio delle scorte deve avvenire in un deposito collocato dedicato.
- le confezioni che giungono direttamente dalle spedizioni non devono MAI essere introdotti all'interno del laboratorio.
- il carico/scarico delle quantità a magazzino deve essere effettuato esternamente all'area laboratorio o successivamente solo registrando le bolle di consegna.
- Il materiale tolto dall'imballo segue poi il percorso destinato all'interno degli arredi dedicati o dei frigoriferi e la registrazione secondo le procedure stabilite in ciascun Centro.

All'interno del laboratorio i portarifiuti (eccetto i contenitori genericamente denominati "ECO" o "ROT" per i materiali di scarto dell'attività di PMA) dovrebbero essere ridotti al minimo.

ACCESSO AL LABORATORIO

L'accesso al laboratorio deve essere di norma limitato alle sole persone direttamente coinvolte nell'attività.

Per l'accesso del personale o di persone esterne, devono essere messe in atto tutte quelle procedure che limitino il più possibile l'eventualità di introdurre, anche se involontariamente, perturbazioni esterne di tipo contaminante o che influiscano sul processo lavorativo (introduzione di patogeni, perturbazione dei flussi di aria, urto con strumentazioni o personale che maneggia gameti o embrioni).

Durante l'attività clinica è frequente che il personale medico od ostetrico/infermieristico debba accedere al laboratorio ovvero che durante le procedure di prelievo ovocitario e trasferimento embrionario lo stesso personale entri in laboratorio ove esista una contiguità tra i due ambienti laboratorio e sala.



Quando vi sia continuità tra laboratorio e sala chirurgica (o ambulatorio chirurgico), questa deve avere lo stesso grado di pulizia del laboratorio (= classe D). Qualora la continuità tra la sala operatoria e il laboratorio sia garantita solo da un pass box per l'uscita del prodotto, la sala operatoria o ambulatorio chirurgico deve rispettare i requisiti strutturali per questa/o richiesti (normativa vigente nazionale e regionale).

È importante che l'abbigliamento del personale che proviene dalla sala operatoria sia conforme alle richieste dell'ambiente di laboratorio.



da questa.

Tutti gli operatori che accedono al laboratorio devono avere abbigliamento e calzature dedicate all'area controllata e non utilizzate fuori

L'utilizzo di tappetini adesivi (detti *tacky mats* o *sticky mats*) all'ingresso del laboratorio è utile e finalizzato alla sola rimozione di elementi adesi alla superficie delle calzature ma non riveste alcun ruolo nel controllo di tipo infettivo/contaminante.

FLUSSO DEI MATERIALI



Nella zona filtro di uscita deve essere posto un idoneo contenitore che accolga il cambio sporco (mascherine, copricapi, camici o sovrascarpe) del materiale che si è indossato entrando.



Laddove il laboratorio PMA abbia area di ingresso ed uscita unica, devono essere attuate queste modalità operative: il flusso di materiali, personale e prodotto finito deve essere temporaneamente separato per evitare il rischio di incrocio tra pulito e sporco: prima ingresso del personale, dei materiali puliti e delle materie prime sterili, possibilmente prima che inizi la processazione; al termine del ciclo lavorativo, uscita del prodotto finito nel pass box pulite e infine uscita del personale e del materiale di scarto.

Quanto ai materiali (boccette, provette, piastre, pipette, ecc.), questi devono essere macroscopicamente puliti ma non è richiesta una disinfezione esterna delle confezioni che devono comunque essere introdotte in laboratorio (sia negli armadi che nel frigorifero) già tolte dall'imballo e prive di residui esterni di trasporto.

Una cura particolare va posta al pipettatore automatico che, quando viene introdotto sotto cappa, deve essere dotato di batteria autonoma in modo da non portare nello spazio protetto di lavoro in flusso laminare il filo di alimentazione. Inoltre va ricordato che tutti i materiali che vengono portati sotto cappa dall'esterno devono essere disinfettati.

Per tutte le procedure di pulizia e sanificazione si rimanda al Cap. dedicato.

Limitazioni estremamente severe debbono essere stabilite per l'ingresso dei materiali nell'area di laboratorio. Posto che il laboratorio deve essere dotato di arredi consoni ed in linea con le esigenze di qualità ambientale e sanificazione dei locali (vedi capitoli dedicati), all'interno del laboratorio devono giungere le confezioni di materiali necessarie alla routine di breve periodo.

Lo stoccaggio delle scorte dovrebbe avvenire in un deposito collocato fuori dall'area chirurgica e di laboratorio.



In ogni caso le confezioni che giungono direttamente dalle spedizioni (imballi di cartone, plastica rigida e polistirolo – con o senza elementi raffreddanti all'interno) non devono MAI essere introdotte all'interno del laboratorio.

Il carico/scarico delle quantità a magazzino deve essere effettuato in questa fase, esternamente all'area laboratorio o successivamente solo registrando le bolle di consegna.

In casi eccezionali - ove l'imballo debba fino all'ultimo rimanere a protezione del materiale - è necessario che la confezione sia pulita esternamente e che non venga mai comunque appoggiata ai piani di lavoro; per nessuna ragione deve essere disperso in laboratorio il polistirolo o l'espanso antiurto poiché essendo molto elettrostatico tende ad attaccarsi alle superfici. Il materiale tolto dall'imballo segue poi il percorso destinato all'interno degli arredi dedicati o dei frigoriferi e la registrazione secondo le procedure stabilite in ciascun Centro.

All'interno del laboratorio (eccetto i contenitori genericamente denominati "ECO" o "ROT" per i materiali di scarto dell'attività di PMA, che comunque devono stazionare il meno possibile nell'area) dovrebbero essere ridotti al minimo i cestini generici per la raccolta della carta o degli imballi della plasticheira.

ABBIGLIAMENTO E DPI



Al laboratorio si deve accedere in divisa ospedaliera/da laboratorio con manica lunga e pantalone lungo.

In caso di utilizzo di divisa ospedaliera a manica corta, va indossato sopra un camice in tessuto non tessuto a manica lunga. La divisa non deve avere alcun elemento di sporgenza (es. tasche voluminose o asole) per evitare l'involontario ag-

gancio e deve essere realizzata in tessuto liscio a basso rilascio di fibre. È infatti noto che le telerie spesso generano con lo strofinio una dispersione di fibre che si depositano sui piani di lavoro e sulle strumentazioni. È per questo motivo che anche la copertura di strumentazioni ed arredi dovrebbe essere realizzata con apposite coperture (specie i microscopi e le apparecchiature ottiche o che si riscaldino facilmente) che non provochino eccessivo pulviscolo.

È opportuno ricordare che le divise, così come i camici in cotone di tipo medico, NON sono dispositivi di protezione individuale (DPI).



Nello svolgimento delle attività sanitarie, ladove si prefigurasse una contaminazione biologica, non solo per l'applicazione della normativa in oggetto, ma in ottemperanza al D. Lgs. 81/08, l'operatore deve essere protetto da idonei DPI (camice monouso).

Nel caso si verifichi una contaminazione accidentale dell'abbigliamento è necessario che l'operatore provveda subito al cambio della divisa e questa evenienza pone la necessità di disporre di un sistema in grado di garantirne un numero idoneo di capi ed una loro efficiente fornitura.

A questo scopo possono essere disposte anche divise monouso. Ovviamente situazioni particolari possono essere valutate nello specifico e possono comportare la necessità di una dotazione più consistente.

Rientrano nelle indicazioni riguardanti l'abbigliamento anche l'uso di calzature idonee e pulite nonché l'utilizzo di copricapi, mascherine e guanti.



All'interno del laboratorio, come per la sala operatoria, sono da prediligersi calzature dedicate costituite da materiali che possano supportare cicli di sterilizzazione (autoclavabili) e che siano confortevoli.

Si sconsiglia quindi l'uso di zoccoli di legno e pelle in favore di calzature di gomma in senso lato che rispondano ai requisiti di cui sopra.



Le sovrascarpe sono da destinarsi ad eventuali ingressi sporadici o per i visitatori occasionali ma non possono ritenersi idonee al permanere nella routine lavorativa sia per il loro rapido deteriorarsi sia per il discomfort dell'operatore legato alla mancata traspirazione ed al rischio di inciampo.



L'area di cambio calzatura si realizza nella zona filtro di ingresso al laboratorio dove avviene anche il cambio indumenti dalla zona cosiddetta "sporca" verso quella "pulita". Si ricorda l'importanza di mantenere sempre coperta la capigliatura durante le attività che si svolgono nel laboratorio di PMA. (come durante qualunque altra attività che si svolga nell'adiacente area chirurgica).

È opportuno servirsi delle cuffie di carta/"tessuto non tessuto" tipicamente in uso nelle aree chirurgiche (ma non è richiesta la versione con il soggolo).



La mascherina va sempre indossata durante tutte le fasi delle procedure al fine di evitare la dispersione aerea di possibili contaminanti.

La mascherina va indossata coprendo il naso e va allacciata sopra il copricapo/cuffia. Si può eventualmente derogare dall'utilizzo della mascherina solo durante l'esecuzione delle micromanipolazioni ICSI poiché si lavora comunque fuori cappa e sott'olio.

La mascherina va rinnovata relativamente spesso e si dovrebbe evitare, a tutela anche della propria igiene, di abbassarla, compiere attività differenti (come compilazione, archiviazione, spostamento di materiali) e poi re-indossarla. Per gli uomini che hanno la barba o i baffi, è importante che siano coperti sempre da mascherina.

Le mascherine dotate di visiera dovrebbero essere utilizzate sempre per la preparazione dei campioni infetti (requisito cogente) ma non sono richieste nella routine. Viene spesso lamentato che la mascherina, specie nei soggetti che indossino occhiali da vista, ma non solo, generi appannamento alla visione al microscopio. Questo disagio può essere evitato utilizzando mascherine dotate di spugna sulla forcilla del naso.

I guanti dovrebbero essere indossati durante l'esecuzione di tutte le procedure per cui sia richiesta una protezione individuale o del campione.



I guanti devono essere *powder free*, devono arrivare a metà avambraccio ed essere indossati sotto cappa.

I guanti che arrivano al livello del polso possono essere impiegati solamente nelle pratiche di pulizia, spostamento di materiali o campioni.



I guanti devono essere cambiati frequentemente e comunque ad ogni inizio e fine procedura e ogni qual volta vengano in contatto diretto con il materiale biologico (sangue/sperma/fluido follicolare/muco vaginale) per evitare il rischio di contaminare oggetti o superfici. Per il loro utilizzo nella gestione dei campioni infetti si rimanda al capitolo dedicato. Alcune procedure di laboratorio in PMA possono essere eseguite senza guanti purché si sia proceduto ad una corretta igiene delle mani.

Non esistono dati strutturati in letteratura sulla nocività dell'utilizzo di profumi, trucco o smalto per unghie sebbene sia tradizionalmente riportato che, in particolare il profumo, vada evitato nell'attività del laboratorio PMA. Quello che però deve essere ricordato è che, come in ogni situazione, deve essere applicata una buona regola di pratica igienica ed il buon senso comune. Più in generale il trucco andrebbe evitato in aree a qualità dell'aria controllata.

Una considerazione a parte va invece riservata alle unghie in senso più generale. Per la sicurezza del materiale manipolato e della propria igiene le unghie in laboratorio devono essere mantenute corte e pulite.

Lo spazio sub-ungueale costituisce, infatti, un ricettacolo di patogeni. Il lavaggio delle mani deve avvenire con prodotti adeguati (in commercio ve ne sono numerosi, anche per i soggetti allergici) che oltre alla detersione offrano anche un'atti-

ività batteriostatica. Il lavaggio deve essere frequente nel proprio ed altrui interesse e comunque all'operatore di laboratorio non è richiesto il lavaggio chirurgico delle mani inteso in senso stretto.

Durante l'attività occorre togliere i monili dalle mani e dai polsi (anelli e bracciali); sarebbe preferibile eliminare anche l'orologio. I pendenti alle orecchie dovrebbero essere tolti o coperti dalla cuffia mentre non ci sono restrizioni ad indossare girocolli, ovviamente non collane che intralcino l'attività. I monili in generale costituiscono una fonte di incorporazione di patogeni che poi vengono trasportati sulle superfici ed all'interno degli incubatori ed infine possono costituire un vettore infettivo che l'operatore si porta fino a casa.



Nel laboratorio classificato non devono entrare indumenti utilizzati all'esterno della zona classificata. Sotto cappa occorre mantenere una pulizia adeguata di mani e braccia indossando il camice monouso o la divisa a maniche lunghe e strette a polso per evitare il rischio di intralcio e i guanti.

Tutti i movimenti sotto cappa devono svolgersi con pacatezza evitando spostamenti bruschi ed alzate improvvise. Quando dalla cappa ci si sposta portando con sé piastre e provette, è necessario verificare che nessuno stia passando alle spalle, spostare prima la seduta (che dovrebbe essere sempre dotata di rotelle in materiale facilmente sanitizzabile) e solo successivamente alzarsi. Ove possibile è preferibile, fino alla fine dell'attività, avvalersi per gli spostamenti del materiale di un secondo operatore.

BIBLIOGRAFIA

- De los Santos MJ, Apter S, Coticchio G et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories .The ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs. Hum Reprod. 2016;31(4):685-686. doi: 10.1093/humrep/dew016. First published online: February 17, 2016
- Pratt RJ, Pellowe CM, Wilson JA, Loveday HP, Harper PJ, Jones SRLJ, McDougall C, Wilcox MH. Epic 2: National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infections in NHS Hospitals in England. The Journal of Hospital Infection. 2007;65:Suppl 1 (February):S1-64. doi:10.1016/S0195-6701(07)60002-4.
- Traore O, Eschapaspe D, Laveran H. A Bacteriological Study of a Contamination Control Tacky Mat. The Journal of Hospital Infection. 1997;36 (2) (June): 158-160.

LETTURE SUGGERITE ED APPROFONDIMENTI

- EUTCD 2004/23, DE 2004/23/CE, DE 2006/17/CE, DE 2006/86/CE, D.Lgs. 2007/191, DE 2006/17, DE 2006/86 e D.Lgs. 2010/16.
- ESHRE Revised Guidelines 2015 for good practice in IVF laboratories : Human Reproduction. 2016;31(4):685-6.
- Code of Practice Edition 8.0 HFEA. The Human Fertilisation and Embryology Authority. First published 2009. Revised October 2014.
- ESHRE position paper on the EUTCD EC/2004/23, ESHRE Website Nov 2007.
- Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 120 - Attuazione delle direttive n. 88/320/CEE in materia di ispezione e verifica della buona prassi di laboratorio (G.U. n. 40 del 18-02-1992).
- Decreto Legislativo 4 dicembre 1992, n. 475 - Attuazione della direttiva 89/686/CEE del Consiglio del 21 dicembre 1989, in materia di ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai dispositivi di protezione individuale (G.U. n. 289 del 9 dicembre 1992, Supplemento Ordinario).
- Decreto 5 agosto 1999 - Ministero della Sanità - Disposizioni relative all'ispezione e verifica della buona prassi di laboratorio in recepimento delle direttive 1999/11/CE e 1999/12/CE (G.U. n. 241 del 13- 10-1999).
- Decreto del Ministero del Lavoro e della Previdenza Sociale del 12 novembre 1999 - Modificazioni all'allegato XI del Decreto Legislativo 19 settembre 1994, n. 626, recante attuazione di direttive comunitarie riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro (G.U. n. 21 del 27 gennaio 2000).
- D. Lgs 81/08
- Direttiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 settem-

bre 2000 relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.

- CDC USA "Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, June 2007 - <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
- CDC USA Guideline for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities, 2003. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_environmentinfection.html
- OSHA Standards: laundry. http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=10051
- Sito Ministero della Salute italiano <http://www.salute.gov.it/>

CAPITOLO 4

PULIZIE E SANIFICAZIONE DEI LOCALI E DELLE ATTREZZATURE

OBIETTIVI

Questo capitolo affronta la tematica relativa alla pulizia e sanificazione del laboratorio di PMA, includendo anche la pulizia e disinfezione degli apparecchi e strumenti situati nel locale. Infatti, come è noto, tutte le attrezzature possono essere punti di raccolta di sporcizia e quindi possono rappresentare una fonte di contaminazione. Un'adeguata pulizia e sanitizzazione dei locali di processazione risulta indispensabile per mantenere la qualità dell'aria richiesta negli ambienti a contaminazione controllata, così come per garantire la sicurezza degli operatori e dei prodotti. Infatti, esclusivamente un ambiente di specifica qualità e pulizia dell'aria permette di minimizzare i probabili rischi di contaminazione incrociata o contaminazione da parte di microrganismi, rendendo possibile la lavorazione di tessuti e cellule a contatto con l'ambiente stesso. Risulta, quindi, necessario predisporre e mettere in atto procedure specifiche mirate a bilanciare da un lato il bisogno di lavorare in un ambiente pulito/decontaminato e dall'altro il rischio di esporre i gameti e gli embrioni ad agenti potenzialmente tossici o mutageni.

INDICE

- **Classi di disinfettanti in uso**
- **Routine di pulizia nei laboratori di PMA**
- **Modalità operative**
- **Programma di pulizia**
- **Validazione**
- **Documentazione riferita alle operazioni di pulizia**

PROGRAMMA DI PULIZIA

PULIZIA ORDINARIA

AMBIENTE

APPARECCHIATURE

OPERATORE

- Personale del centro o di società esterna
- Opportunatamente addestrato
- Deve rispettare le norme di comportamento e vestizione previste dalle POS del sistema qualità

OPERATORE

- Personale del laboratorio di PMA attività svolta secondo le POS del sistema qualità

MATERIALI OCCORRENTI

- bastoni, strofinacci, panni antirilascio monouso
- detergenti, disinfettanti approvati dal Responsabile del laboratorio di PMA

MATERIALI OCCORRENTI

- panni antirilascio monouso sterili e non sterili, carta assorbente soffice, acqua sterile e distillata
- detergenti, disinfettanti approvati dal Responsabile del laboratorio di PMA

FREQUENZA ATTIVITÀ

- giornaliera: pavimenti
- bimestrale: pareti, soffitti, scaffali, armadietti e lampade

FREQUENZA ATTIVITÀ

- giornaliera: piani di lavoro, cappa, microscopi
- settimanale: centrifuga, termoblock, microscopi
- mensile: incubatori
- semestrale: frigorifero

PULIZIA STRAORDINARIA

- da eseguire soltanto a seguito di eventi particolari (manutenzione dei filtri del laboratorio, blocco dei flussi di aria, in caso di rischio di contaminazione, ecc.) e preferibilmente in un periodo "down" del laboratorio
- si esegue secondo le modalità operative previste per la pulizia ordinaria

CLASSI DI DISINFETTANTI IN USO

Per le procedure di pulizia e sanitizzazione si adoperano detergenti, disinfettanti ed attrezzature varie (bastoni, aste, strofinacci, panni antirilascio monouso, ecc.). Queste ultime devono essere di materiale pulibile, sterilizzabile in autoclave e dedicate all'area di utilizzo.

Di seguito sono descritte le classi di disinfettanti di uso più frequente nella routine dei protocolli di pulizia nei laboratori di PMA. Sono riportate anche informazioni generali sulle loro applicazioni e sulle precauzioni di sicurezza.

È importante tener presente che la pulizia preventiva è essenziale per realizzare una corretta disinfezione e che molti prodotti germicidi sono attivi solamente su oggetti puliti. I tempi di contatto per i disinfettanti sono specifici per ogni singolo prodotto e marchio di fabbrica, pertanto tutte le procedure d'uso dei disinfettanti devono essere conformi alle raccomandazioni del fabbricante.

I detergenti e disinfettanti impiegati devono essere approvati dalle Funzioni Responsabili del Centro e, per ciascun prodotto, devono essere disponibili, aggiornate ed opportunamente archiviate, le relative schede di sicurezza e le schede tecniche (copia delle stesse deve essere fornita anche al personale incaricato per la pulizia del locale).

COMPOSTI DELL'AMMONIO QUATERNARIO

Molti tipi di composti dell'ammonio quaternario sono usati come miscele, e spesso in combinazione con altri germicidi, come l'alcol. Hanno buona attività contro le forme vegetative

dei batteri e dei virus con involucro lipidico. Alcuni tipi (come il benzalconio cloruro) sono usati come antisettici. L'attività germicida di certi tipi di composti dell'ammonio quaternario è notevolmente ridotta dalla sostanza organica, dalla durezza dell'acqua e dai detersivi anionici, ed è perciò necessaria molta cura nella scelta degli agenti per il lavaggio preventivo quando per la disinfezione si prevede l'uso di composti dell'ammonio quaternario.

ALCOLI

L'etanolo (alcol etilico, C_2H_5OH) è attivo contro le forme vegetative di batteri, funghi e virus con involucro lipidico, ma non contro le spore. La sua azione sui virus con involucro non lipidico è variabile.

Per una più alta efficacia dovrebbe essere usato a concentrazione di circa il 70% (v/v) in acqua, ma concentrazioni più alte o più basse possono risultare inefficaci. Uno dei maggiori vantaggi delle soluzioni acquose di alcoli è che non lasciano residui sugli articoli trattati.

Una soluzione acquosa al 70% v/v può essere usata sulla pelle, sulle superfici di lavoro dei banchi e delle cappe di biosicurezza, e per immergere piccoli strumenti chirurgici.

Gli alcoli sono volatili e infiammabili e non devono essere usati vicino a fiamme libere.

Le soluzioni di lavoro devono essere conservate in contenitori idonei ad evitare l'evaporazione. Possono indurire la gomma e dissolvere certi tipi di colla.

Le bottiglie con soluzioni contenenti alcol devono essere chiaramente etichettate per evitarne il trattamento in autoclave.

PEROSSIDO DI IDROGENO

Come il cloro, il perossido di idrogeno (H_2O_2) è un forte ossidante ed un potente germicida ad ampio spettro, risulta tuttavia più sicuro del cloro per l'uomo e per l'ambiente. Il perossido di idrogeno o è fornito pronto all'uso come soluzione al 3%, o come soluzione acquosa al 30% da diluire 5-10 volte v/v con acqua sterilizzata.

Le soluzioni di solo perossido di idrogeno al 3-6% hanno potere germicida relativamente lento e limitato. I prodotti ora disponibili contengono altri ingredienti che stabilizzano il perossido, accelerano la sua azione germicida e lo rendono meno corrosivo. Può essere usato per la decontaminazione di superfici di lavoro dei banchi di laboratorio e delle cappe di biosicurezza. Il perossido di idrogeno può essere corrosivo per i metalli come alluminio, rame, ottone e zinco, e può anche decolorare stoffe, capelli, pelle e mucose.

Gli oggetti così trattati devono essere sciacquati accuratamente prima di essere posti a contatto con occhi e mucose. Deve essere sempre conservato lontano dal calore e protetto dalla luce.

ROUTINE DI PULIZIA NEI LABORATORI DI PMA

Generalmente, nella routine dei protocolli di pulizia nei laboratori di PMA viene utilizzato uno dei disinfettanti appartenenti alle classi sopracitate.

È riportato, anche se con minore frequenza, l'impiego di più disinfettanti usati in combinazione, come ad esempio etanolo e composti dell'ammonio quaternario diluiti in acqua sterile.

Inoltre, in alcuni laboratori viene impiegato un disinfettante diverso a secondo se il programma di pulizia da eseguire prevede una attività ordinaria o straordinaria.

Tra tutti i disinfettanti sopra elencati, l'etanolo al 70% è quello più frequentemente utilizzato da diversi anni.

Così come è ben documentata la sua ampia efficacia battericida, è anche nota la sua appartenenza alla categoria dei composti organici volatili (VOC). In letteratura, da diversi studi eseguiti per analizzare la quantità dei VOC presente all'interno del laboratorio di PMA, è emersa un'associazione tra le operazioni di pulizia ed il rilascio di contaminanti ambientali (ad esempio isopropanolo), che come è noto possono influenzare negativamente la coltura in vitro di gameti ed embrioni (Cohen, 1997; Tien-cheng "Arthur" Chang 2010).

Di conseguenza, l'etanolo dovrebbe essere utilizzato soltanto se i livelli dei VOC possono essere monitorati.

Per quanto riguarda le altre due classi di disinfettanti sopracitati, anche l'impiego del perossido di idrogeno trova delle sue limitazioni legate al riconoscimento di proprietà embriotossiche, che risultano maggiori rispetto a quelle associate all'etanolo (Catt, 2013).

Diversamente, i composti dell'ammonio quaternario non risultano tossici per gameti ed embrioni, ed inoltre, la loro azione battericida è ampiamente riconosciuta (Janssens, ESHRE 2007).



Di conseguenza, tra tutti i disinfettanti conosciuti si consiglia di utilizzare i composti dell'ammonio quaternario.

MODALITÀ OPERATIVE

Solitamente la pulizia e sanitizzazione della cappa e delle apparecchiature sono effettuate dal personale del laboratorio di PMA, mentre la pulizia dei locali è affidata al personale addetto della Azienda o di società esterne. In ogni caso queste attività devono essere svolte da personale opportunamente addestrato, seguendo procedure operative definite.

L'operatore delle pulizie deve osservare, per l'ingresso nel laboratorio di PMA, le stesse norme di comportamento e vestizione e quelle per l'introduzione dei materiali previste per il personale del laboratorio e per tutto il materiale che entra e esce dai locali a contaminazione controllata.

Le operazioni di pulizia e sanitizzazione non devono essere condotte durante le attività produttive, a meno di eccezioni opportunamente giustificate. Le operazioni di pulizia devono interessare tutte le zone, anche quelle meno accessibili.



Si consiglia, per quanto riguarda la pulizia delle superfici verticali (pareti, porte, finestre, ecc.), di iniziare sempre dall'alto e dirigersi verso il basso con movimenti verticali, non circolari; per la pulizia dei pavimenti, di procedere sempre dal fondo del locale verso l'uscita dello stesso secondo strisce parallele; per la pulizia dei soffitti, di procedere secondo strisce parallele. È opportuno incominciare la pulizia partendo dalle zone più pulite verso quelle più sporche, in modo che il panno venga a contatto con le zone più pulite nelle condizioni migliori, con movimenti unidirezionali (mai a zig zag o circolari), sovrapponendo fra di loro le passate di circa 2 cm.



Durante le operazioni di pulizia si devono utilizzare gli opportuni Dispositivi di Protezione Individuale (D.P.I.).

PROGRAMMA DI PULIZIA

In linea generale, un programma di pulizia dovrebbe prevedere una attività ordinaria ed una attività straordinaria.

Per la pulizia degli strumenti e delle superfici del laboratorio si consiglia di utilizzare i composti dell'ammonio quaternario poiché risultano efficaci e soprattutto non tossici per gameti ed embrioni (Janssens, ESHRE 2007). Questi prodotti devono essere utilizzati rispettando le modalità di uso consigliate dalle aziende produttrici al fine di ottimizzarne l'efficacia. I disinfettanti e detergenti utilizzati nei locali di Grado A e B devono essere sterili prima dell'uso.

Per evitare l'insorgenza di batteri resistenti, è consigliabile utilizzare più di un disinfettante, secondo un programma di rotazione, utilizzando un disinfettante con proprietà anche sporicida diverso da quello utilizzato quotidianamente almeno durante le pulizie periodiche effettuate nei momenti di assenza di gameti ed embrioni nel laboratorio.

PULIZIA ORDINARIA

AMBIENTE

La pulizia deve iniziare dalle aree più pulite per proseguire successivamente verso le aree più sporche. Il detergente/disinfettante non va applicato sulle superfici da pulire ma sui panni sterili. I panni vanno conservati nella loro confezione e tolti

all'occorrenza in prossimità della zona da pulire. Il panno, piegato in quattro durante le operazioni, deve essere umido, non impregnato eccessivamente per limitare il più possibile la quantità di residui lasciati sulle superfici. Con frequenza giornaliera e al termine dell'attività lavorativa, tutti i contenitori destinati ai rifiuti speciali all'interno del laboratorio di PMA devono essere ritirati dal personale incaricato. I sacchi portarifiuti devono essere chiusi senza far fuoriuscire l'aria prima di essere tolti dal contenitore e trasportati fuori dal laboratorio.



Si consiglia di programmare la pulizia ambientale prevedendo una frequenza giornaliera per la pulizia dei pavimenti ed una almeno bimestrale per le pareti, soffitti, scaffali, armadietti e lampade, da programmare in base al volume di attività del laboratorio.

PIANI DI LAVORO



Si devono effettuare le operazioni di pulizia ordinaria al termine di ogni fase di lavorazione intermedia (in funzione dei processi di lavorazione in corso) ed al termine di ogni giornata di lavoro.

Per le operazioni di pulizia ordinaria si raccomanda di utilizzare panni sterili a basso rilascio inumiditi con il disinfettante/detergente.

CAPPA



Le operazioni di pulizia e disinfezione della cappa devono essere effettuate al termine di ogni procedura specifica di un paziente, oppure in caso di versamenti accidentali di liquidi biologici e alla fine della giornata lavorativa.

Nello specifico, al termine di ogni procedura specifica di un paziente (ad esempio tra due prelievi ovocitari di due pazienti diversi) può essere sufficiente pulire il piano di lavoro. Invece, alla fine della giornata lavorativa si raccomanda di pulire con attenzione il piano di lavoro, le pareti interne ed esterne del vetro, utilizzando dei panni antirilascio monouso sterili e il disinfettante. Inoltre, tutti gli oggetti, incluse le attrezzature che sono all'interno della cappa, devono essere decontaminati e rimossi a fine lavoro, poiché i residui delle colture possono generare situazioni di crescita microbica.



Si consiglia di seguire scrupolosamente le indicazioni fornite dalla casa produttrice del disinfettante, per quanto riguarda le modalità d'uso ed i tempi di contatto.

Per quanto riguarda la pulizia più accurata delle cappe, che comprende anche la griglia di ventilazione del flusso laminare e la superficie grigliata sottostante, questa è registrata come intervento ordinario in base ad un programma di manutenzione prestabilito.

INCUBATORI



Si consiglia di eseguire le operazioni di pulizia ordinaria almeno con frequenza mensile. Inoltre, si consiglia di rispettare le istruzioni fornite dal produttore dello strumento, sia per la routine di auto-sterilizzazione che per la disinfezione manuale ed a spruzzi.

In quest'ultimo caso, si raccomanda di lasciare agire il disinfettante secondo quanto raccomandato dalla casa produttrice, impiegando sempre panni antirilascio monouso sterili ed acqua sterile.

Da quando si effettua la pulizia ordinaria, è opportuno attendere almeno un giorno prima di riutilizzare l'apparecchio nella routine clinica, per consentire una corretta stabilizzazione dei parametri di temperatura, %CO₂ ed N₂ che dovranno essere comunque verificati prima dell'inizio dell'attività.

MICROSCOPI



In linea generale, si raccomanda di pulire il microscopio alla fine di ogni giornata lavorativa ed, in maniera più approfondita, alla fine di ogni settimana d'uso.

La pulizia quotidiana consiste nella rimozione della polvere accumulatasi sulle lenti durante la giornata, nella pulizia della superficie del tavolino traslatore e dello sporco raccolto sulle lenti esterne degli oculari come conseguenza degli occasionali

contatti con palpebre e ciglia. Per questo tipo di pulizia è sufficiente rimuovere la polvere con un pennello molto morbido oppure con un getto d'aria compressa come quello che si può ottenere impiegando le bombolette per la pulizia delle macchine fotografiche e delle loro lenti.

Per il tavolino occorre utilizzare un panno antirilascio inumidito con la soluzione del disinfettante.

La pulizia settimanale prevede più o meno le stesse procedure eseguite però anche all'interno dei tubi portaottiche, nella parte inferiore del condensatore, nel revolver portaobiettivi, nella parte inferiore della lente posta immediatamente dopo la fonte luminosa e di quelle parti del tavolino traslatore più "nascoste" e quindi meno facilmente raggiungibili nella pulizia quotidiana.



Si consiglia di coprire il microscopio, quando questo non è in uso, con la copertura di plastica che fa parte del corredo di accessori dello strumento; la polvere ambientale è infatti in grado di infiltrarsi in ogni fessura ed apertura del microscopio tappezzando letteralmente le lenti anche nella loro parte inferiore o all'interno dei tubi.

CENTRIFUGA

Non è richiesta una pulizia giornaliera della centrifuga eccetto nel caso di rottura accidentale di una provetta o nel caso di un versamento nella vasca.



Settimanalmente o ogni qualvolta sia necessario, si consiglia di pulire il contenitore esterno, la vasca e gli accessori con un panno morbido inumidito con la soluzione del disinfettante prescelto, e di sciacquare gli accessori con acqua distillata ed asciugarli con carta assorbente soffice.

TERMOBLOCK



Si consiglia di pulire il termoblock settimanalmente o all'occorrenza mediante un panno inumidito con la soluzione del disinfettante, risciacquando con acqua distillata e asciugando le superfici.

FRIGORIFERI



Si consiglia di eseguire la pulizia del frigorifero con frequenza semestrale o secondo necessità.

Per le pareti esterne è sufficiente una pulizia con un panno asciutto, nel caso di macchie resistenti utilizzare dell'acqua calda, eventualmente dei disinfettanti/detergenti neutri, quindi sciacquare bene ed asciugare. Per le pareti interne procedere, ove necessario, allo sbrinamento per il vano congelatore senza sistema No Frost, mediante una spazzola dura senza utilizzare coltelli o altri oggetti metallici. Per la pulizia usare un panno inumidito con la soluzione di disinfettante, sciacquare bene con acqua distillata ed asciugare le superfici.

PULIZIA STRAORDINARIA

Questo tipo di pulizia si effettua a seguito di eventi particolarmente inquinanti (manutenzione annuale dei filtri del laboratorio, mancanza di corrente con conseguente blocco dei flussi di aria o in caso di superamento dei limiti microbiologici previsti). Per la pulizia straordinaria si eseguono le stesse modalità della ordinaria. Anche in questo caso si deve fare attenzione a tutta quella apparecchiatura che ha funzioni critiche nella processazione, per la quale devono essere previste le situazioni che richiedono una pulizia straordinaria.

Per tutte le apparecchiature le operazioni di pulizia straordinaria possono essere previste:

- al termine di qualsiasi intervento di manutenzione ordinaria o straordinaria dell'apparecchiatura;
- in caso di rischio di contaminazione, dovuto ad esempio a versamento di liquidi potenzialmente contaminanti, materiali biologici, terreni o altri reagenti implicati nei processi produttivi.



Si consiglia di eseguire la pulizia straordinaria in un periodo "down" del laboratorio, cioè quando nessuna coltura *in vitro* di gameti ed embrioni è in corso.

TABELLA RIEPILOGATIVA ESEMPLIFICATIVA DI UNA POSSIBILE FREQUENZA DELLE OPERAZIONI DI PULIZIA ORDINARIA NEI LABORATORI DI PMA

LOCALI/APPARECCHIATURE	FREQUENZA
Pavimenti	Giornaliera
Pareti, soffitti, scaffali, armadietti, lampade, ecc.	Bimestrale
Piani di lavoro	Giornaliera
Cappa	Giornaliera
Incubatori	Mensile
Microscopi	Giornaliera/settimanale
Centrifuga	Settimanale/quando necessario
Termoblock	Settimanale/quando necessario
Frigorifero	Semestrale

VALIDAZIONE



È necessario effettuare la validazione delle procedure di pulizia e sanificazione dei locali e delle attrezzature del laboratorio di PMA mediante analisi microbiologica.

Infatti, il controllo della biocontaminazione consente di valutare il “grado di pulizia” di una determinata area e di tenere sotto controllo le fonti di contaminazione. Per i dettagli sulle modalità del controllo della biocontaminazione si rimanda al capitolo “controlli microbiologici” del manuale.

DOCUMENTAZIONE RIFERITA ALLE OPERAZIONI DI PULIZIA

Devono essere predisposte Procedure e Istruzioni Operative per le operazioni di pulizia-sanitizzazione degli ambienti e delle apparecchiature, così come per il programma di formazione degli operatori, che devono essere gestite nell'ambito del sistema gestione qualità del centro di PMA.

Per registrare le operazioni di pulizia si devono redigere delle schede nelle quali riportare, oltre all'operatore che le ha effettuate, la data, il locale, lo strumento a cui ci si riferisce, nonché i prodotti utilizzati.

ESEMPIO DI SCHEDA PER LA REGISTRAZIONE MENSILE DELLE OPERAZIONI DI PULIZIA AMBIENTALE

DATA E ORA	PAVIMENTI	PARETI, SOFFITTI	SCAFFALI ARMADIETTI LAMPADIE ED ALTRO	PRODOTTO UTILIZZATO	OPERATORE	FIRMA

BIBLIOGRAFIA

- Direttiva Europea 2004/23/CE.
- Direttiva Europea 2006/17/CE.
- Direttiva Europea 2006/86/CE.
- D.Lgs. 06-11-2007 n. 191.
- D.Lgs. 25-1-2010 n. 16.
- D.Lgs. 85/2012.
- D. Lgs. 81/2008[e successive modifiche e integrazioni]. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n.123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro.
- Norma di riferimento: UNI EN ISO 9001 § 6.4 Ambiente di lavoro.
- G.M.P. = Good Manufacturing Practices.
- Elder K, Elliott T. Cleaning protocol in the VVF laboratory. *J Assist Reprod Genet.* 2004 Mar;21(3):63-4.
- Laboratory Biosafety Manual, terza edizione (2004). Organizzazione mondiale della sanità.
- Manuale per le Banche dei Tessuti (I edizione settembre 2009).
- Chang TC, Eddy CA, Jacoby ES, de la Pena MO, Brzyski RG, Schenken RS. Human sperm survival bioassay to examine toxicity of a new clinical laboratory equipment disinfectant. Poster ASRM 2010.
- Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Human Reproduction.* 1997;vol.12 no.8: 1742-1749.
- Janssens R. Novel sterilizing solution Fertisafe™ is effective and non embryotoxic. Poster ESHRE 2007.
- Catt S, Lingham E, Lee W, Muthusamy Y, Kally C, Chen P, Pangestu M, Catt J, Temple-Smith P. A randomized trial investigating the effectiveness and safety of three IVF laboratory disinfectants. Session 61: Effects of interventions on embryo quality - Oral Presentation - *Hum Reprod.* June 2013;28:i99 - i101.

CAPITOLO 5

GESTIONE ATTREZZATURE E STRUMENTAZIONE, TARATURA E CALIBRAZIONE STRUMENTI

PRINCIPI GENERALI

I centri di procreazione medicalmente assistita devono possedere determinati requisiti tecnici e strutturali, come descritto dalle normative nazionali e regionali. Tutte le attrezzature e gli strumenti presenti devono essere correttamente utilizzati e gestiti. A tale scopo devono essere corredati di adeguata documentazione che ne attesti lo stato di utilizzo, manutenzione e controllo, in modo da poter avere sotto sorveglianza le condizioni in cui vengono processati gameti ed embrioni. Lo scopo di questo capitolo è quello di fornire un esempio di programma di gestione degli strumenti e delle attrezzature, al fine di garantire sempre l'affidabilità e gli standard tecnologici necessari per le tecniche di PMA.

INDICE

- **Requisiti minimi tecnologici per laboratori di PMA di I-II-III livello**
- **Caratteristiche delle attrezzature e manutenzione e taratura**
- **Cappe**
- **Microscopi**
- **Micromanipolatori**
- **Incubatori**
- **Frigoriferi e congelatori**
- **Bagni termostatici**
- **Pipettatrici**
- **Dispensatori**
- **Strumenti di misurazione per effettuare la taratura**
- **Controlli microbiologici**
- **Pianificazione delle attività**
- **Misurazione dei parametri critici**
- **Modulistica**
- **Referenze**

GESTIONE ATTREZZATURE E STRUMENTAZIONE

Normative di riferimento

Legge 40/2004
Decreti Legislativi
Linee Guida PMA
Conferenza stato-regioni
Decreti regionali



Descrizione delle attrezzature e strumentazione

- Descrizione dei requisiti minimi tecnologici per i centri di PMA
 - Descrizione delle caratteristiche della strumentazione e attrezzature
- Valutare il numero e tipologia strumentazione e attrezzature a seconda della tipologia e numerosità delle procedure svolte



Installazione e gestione delle attrezzature e strumentazione

- Qualificare lo strumento al momento dell'installazione
- Pianificare le attività di gestione degli strumenti
- Effettuare manutenzione ordinaria, programmata e straordinaria
- Tarare i parametri critici degli strumenti
- Ove necessario, effettuare i controlli microbiologici



Tracciabilità della gestione strumentazione

- Predisporre schede apparecchiature
- Registrare tutte le attività di taratura/manutenzione
- Predisporre modulistica e POS
- Tenere i Logbook
- Allamare gli strumenti con parametri critici e predisporre datalogger per registrarne andamento

REQUISITI MINIMI TECNOLOGICI PER LABORATORI DI PMA DI I-II-III LIVELLO

I requisiti minimi tecnologici, strutturali e strumentali di un centro di PMA variano in base alla tipologia di prestazioni erogate e, quindi, del livello (I-II-III) del laboratorio. I requisiti minimi sono stati stabiliti a livello nazionale, fermo restando l'autonomia organizzativa delle singole Regioni e delle Province autonome di Trento e di Bolzano. È necessario, dunque, far riferimento allo specifico Regolamento della propria Regione se presente.

Nel documento della Conferenza Dei Presidenti Delle Regioni e Delle Province Autonome (11 novembre 2004) venivano richiesti i seguenti requisiti minimi tecnologici per un laboratorio PMA.

Laboratorio di I livello:

- Cappa a flusso laminare
- Bagnomaria termostato (o similare)
- Microscopio ottico a contrasto di fase
- Centrifuga
- Pipettatrice
- Eventuale contenitore/i criogenico/i se viene effettuata la crioconservazione

Laboratorio PMA di II/III livello (oltre ai requisiti indicati per il I livello):

- n. 2 Incubatori a CO₂
- Invertoscopio
- Microscopio ottico
- Micromanipolatore (applicato ad invertoscopio)
- Stereomicroscopio
- Centrifuga
- Eventuale sistema automatizzato programmabile per la

crioconservazione di ovociti ed embrioni (in base ai specifici requisiti Regionali)

- Contenitori criogenici (il numero dipende dall'attività e dalla tipologia di pazienti trattati)

Negli ultimi anni diverse Regioni hanno comunque aggiornato e/o modificato il proprio elenco in base alle più recenti normative ed avanzamenti tecnologici.

REQUISITI MANDATORI



Tutte le attrezzature e i dispositivi tecnici critici del laboratorio devono essere identificati e qualificati, periodicamente ispezionati e preventivamente sottoposti a manutenzione, conformemente alle istruzioni del fabbricante. Deve quindi essere presente un elenco aggiornato delle apparecchiature in uso.

Deve essere predisposto un piano di manutenzione programmata.

Devono essere definite le procedure di manutenzione e taratura e identificati gli strumenti di riferimento con i quali effettuare la taratura dei parametri critici.

Ogni strumento deve essere provvisto di un logbook o scheda apparecchiatura, nel quale registrare ogni operazione di qualifica, manutenzione e taratura nel caso si tratti di apparecchiature con funzione di misurazione critica su un determinato parametro di riferimento.

Il manuale di istruzioni di ciascuno strumento (in lingua italiana) deve essere disponibile ed accessibile a tutti gli operatori.



Per ogni strumento devono essere disponibili istruzioni operative standard (POS) e protocollate nel manuale di laboratorio, accessibili a tutti i membri dello staff, al fine di poter indicare le azioni da intraprendere in caso di guasto o malfunzionamento.

La progettazione e la manutenzione delle attrezzature e i materiali devono corrispondere esclusivamente alle destinazioni d'uso previste e sono predisposte in modo da minimizzare ogni rischio per i riceventi e il personale.

Le attrezzature nuove o riparate devono essere controllate al momento dell'installazione e qualificate prima dell'uso. Gli strumenti devono essere collegati ad un gruppo di continuità assoluto (UPS on line) e ad un gruppo elettrogeno ausiliario che possa entrare in funzione automaticamente in caso di mancanza di alimentazione. I parametri critici devono essere monitorati e collegati ad appositi allarmi. In caso di malfunzionamento, guasto o semplicemente disuso è necessario definire le procedure di declassamento dello strumento.

Periodicamente è necessario procedere con la verifica della sicurezza elettrica dello strumento.



La scelta del numero e del tipo di strumenti da acquistare per attrezzare il laboratorio deve essere adeguata al tipo di lavoro da eseguire e al numero di cicli effettuati. Gli strumenti devono essere facili da pulire e/o disinfettare. La pianificazione della frequenza di monitoraggio degli strumenti deve essere fatta in base alle criticità ed all'utilizzo, al fine di effettuare eventuali procedure correttive in maniera tempestiva.

CARATTERISTICHE DELLE ATTREZZATURE

Si riporta di seguito una descrizione dettagliata degli strumenti utilizzati nei laboratori di PMA, nonché le modalità per poter effettuare la manutenzione e l'eventuale taratura degli stessi, in modo da poterne sempre garantire il corretto funzionamento ed affidabilità.

DEFINIZIONI

Qualifica: procedura atta a dimostrare e documentare che lo strumento è in grado di fornire le prestazioni conformi alle specifiche ed alle caratteristiche di qualità prestabilite, definite in fase di progettazione (requisiti dell'utilizzatore e proposta del fornitore). Il processo di qualifica di uno strumento è solitamente effettuato al momento dell'installazione e i risultati devono essere registrati in un report che contenga l'analisi dei dati ottenuti, la verifica che i risultati soddisfino i criteri di accettabilità, ovvero le deviazioni riscontrate e le modifiche effettuate per correggerle.

Manutenzione ordinaria: è rappresentata dall'insieme delle azioni manutentive effettuate su uno strumento o attrezzatura da personale interno qualificato, volte a garantirne il corretto funzionamento e a scongiurare l'insorgere di rischi per il processo cui sono preposte, senza modificare o migliorare le funzioni svolte dallo strumento stesso (ad esempio la pulizia interna ed esterna degli strumenti).

Manutenzione programmata: intervento che viene effettuato a tempi prefissati per evitare decadimenti nel buon funzionamento dell'apparecchiatura.

Questo tipo di manutenzione generalmente consiste nella misura dei parametri importanti ai fini della sicurezza, nonché nell'esecuzione dei programmi di manutenzione prescritti dal costruttore e descritti nel manuale d'uso.

Manutenzione correttiva: intervento effettuato dopo il verificarsi di guasti o malfunzionamenti. Questo tipo di interventi vengono effettuati su specifica richiesta e vengono eseguiti normalmente da un tecnico specializzato della ditta fornitrice dopo che l'operatore ha verificato l'anomalia di comportamento. È generalmente richiesta la ri-qualifica dello strumento dopo la riparazione del guasto.

Taratura: è l'insieme di misurazioni e/o operazioni eseguite per valutare la relazione tra i valori indicati da uno strumento di misurazione e i corrispondenti valori noti di un misurando. Il termine taratura non comprende operazioni eventualmente necessarie per far rientrare lo strumento nei limiti di specifica o di classe.

Per effettuare la taratura dell'attrezzatura in uso in laboratorio è necessario misurare i parametri critici, determinando l'accuratezza e la precisione della grandezza considerata, attraverso un **elemento di riferimento** (a sua volta materiale, campione come soluzioni del pHmetro, o strumento come il termometro).

Gli **strumenti di riferimento** (es. termometro) devono essere in possesso di certificato a marchio Accredia (o di altro Ente membro dell'*European Accreditation* e facente parte degli Accordi di Mutuo Riconoscimento MLA), emesso da laboratori di taratura accreditati. Lo strumento di riferimento adottato per effettuare una taratura deve avere un'incertezza di misura uguale o migliore rispetto all'incertezza dell'attrezzatura da

tarare. La frequenza della taratura di uno strumento dipende dalla criticità dell'apparecchiatura e delle prestazioni da esso fornite e deve essere tale per cui la probabilità di superamento dei limiti predefiniti, nel periodo intercorrente tra due tarature, risulti sufficientemente bassa.

Per i contaparticelle e i campionatori dell'aria utilizzati al fine del monitoraggio della contaminazione negli ambienti di lavoro è accettabile la taratura del costruttore, purché tale verifica venga rifatta ad intervalli regolari.

MISURAZIONE

Insieme di operazioni aventi lo scopo di determinare il valore di una grandezza.

AGGIUSTAMENTO

Operazione volta a portare uno strumento di misurazione nelle condizioni di funzionamento e di accuratezza adatte per il suo utilizzo. Spesso si confonde l'aggiustamento con la taratura.

CAPPE A FLUSSO LAMINARE



La lavorazione dei campioni biologici per le tecniche di II e III livello deve essere effettuata in un ambiente che garantisca una qualità dell'aria GMP di grado A, tranne nei casi in cui sia dimostrato che possa essere nocivo per i gameti e gli embrioni (es. micromanipolazione, ICSI, biopsia embrionale), con un ambiente di fondo equivalente almeno a GMP di grado D. Per le tecniche di I livello è sufficiente che i gameti siano trattati sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente dedicato, pulito e monitorato.

In linea di principio tutte le tipologie di cappe a flusso laminare (orizzontale o verticale) opportunamente ingegnerizzate sono in grado di assicurare una qualità dell'aria di grado A. La tecnologia che consente un'elevata qualità dell'aria nell'ambiente di lavoro è basata principalmente sull'utilizzo di:

- filtri **HEPA** (*High Efficiency Particulate Air*), realizzati in microfibra di vetro che garantiscono un'elevata purezza dell'aria,
- un flusso di aria ordinato secondo direttrici parallele che protegge i campioni biologici durante la manipolazione,
- superfici facilmente lavabili e ideate per ridurre al minimo le perturbazioni del flusso all'interno della cappa.

Per la manipolazione di ovociti ed embrioni è necessario inoltre che il piano di lavoro della cappa sia riscaldato (integrato oppure sovrastante) e deve essere prevista la possibilità di integrare uno stereomicroscopio al suo interno.

Le cappe a flusso laminare si dividono principalmente in due categorie: flusso laminare verticale e orizzontale.

FLUSSO LAMINARE VERTICALE

Nei laboratori di PMA si utilizzano principalmente due tipologie di cappe a flusso laminare verticale: cappa a flusso laminare verticale, detta anche cappa sterile, e cappa a flusso laminare verticale di classe II.

Cappa a flusso laminare verticale (cappa sterile): l'aria esterna viene aspirata dalla parte superiore dello strumento e convogliata attraverso un filtro HEPA posizionato al di sopra dell'area di lavoro.

L'aria filtrata viene canalizzata secondo direttrici parallele, attraverso la parete superiore della cabina (provvista di appositi

fori) in direzione della parte inferiore. Ne risulta un flusso laminare verticale di aria pulita, che investe il banco di lavoro in modo uniforme.

Questo tipo di cappa è generalmente utilizzato durante tutte le fasi della lavorazione (trattamento del liquido seminale, trattamento del liquido follicolare, decumulazione ovocitaria, transfer embrionale).

Cappa a flusso laminare verticale di sicurezza microbiologica di classe II: questa cappa genera anch'essa una corrente d'aria pulita che si muove secondo direttrici parallele (laminare), che investe l'area di lavoro.

In questo caso, però, l'aria esterna è aspirata dalla parte frontale della cappa, attraverso dei fori presenti sul bordo anteriore del banco di lavoro. Quest'aria in ingresso passa sotto il piano di lavoro e raggiunge i filtri HEPA nella parte superiore della cappa.

La maggior parte di quest'aria viene filtrata e veicolata con flusso verticale laminare all'interno dell'area di lavoro, mentre la restante parte viene fatta passare attraverso un altro filtro HEPA posto sulla sommità della cappa ed espulsa nell'ambiente esterno.

Questo tipo di cappa assicura la protezione sia del campione che degli operatori. Viene quindi maggiormente utilizzata per campioni di liquido seminale non screenati o positivi a malattie infettive.

In entrambi i casi la filtrazione garantisce all'interno della cabina una qualità dell'aria di grado A secondo la norma GMP, o ISO 5 (la vecchia classe 100 della U.S. Federal Standard 209e). La classe di contaminazione della cappa si determina misurando la concentrazione nell'area di lavoro delle parti-

celle aventi dimensione $\geq 0,5$ e ≥ 5 micron (GMP – Annex 1). È necessario specificare che nelle situazioni di aumentato rischio biologico per gli operatori (es. trattamento di pazienti infetti) le cappe di biosicurezza non rappresentano la soluzione al problema, ma fanno parte di un contesto molto più ampio.

È infatti necessaria **una valutazione del rischio prima di intraprendere nuove procedure che possono mettere a rischio gli operatori** (come prescritto dal D.Lgs. 81/08) che comprende una specifica formazione del personale, e la definizione di procedure operative che permettono di minimizzare i rischi nel proprio contesto operativo.

FLUSSO LAMINARE ORIZZONTALE

In questa tipologia di cappa l'aria viene prelevata dall'esterno e veicolata attraverso un filtro posizionato solitamente nella parte posteriore dello strumento.

L'aria filtrata viene fatta passare attraverso la parete posteriore dello strumento verso la parte anteriore secondo direttrici parallele, generando così un flusso laminare orizzontale di aria sterile.

Questo tipo di cappa serve ad evitare la contaminazione del campione e a mantenere una condizione sterile all'interno della zona di manipolazione.

L'operatore viene però in questo modo direttamente investito dal flusso d'aria in uscita. In questo tipo di cappa inoltre è necessario lavorare posizionando il materiale sterile sempre nella parte posteriore dell'area di lavoro.

QUALIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DELLE CAPPE



Al momento dell'installazione deve essere effettuata la qualifica della cappa.

Deve essere predisposto un piano di manutenzione. L'esito della qualifica e di ogni manutenzione effettuata (ordinaria, programmata, o straordinaria) deve essere opportunamente registrato nella modulistica della cappa.

Tutti gli strumenti di misura critica utilizzati per effettuare le qualifiche/manutenzioni delle cappe (es. contatore di particelle, anemometro, termometro ecc.) devono essere corredati del relativo certificato di taratura valido.

QUALIFICA

- verificare la presenza di tutti i componenti
- verificare che siano stati effettuati, superati e certificati i test di:
 - Campionamento di conta particellare nell'aria secondo GMP Annex I vol 4
 - Anemometrici, per valutare la velocità del flusso
 - Campionamento aria "SAS", per valutare l'assenza di microrganismi nell'aria filtrata
 - Taratura della temperatura del piano riscaldato
 - "Smoke test", per verificare che il flusso d'aria generato dalla cappa sia unidirezionale e in assenza di turbolenze.

MANUTENZIONI

La manutenzione ordinaria (con adeguata frequenza) deve prevedere:

- pulizia con appositi detergenti dei piani e delle pareti interne della cappa
- rimozione della polvere dal sistema di ventilazione

Si consiglia di eseguire sempre un'accurata pulizia delle superfici della cappa al termine di ogni lavorazione.

La manutenzione programmata (con frequenza annuale o adeguata alla quantità di lavoro) consiste in:

- Verifica integrità dei filtri HEPA ed eventuale sostituzione
- Campionamento di conta particellare nel flusso d'aria generato dalla cappa secondo GMP A con frequenza semestrale
- Test anemometrici, per valutare la velocità del flusso
- Campionamento aria "SAS", per valutare l'assenza di microrganismi nell'aria filtrata con frequenza semestrale, prelevando un volume d'aria pari a 1000 m³ in meno di 15'
- Taratura della temperatura del piano riscaldato
- "Smoke test", per verificare che il flusso d'aria generato dalla cappa sia unidirezionale e in assenza di turbolenze
- Verifica della sicurezza elettrica dell'apparecchiatura
- È necessario effettuare i test di conta particellare GMP A, anemometrici, SAS, Smoke test e di taratura del piano riscaldato con strumenti opportunamente tarati e corredati del certificato di taratura di un laboratorio di taratura accreditato dall'ente nazionale autorizzato, ove disponibile
- I suddetti test devono essere effettuati *at rest*, cioè con le cappe in funzione ma senza attività lavorativa e ripetuti *in operational* con le cappe in funzione e un operatore in attività, (per poter certificare il grado A GMP)
- Si ricorda che ogni intervento di manutenzione programmata o straordinaria, come i cambi dei filtri, necessita della verifica delle condizioni di sterilità tramite i test sopra elencati



Per effettuare il test di conta particellare GMP A è necessario che siano testati almeno 1000 L d'aria. Il numero minimo di punti di campionamento è ricavato dalla tabella in funzione della superficie della zona pulita espressa in metri quadrati. Se il valore della superficie cade tra due valori consecutivi della tabella, si deve selezionare il maggiore dei due. (ISO 14644-1:2015 punto A.4.1)"

Tabella dei punti di campionamento in funzione della superficie della camera bianca

Area della clean room m ² ≤	N. minimo di punti di campionamento N _L
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10

"Dove sono necessarie informazioni sulla stabilità della concentrazione delle macroparticelle di dimensione $\geq 5 \mu\text{m}$, fare tre o più misurazioni in punti selezionati in intervalli di tempo concordati tra cliente e fornitore. (ISO 14644-1:2015 punto C.5)". Il volume minimo di ogni singolo campione è 1000 L. Si consiglia di verificare che lo strumento utilizzato abbia una capacità di aspirazione di L d'aria/min congrua al tempo di durata del test (ad es. uno strumento con capacità di aspirazione di 50 L/min deve effettuare un test che duri almeno 20 min). La cappa ha soddisfatto i requisiti di classificazione specificata per la pulizia dell'aria se la media delle concentrazioni delle particelle misurate in ognuno dei punti di campionamento non supera i limiti di concentrazione predfiniti. (ISO 14644-1:2015 punto A.6.2.1)"

Al rapporto di verifica devono essere allegati dati macchina dei risultati delle misure.

TARATURA DELLA TEMPERATURA DELLE CAPPE

La taratura delle cappe prevede la misurazione della temperatura del piano riscaldato nonché degli eventuali termoblock porta provette presenti.

La taratura deve essere fatta *periodicamente*, con uno strumento di riferimento certificato.

La frequenza con la quale deve essere effettuata la taratura del piano riscaldato dipende principalmente dalla quantità di lavoro.

MICROSCOPI

Vengono utilizzati **microscopi ottici a contrasto di fase** per la visualizzazione dei gameti maschili. Tale microscopio deve essere equipaggiato con obiettivi progressivi che raggiungano almeno un ingrandimento di 400X.

Oltre al microscopio ottico a contrasto di fase, vengono utilizzati:

- **stereomicroscopio** per lo screening degli ovociti e altre tecniche di fecondazione (FIVET)
- **invertoscopio con un micromanipolatore** per effettuare le tecniche di micromanipolazione (es. ICSI, biopsia embrionaria, ecc.), e per la valutazione degli ovociti ed embrioni. Il microscopio invertito usato per la PMA deve essere inoltre dotato di un **inserto riscaldato** dove viene riposto il campione per garantire che lo stesso sia esposto ad una corretta temperatura durante la lavorazione e l'osservazione.

Per ottenere risultati ottimali nell'osservazione ed eventualmente nella microfotografia, è fondamentale la perfetta pulizia del sistema ottico dei microscopi utilizzati.



Si consiglia:

- **Di rimuovere prima dell'utilizzo la polvere dalle lenti degli oculari e del condensatore utilizzando un apposito soffietto.**
- **Di allineare tutte le lenti che compongono il sistema ottico del microscopio per consentire una corretta visione del campione.**

QUALIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DEI MICROSCOPI



L'esito di ogni manutenzione effettuata (ordinaria, programmata, o straordinaria) deve essere opportunamente registrato nel logbook del microscopio. Tutti gli strumenti utilizzati per effettuare le manutenzioni del microscopio (es. termometro) devono essere tarati da un laboratorio di taratura accreditato e devono essere corredati del relativo certificato di taratura valido.

QUALIFICA DEI MICROSCOPI

- Verificare la presenza di tutti i componenti
- Tarare il piano riscaldato
- Controllo della lubrificazione delle parti mobili
- Centrazione dei percorsi ottici

MANUTENZIONE DEI MICROSCOPI

La manutenzione ordinaria dei microscopi prevede:

- rimozione della polvere sia dagli oculari che dagli obiettivi usando cartine ottiche
- rimozione di tracce di olio dagli obiettivi usati per immersione, se presenti
- controllo della lubrificazione delle parti mobili
- taratura del piano riscaldato

La manutenzione programmata dei microscopi prevede:

- centratura ed allineamento delle ottiche
- verifica della sicurezza elettrica dell'apparecchiatura



Si consiglia di coprire il microscopio quando non in uso per evitare danni alle lenti.

MICROMANIPOLATORI

Il micromanipolatore è un dispositivo che viene utilizzato per le tecniche di micromanipolazione dei gameti (ICSI) e degli embrioni (Biopsia). Per queste tecniche è necessario raggiungere un tale livello di precisione dei movimenti che non può essere realizzato a mano libera.

In base al meccanismo di funzionamento esistono differenti tipi di micromanipolatori:

- Idraulico
- Meccanico
- Elettrico

I micromanipolatori utilizzati in PMA sono principalmente:

MICROMANIPOLATORE IDRAULICO

Con questo strumento l'operatore è in grado di muovere avanti e indietro il pistone di un cilindro e questi movimenti vengono trasmessi dallo spostamento di un liquido (olio) tra cilindri idraulici di diverso diametro. Per il corretto funzionamento di questo dispositivo è fondamentale che tutto il sistema sia riempito d'olio e che non ci siano bolle d'aria.



Si consiglia di controllare la continuità di olio presente nel circuito prima di ogni procedura.

MICROMANIPOLATORE ELETTRICO

Con questo strumento l'operatore agisce tramite un apposito joystick che trasforma i movimenti di una leva in una serie di segnali elettrici che consentono di controllare degli attuatori meccanici.

MICROMANIPOLATORE MECCANICO

I movimenti vengono trasmessi direttamente dai joystick agli holder porta aghi, attraverso dei sistemi meccanici. Manutenzione ordinaria dei **micromanipolatori idraulici**

- Prima di cominciare una nuova procedura riportare in posizione centrale l'indicatore di posizione del micromanipolatore lungo tutti e tre gli assi di riferimento.

Manutenzione programmata dei **micromanipolatori idraulici**:

- controllo annuale del sistema idraulico con cambio totale dell'olio
- pulizia periodica di tutte le componenti e rimozione della polvere.

INCUBATORI



È obbligatorio l'utilizzo di almeno due incubatori per ciascun laboratorio PMA.



Ma è altamente consigliabile adattare il numero di incubatori al tipo e frequenza delle procedure effettuate. È generalmente indicato almeno un incubatore da circa 50 Litri ogni 100 cicli di trattamento PMA di II/III livello annui.

L'incubatore è uno strumento che simula le condizioni fisiologiche di temperatura e microambiente. Il controllo della temperatura è affidato ad un termostato, quello dell'umidità a vaschette o flask riempite con acqua sterile. Il pH del mezzo di coltura, invece, viene regolato in maniera indiretta attraverso la percentuale di CO₂ immessa nell'incubatore.

La maggior parte dei mezzi di coltura di uso comune sono formulati con bicarbonato di sodio, che dissociandosi in soluzione acquosa, aumenta la concentrazione di ioni idrogeno nel mezzo, diminuendone il pH.

Accrescendo la percentuale di CO₂ dell'atmosfera dell'incubatore, la concentrazione degli ioni idrogeno viene indirettamente controllata attraverso il bilanciamento della reazione di dissociazione del bicarbonato.

Questo sistema tampone viene comunemente utilizzato nelle colture cellulari. Per questo motivo gli incubatori tradizionali sono provvisti di appositi sistemi che consentono di impostare e controllare la percentuale di CO₂ desiderata a seconda del pH finale richiesto.

È molto importante, dunque, controllare periodicamente la percentuale di CO₂ immessa in incubatore.

È stato messo in evidenza che in un incubatore tradizionale l'elevata percentuale di O₂ rispetto alle condizioni fisiologiche, potrebbe esporre gli ovociti e gli embrioni a condizioni di coltura sub-ottimali, soprattutto per la presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Biggers, 2001; Summers and Biggers, 2003).

Questo ha portato all'avvento di incubatori, che prevedono il controllo dei tre gas principali dell'aria atmosferica, quali N₂, O₂, e CO₂ (o che usano miscele certificate di gas).

QUALIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DEGLI INCUBATORI



Al momento dell'installazione deve essere effettuata la qualifica dell'incubatore. Deve essere predisposto un piano di manutenzione. L'esito della qualifica e di ogni manutenzione effettuata (ordinaria, programmata, o straordinaria) deve essere opportunamente registrato nella modulistica dell'incubatore. Tutti gli strumenti utilizzati per effettuare le qualifiche/manutenzioni degli incubatori (es. termometro, misuratore CO₂, O₂, pH-metro, ecc.) devono essere tarati e devono essere corredati del relativo certificato valido di taratura, rilasciato da un laboratorio accreditato alla taratura del parametro considerato. Tutti i parametri critici (temperatura, composizione dei gas) devono essere sottoposti a verifiche regolari. Inoltre, gli incubatori devono essere collegati alla continuità elettrica garantita da UPS e gruppo elettrogeno.



Sono raccomandati scambiatori automatici per le bombole dei gas e allarmi adeguati a garantire il pronto intervento in caso di guasto (esempi: sistemi per la remotizzazione degli allarmi - in caso di corto circuito, o per deviazioni dai parametri di incubazione).

TIPOLOGIE DI INCUBATORI

Gli incubatori a controllo esclusivo di CO_2 consentono di regolare il pH dei mezzi di coltura, è dunque preferibile impostare generalmente la concentrazione di questo gas intorno al 6%. L'erogazione del gas agli incubatori avviene attraverso una rampa, la quale termina con un rubinetto dotato di manometro che serve a regolare la pressione del gas distribuito agli incubatori.

La pressione di erogazione, il cui valore si aggira generalmente intorno ai 0.3-1.5 bar, è molto importante per il corretto funzionamento dello strumento e per la sua messa a punto si deve far riferimento alle indicazioni del produttore riportate nel manuale di utilizzo.

Un'altra tecnologia di incubatori permette di poter controllare anche la concentrazione di ossigeno presente nell'incubatore. Gli incubatori che si avvalgono di questa tecnologia sono gli incubatori a controllo della CO_2 e O_2 , e sono dotati di due vie di accesso dei gas, una alimentata dalla CO_2 , mentre l'altra alimentata dall'azoto (N_2). Solitamente si cerca di utilizzare una concentrazione di O_2 di circa $6,0 \pm 1,0\%$.

Altri incubatori utilizzano un afflusso di gas pre miscelati, in modo da poter essere sicuri all'origine che le proporzioni dei

diversi tipi di gas siano quelle desiderate. Per questa ragione è importante che la ditta fornitrice dei gas munisca ogni bombola di gas pre miscelato di un certificato che attesti che le proporzioni siano quelle desiderate e ne garantisca l'assoluta purezza.

Questa tecnologia è utilizzata da alcuni incubatori da banco, che utilizzano alloggiamenti per le dish di dimensioni molto ridotte, in modo da ottimizzare i tempi di recupero delle giuste condizioni di coltura dopo ogni apertura degli sportelli.



Numerosi studi hanno dimostrato che la coltura di ovociti ed embrioni a basse concentrazioni di O₂ ha degli effetti positivi a lungo termine rispetto alla coltura con concentrazioni di ossigeno atmosferico (Harlow and Quinn, 1979; Batt et al., 1991; Yuan et al., 2003; Karja et al., 2004; Leoni et al., 2007; Meintjes et al., 2008, Gardner 2016). Per questa ragione si consiglia l'utilizzo di incubatori tri gas, pur non essendo espressamente richiesto nei requisiti minimi.

Si consiglia inoltre di evitare il sovraccarico dell'incubatore, al fine di lasciare sufficiente spazio per permettere la circolazione dell'aria, oltre che per ridurre la frequenza di apertura delle porte in modo da perturbare il meno possibile il microambiente.

Manutenzione ordinaria degli incubatori:

- Rilevare i parametri critici ed effettuare registrazione giornaliera di temperatura e concentrazione dei gas
- Laddove non fosse disponibile un datalogger che registri quotidianamente ed in maniera automatica i parametri cri-

tici riportati sul display, occorre controllare e annotare i valori di temperatura e di percentuale di CO₂ e di O₂ visibili sul display, semplicemente verificando i valori indicati dal termometro/sonde in dotazione all'apparecchiatura. Questa operazione non deve essere confusa con la taratura dei parametri critici, discussa in seguito.

Manutenzione programmata degli **incubatori**:

- Pulizia, decontaminazione e rimozione della polvere dal sistema di ventilazione (da effettuare almeno semestralmente).
- Sostituzione e/o pulizia delle vaschette d'acqua (da effettuare almeno *mensilmente*)
- Sostituzione filtri *Hepa* (da effettuare come da indicazioni della ditta fornitrice)
- Qualora presenti, sostituzione filtri al carbonio attivo (da effettuare come da indicazioni della ditta fornitrice)
- Controllo degli allarmi per i parametri di temperatura, CO₂ e O₂
- Verifica della sicurezza elettrica dell'apparecchiatura
- Controllo del pH

TARATURA DEGLI INCUBATORI

La taratura degli incubatori prevede il controllo di tutti i parametri critici quali temperatura, CO₂ e O₂:

- Tarare i parametri settati mediante l'utilizzo di strumenti di supporto (termometro, misuratore CO₂/O₂), con frequenza che dipende dalla quantità di lavoro e dalle caratteristiche dell'incubatore.
- Registrare i valori nell'apposita scheda logbook (Allegato 4). I valori di esercizio sono generalmente (e a titolo esemplificativo) i seguenti:

Temperatura: $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

CO₂: $6 \pm 0,5\%$

O₂: $6 \pm 1,0\%$



L'intervallo di tolleranza della temperatura degli incubatori dipende dalle caratteristiche dell'attrezzatura ed è un parametro predefinito per la qualità del prodotto.

La tolleranza per questi parametri è un valore critico da stabilire in funzione delle condizioni fisiologiche cui si tende.



Per quanto riguarda la temperatura, dal momento che anche piccole variazioni sono riconosciute come cause di effetti dannosi per i gameti e gli embrioni, è obbligato utilizzare un incubatore con specifiche di accuratezza e precisione elevate adeguate alla qualità del prodotto predefinita.



L'incertezza del termometro di riferimento (utilizzato per la taratura della temperatura dell'incubatore), aggiunta all'incertezza dell'incubatore, costituirà l'errore complessivo dell'incubatore (o incertezza e questo dovrebbe essere circa 1/3 dell'intervallo di tolleranza dell'incubatore).

Quindi tanto più stretto è l'intervallo di tolleranza dell'incubatore (qui per la grandezza temperatura), tanto più piccola deve essere l'incertezza dell'incubatore determinata tramite taratura (e di conseguenza anche più accurato il termometro di riferimento).

La percentuale di CO₂ deve essere funzionale al raggiungimento del pH desiderato, cui contribuiscono diversi parametri quali il tipo di terreno di coltura utilizzato e la temperatura, ed è per questo che la tolleranza della percentuale di questo gas deve essere stabilita in base alle caratteristiche generali di ciascun sistema di coltura. Per quanto riguarda la tolleranza della percentuale di O₂ è importante ricordare che nonostante sia riconosciuto il vantaggio di effettuare la coltura con basse concentrazioni di questo gas, non è ancora del tutto chiaro il valore ideale oltre il quale non bisogna spingersi. Questo comporta che la tolleranza può avere un margine molto più ampio (5 ÷ 7%).



Si consiglia di programmare la taratura della temperatura degli incubatori almeno mensilmente all'inizio dell'attività per poi passare eventualmente, con risultati stabili all'interno dei range di tolleranza, ad una verifica quadrimestrale, in base anche alla vetustà dello strumento, all'utilizzo e ai risultati ottenuti nelle precedenti verifiche di taratura. Si ricorda di utilizzare solo strumenti di riferimento con certificati di taratura validi.

L'incertezza di taratura espressa dall'accuratezza e dalla precisione, definisce l'intervallo intorno al risultato medio delle misurazioni che contiene il valore vero.



Lo strumento di riferimento adottato per effettuare una taratura deve avere un'incertezza di misura uguale o minore a quella dell'incubatore.

- La misurazione della percentuale di CO₂ è un metodo indiretto per attestare il pH del mezzo di coltura in uso, si raccomanda di valutare il pH anche con metodo diretto soprattutto nel caso di incubatori che utilizzano gas premiscelati. È stato, infatti, dimostrato che talvolta variazioni della percentuale di CO₂ non si ripercuotono immediatamente sul valore reale del pH del mezzo di coltura (Pool, 2004)
- Si ricorda che i fattori che determinano la frequenza di una taratura dipendono dalla criticità dell'apparecchiatura e delle prestazioni da essa fornite, nonché dalla stabilità e dall'uso dell'apparecchiatura.

FRIGORIFERI E CONGELATORI

I frigoriferi necessari per lo stoccaggio ed il mantenimento dei terreni di coltura devono essere caricati in modo che l'aria circoli liberamente, in modo da mantenere all'interno una temperatura uniforme in cui il valore sia dentro il range predefinito.

MANUTENZIONE DELLE APPARECCHIATURE: FRIGORIFERI E CONGELATORI

Devono essere effettuate con cadenza *annuale* le seguenti operazioni di manutenzione ordinaria:

- rimozione della polvere dalle piastre esterne di aerazione
- sbrinamento
- pulizia e decontaminazione dell'interno dei frigoriferi e dei congelatori
- verifica della sicurezza elettrica.

TARATURA DELLE APPARECCHIATURE: FRIGORIFERI

Controllare inoltre i termometri permanenti installati su frigoriferi e congelatori confrontandoli con un termometro cam-

pione di riferimento tarato da un laboratorio di taratura accreditato verificando:

- La taratura della temperatura eseguendo il controllo sui diversi ripiani del frigorifero o del congelatore.
- Effettuare la registrazione dei dati sull'apposito *logbook*.

BAGNI TERMOSTATICI

I bagni termostatici sono requisiti minimi per laboratori di PMA di primo livello.

Manutenzione ordinaria dei **bagni termostatici**

- Controllo prima dell'utilizzo, del livello del liquido
- Monitoraggio della temperatura del bagno prima dell'utilizzo
- Sostituzione dell'acqua contenuta nella vasca
- Sanificazione della vasca

Manutenzione programmata dei **bagni termostatici**

- Taratura della temperatura
- Verifica sicurezza elettrica

TARATURA DELLE APPARECCHIATURE: BAGNI TERMOSTATICI

- Controllare i termometri permanenti installati confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato dai Laboratori di taratura accreditato.
- Registrare i valori raccolti nell'apposita scheda *logbook*.

PIPETTATRICI

Le **pipettatrici** possono essere manuali, elettroniche, monocanale o multicanale. Quelle manuali sono le più utilizzate all'interno dei laboratori. Si consiglia l'utilizzo unicamente di puntali monouso.

Inoltre è consigliato:

- mantenere le pipettatrici a temperatura ambiente
- evitare che subiscano urti
- tenerle in posizione verticale
- procedere ad una regolare pulizia, manutenzione
- taratura

DISPENSATORI

Per **dispensatore** si intendono quelle apparecchiature utilizzate per distribuire terreni di coltura e reagenti in:

- provette
- bottiglie
- capsule di Petri.

È opportuno:

- controllare l'accuratezza dei volumi dispensati
- controllare che le parti dell'apparecchio in contatto con essi siano in condizioni asettiche
- mantenere le apparecchiature in perfette condizioni mediante accurata pulizia dopo ogni ciclo lavorativo, in accordo con le indicazioni della ditta costruttrice.

STRUMENTI DI MISURA PER EFFETTUARE LA TARATURA

Come già detto in precedenza i **termometri**, **misuratori CO₂/O₂** e il **pH-metro** utilizzati come strumenti di riferimento in laboratorio devono essere tarati periodicamente mediante confronto con strumenti campione di prima linea in dotazione al Laboratorio Metrologico Accreditato. I termometri devono essere in possesso di certificato a marchio ACCREDIA (o di altro Ente membro dell'*European Accreditation* e facente parte degli Accordi di Mutuo Riconoscimento MLA), emesso da la-

boratori di taratura accreditati. Altri strumenti di riferimento come il misuratore CO₂/O₂ e il pH-metro, per i quali non è disponibile la certificazione ACCREDIA, devono essere tarati da altri laboratori di taratura accreditati con elementi di riferimento certificati, come bombole di CO₂ a percentuale nota per il misuratore CO₂/O₂ o soluzioni tampone per il pH.

TARATURA DELLE APPARECCHIATURE: TERMOMETRI, CO₂/O₂ E PH-METRO

- La taratura di un termometro di riferimento da parte di un ente accreditato con cui effettuare tutte le verifiche su incubatori, piani riscaldati, frigoriferi e congelatori si effettua ogni uno/due anni, al fine di avere sempre uno strumento perfettamente affidabile.
- Anche la taratura di un misuratore di CO₂/O₂ con una miscela nota si effettua in genere ogni uno/due anni.
- La taratura di un pH-metro va effettuata periodicamente utilizzando soluzioni tampone di riferimento secondo le istruzioni della ditta produttrice (ad es., pH 4 e pH 7 a 37°C).
- Le soluzioni tampone vanno conservate nelle migliori condizioni e non oltre la data di scadenza. Le aliquote giornaliere utilizzate devono poi essere scartate dopo la taratura.

Va inoltre controllato periodicamente:

- Lo stato di efficienza degli elettrodi registrando i valori in corrispondenza delle tarature a pH 4 e pH 7. La differenza tra due misurazioni in rapporto al valore teorico indicato dal costruttore rappresenta un indice di invecchiamento dell'elettrodo.
- Gli elettrodi del pH-metro devono essere condizionati e conservati secondo le istruzioni del costruttore. Dopo ogni uso devono essere puliti con acqua distillata.
- Si consiglia inoltre di utilizzare soluzioni tampone certificate.

CONTROLLI MICROBIOLOGICI



È necessario effettuare il controllo microbiologico dei ripiani degli incubatori e delle cappe al fine di garantire sempre la massima pulizia durante le varie fasi di lavorazione.

CONTROLLI MICROBIOLOGICI DELLE CAPPE

I controlli microbiologici di una cappa si effettuano con due tipi di piastre riempite con agar per la crescita di funghi miceti e batteri: quelle da contatto e quelle a sedimentazione.

PIASTRE DA CONTATTO

L'utilizzo delle piastre da contatto prevede per l'appunto il contatto diretto per alcuni secondi del terreno agar con la superficie del piano della cappa. Al termine di questa operazione le piastre vengono incubate in un termostato a 37° C per 2-3 giorni, dopo di che si procede alla valutazione visiva di eventuali colonie presenti nella piastra. Un altro metodo prevede una prima incubazione di 3-5 gg a 20-25° C seguita da una seconda incubazione della stessa piastra a 30-35° C per altri 2-3 gg: questo metodo è sufficiente per rilevare la maggior parte di batteri e funghi.

PIASTRE DA SEDIMENTAZIONE

L'utilizzo delle piastre a sedimentazione è utile al fine di monitorare l'eventuale presenza di contaminanti circolanti nell'area di lavoro della cappa. Si monitorano in genere 4 ore di lavorazione durante le quali le piastre a sedimentazione ven-

gono posizionate ai lati del piano della cappa. Al fine di evitare l'eccessiva disidratazione del terreno di coltura batterico presente nelle piastre, queste vengono generalmente esposte per un massimo di due ore; ne risulta che per poter monitorare 4 ore di lavorazione sotto cappa sono necessarie almeno due piastre per ciascun punto.

Anche in questo caso dopo 24h di incubazione si procede alla ricerca di colonie presenti nel terreno.

CONTROLLI MICROBIOLOGICI DEGLI INCUBATORI

È necessario effettuare controlli microbiologici sui ripiani degli incubatori.

L'utilizzo di tamponi, preinumiditi mediante una soluzione fisiologica sterile o un terreno liquido di risciacquo sterile, è da preferirsi alle piastre da contatto per evitare di lasciare residui di agar all'interno dei ripiani, che potrebbero involontariamente favorire la crescita di diversi agenti contaminanti. I tamponi vengono poi esaminati tramite coltura su piastre.



- **Si consiglia di indossare sempre guanti sterili prima di maneggiare le piastre per evitare possibili contaminazioni delle stesse**
- **È consigliabile un'accurata pulizia delle superfici venute a contatto con le piastre di agar al fine di rimuovere gli eventuali residui di terreno presenti sulla superficie delle cappe**
- **La superficie di contatto col tampone deve essere di ~ 25 cm², il risultato così ottenuto può essere espresso in ufc/piastra.**

PIANIFICAZIONE DELLE ATTIVITÀ

Visto l'enorme lavoro che richiede la gestione delle apparecchiature in un laboratorio di PMA, la corretta pianificazione delle manutenzioni, delle tarature e della sorveglianza degli strumenti costituisce un requisito fondamentale. È necessario quindi disporre di un piano di manutenzione per tutte le apparecchiature.

MISURAZIONE DEI PARAMETRI CRITICI DISPOSITIVI IN RETE PER LA MISURAZIONE DEI PARAMETRI CRITICI E ALLARMI

È oggi possibile effettuare la rilevazione *in continuum* dei parametri critici degli strumenti mediante l'utilizzo di *datalogger* (posizionati all'interno degli incubatori, frigoriferi, contenitori di azoto liquido) costituiti da una o più sonde elettroniche collegate ad una centralina, che memorizzi le misure di uno o più parametri effettuate ad intervalli di tempo opportunamente stabiliti. Questi sistemi permettono la misurazione, l'elaborazione, la comunicazione e la registrazione dei valori dei sensori. Nel caso in cui i valori registrati non siano dentro i range di tollerabilità, tali sistemi devono inviare allarmi in modo da permettere un'immediata azione correttiva da parte degli operatori coinvolti.

I *datalogger* possono essere:

- Sensore di livello per l'azoto liquido
- Livello del liquido nel tank
- Sensori di temperatura nei tank
- Sensori di temperatura per incubatori e frigoriferi
- Sensori di livello per la CO₂
- Sensori di livello per O₂

- Sensori di temperature degli ambienti
- Umidità dell'ambiente
- Pressione dell'ambiente
- Sensori di movimento e presenza

I sistemi di allarme sono diversi e possono essere acustici e/o visivi, e devono preferibilmente essere collegati con la rete telefonica in modo da poter allertare il personale responsabile. Tali sistemi possono essere già presenti all'interno degli strumenti, come ad esempio gli allarmi acustici che avvisano in caso di apertura prolungata degli incubatori, oppure visivi come gli allarmi luminosi in dotazione di alcuni incubatori che avvisano quando il livello dell'umidità relativa è troppo basso.



Il funzionamento di tutti i sistemi di allarme sopradescritti deve essere periodicamente verificato e registrato.

MODULISTICA

Ogni informazione utile e operazione effettuata su uno strumento, quale la provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e il range di tolleranza e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica devono essere documentati e annotati su un apposito modulo "**Scheda apparecchiatura**", specifico per quello strumento, che deve sempre riportare il numero di inventario. Dovrà inoltre essere predisposta una "**Scheda di Manutenzione**" che riporti tutte le operazioni effettuate relative alla verifica, alle sostituzioni, alla pulizia con

la data di svolgimento dell'operazione e la firma del tecnico che l'ha effettuata. Dovrà essere prevista inoltre una **"Scheda di Taratura"** su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, i limiti di accettabilità, il programma di taratura, la data di svolgimento della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per il controllo (di cui si allega fotocopia del certificato di taratura). Qualora la taratura venga attuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente. Un'apparecchiatura che, a seguito di taratura, abbia rilevato una non idoneità al suo utilizzo, dovrà essere aggiustata o messa fuori servizio o declassata per altri usi non critici. L'evento dovrà essere segnalato apponendo un'etichetta visibile sull'apparecchiatura e la data in cui l'evento è stato rilevato. L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a quando la riparazione, la ri-qualifica e la taratura di nuovo effettuata non dimostrino la messa in funzione dello strumento. L'evento dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

BIBLIOGRAFIA

1. Biggers JD. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod Bio Med Online*. 2001;4:30-8.
2. Brinster RL. In vitro cultivation of mammalian ova. *Adv Biosci*. 1969;4:199-233.
3. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J Exp Zool*. 1965;158:49-58.
4. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 così come modificato dal D. Lgs. 85/2012 "Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la dis-

- tribuzione di tessuti e cellule umani" pubblicato nella Gazzetta Ufficiale del 18 febbraio 2010, n. 40.
5. Decreto Legislativo 6 novembre 2007 "Attuazione della Direttiva 2004/23/EC per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani".
 6. European Union. Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing.
 7. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. Official Journal of the European Union 2006:L38/40.
 8. European Union. Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing.
 9. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. Official Journal of the European Union 2006:L294/32.
 10. European Union. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 'On setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissue cells'. Official Journal of the European Union 2004:L102/48.
 11. Gardner DK. The impact of physiological oxygen during culture, and vitrification for cryopreservation, on the outcome of extended culture in human IVF. *Reproductive Biomedicine Online*. 2016;32:137-141.
 12. Good Manufacturing Practice. 2008-Vol.4 – Annex 1; EU G.M.P
 13. Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, De Vos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, van Inzen W. Guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*. 2000;15:2241-2246.
 14. Harlow GM, Quinn P. Foetal and placental growth in the mouse after pre-implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5% and 20%. *Austr J Biol Sci*. 1979;32:363-369.
 15. Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology*. 2004;62:1585-1595.
 16. Legge n. 40/2004 "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita". Gazzette Ufficiale n.45 del 24 febbraio 2004.
 17. Leoni GG, Rosati I, Succo S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. *Reprod Domestic Anim*.

- 2007;42:299-304.
18. Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L for Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod.* 2008;23:1253-1262.
 19. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madde JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live birth in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Repr.* 2009;24:300-307.
 20. Norma ISO/IEC17025:2005 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura. UNIEN30012-1:1993 "Requisiti di assicurazione della qualità relativa agli apparecchi per le misurazioni. Sistema di conferma metrologica di apparecchi per misurazioni".
 21. Pool TB. Optimizing pH in clinical embryology. *Clin Embryol.* 2004;7:1-17.
 22. Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update.* 2003;9:557-82.
 23. WHO. Manuale di sicurezza nei laboratori. AIREPSA 2005.
 24. Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology.* 2003;59:1585-1596.

CAPITOLO 6

LO STOCCAGGIO IN AZOTO LIQUIDO

PRINCIPI GENERALI

L'applicazione delle tecniche di crioconservazione di cellule e tessuti e la gestione dei campioni crioconservati nell'ambito della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) sono regolate dalle seguenti norme: Legge 40/2004 e relative Linee Guida, Decreto Legislativo 191/2007 e Decreto Legislativo 16/2010 (così come modificato dal D. Lgs. 85/2012), Decreto Legislativo 81/08.

Le "Linee Guida per la sala criobiologica di un istituto dei tessuti" 2014 definiscono le caratteristiche organizzative, strutturali e tecnologiche che la sala criobiologica deve possedere al fine di garantire il più alto livello di Qualità e Sicurezza delle cellule e tessuti crioconservati finalizzati all'uso clinico e il più alto livello di Sicurezza per il personale addetto.

INDICE

- **Introduzione**
- **Approccio organizzativo delle biobanche**
 - **Requisiti strutturali ed impiantistici della sala criogenica**
 - **Strumenti di stoccaggio e gestione campioni**
 - **Norme comportamentali**
- **Problematiche relative alla sicurezza del campione**

STOCCAGGIO IN AZOTO LIQUIDO

Normative di riferimento per la gestione della sala criogenica nei centri di PMA

L. 40/2004
D.Lgs. 191/2007
D.Lgs. 16/2010
D.Lgs. 81/08

Requisiti strutturali ed impiantistici

- Descrizione dei Requisiti strutturali minimi secondo "Linee Guida per la sala criobiologica di un istituto dei tessuti" 2014

Strumenti di stoccaggio e gestione dei campioni

- Caratteristiche dei dewar per lo stoccaggio
- Aspetti relativi alla gestione e sicurezza dei campioni
- Procedure specifiche

Norme comportamentali

- Descrizione di norme comportamentali per la sicurezza dei campioni e del personale
- Formazione del personale dedicato
- Procedure specifiche

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni le metodiche di crioconservazione hanno acquisito sempre maggior valenza nel trattamento dell'infertilità, determinando un aumento delle *chance* di successo e rappresentando una strategia per la preservazione del potenziale riproduttivo.

Tali tecniche trovano applicazione nell'ambito della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) per la salvaguardia dei singoli gameti, embrioni e tessuti gonadici.

La trasposizione delle Normative Europee nella Legislazione Italiana, ha comportato l'emanazione di obblighi e requisiti specifici per le condizioni di stoccaggio e per tutti i procedimenti ad esse connessi al fine di garantire il più alto livello di Qualità e Sicurezza delle cellule e tessuti trattati.



In particolare, per quanto concerne la crioconservazione di gameti, embrioni e tessuti gonadici umani le disposizioni in vigore prevedono che:

- i centri di 1° livello possono eseguire solo la crioconservazione e stoccaggio dei gameti maschili, mentre i centri di 2° e 3° possono eseguire la crioconservazione e stoccaggio dei gameti maschili, femminili, embrioni e tessuti gonadici;
- ogni centro di PMA autorizzato e/o accreditato dalle Regioni a svolgere tecniche di fecondazione *in vitro* deve dotarsi delle apparecchiature e strumentazioni adeguate per applicare le migliori tecniche di crioconservazione e scongelamento di gameti, zigoti ed embrioni;
- gli ambienti per la crioconservazione devono presentare adeguate caratteristiche strutturali e di sicurezza ed essere

dedicati allo svolgimento di tale attività specifica; l'accesso in tali aree deve essere consentito solo a personale qualificato e formalmente autorizzato;

- devono essere presenti procedure operative scritte per ogni fase di utilizzo delle cellule e dei tessuti crioconservati;
- in ogni centro devono essere presenti appropriate misure di sicurezza e specifiche procedure d'emergenza al fine di garantire la qualità e integrità dei campioni e la salvaguardia del personale.
- le strutture che offrono il servizio di criopreservazione dei gameti, tessuti gonadici ed embrioni devono perseguire il mantenimento di un contatto con i soggetti donatori cui appartengono onde informarli dell'eventuale approssimarsi della data di scadenza della conservazione.

La presenza di un Sistema Gestione Qualità (SGQ) ben strutturato (D.Lgs. 191/07, Art.16), è fondamentale per il raggiungimento della piena conformità con le norme tecniche e le leggi cogenti applicabili. Documentate procedure operative che definiscono e descrivono ciascuna fase di lavorazione, garantiscono la standardizzazione e la sicurezza di tutte le attività correlate allo stoccaggio.

Un'appropriate analisi proattiva del processo e una documentata valutazione dei rischi, consente la minimizzazione e la prevenzione di possibili eventi avversi; l'identificazione dei parametri critici, delle apparecchiature critiche e di specifici indicatori di *performance*, offre una gestione controllata delle biobanche ed un continuo miglioramento dei risultati (1).

APPROCCIO ORGANIZZATIVO DELLE BIOBANCHE

REQUISITI STRUTTURALI ED IMPIANTISTICI

Per garantire la gestione in sicurezza dell'azoto liquido (gas compresso, criogeno) sono state definite specifiche caratteristiche strutturali, impiantistiche e tecnologiche per i locali dedicati allo stoccaggio dei campioni crioconservati.



La sala criobiologica deve presentare i seguenti requisiti strutturali e impiantistici (Fig. 1):

- deve essere fisicamente isolata da altri locali o luoghi di lavoro e deve avere dimensioni adeguate (è consigliabile per gestire e stoccare azoto liquido un locale con volume non inferiore a 20 m³);
- devono essere presenti spazi sufficienti per la movimentazione dei contenitori di azoto, dei campioni e del personale; a tal fine è consigliabile che lo spazio di manovra sia pari almeno alle dimensioni del contenitore criogenico più grande;
- deve essere asciutta, fresca, ben ventilata e priva di sorgenti di calore; dotata di un sistema di trattamento dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura tra i 18 e i 25° C e dell'umidità tra il 40% e il 55% per evitare la condensazione sulle parti più fredde dell'impianto criogenico e la deposizione di ghiaccio all'interno dei serbatoi di stoccaggio;
- l'accesso alla sala criobiologica deve avvenire attraverso una porta, la cui dimensione della luce netta non deve essere inferiore alle dimensioni del più grande dei contenitori in essa contenuto;

- la porta di accesso deve essere a tenuta o devono essere previsti dispositivi per impedire lo spandimento del gas in fase liquida o gassosa all'esterno del locale e deve essere con apertura antipanico nel verso dell'esodo;
- deve essere possibile visionare l'interno della sala criobiologica attraverso una visiva posizionata sulla porta di accesso o tramite altra modalità di visione (es. pareti con vetrate, telecamere con monitor esterno);
- deve essere presente un sistema per il monitoraggio (manuale o automatico) degli accessi al locale ed è raccomandata la registrazione dello storico degli stessi;
- i pavimenti e i rivestimenti (almeno fino ad un'altezza di 1,80) devono essere tra loro raccordati, impermeabili, facilmente sanificabili e resistenti alle basse temperature;
- devono essere presenti rilevatori ambientali di ossigeno (ossimetri), posti ad un'altezza non superiore a 1,5 m (o comunque al di sotto delle vie respiratorie degli operatori) per il monitoraggio continuo della concentrazione di ossigeno presente all'interno del locale;
- la centralina di rilevazione degli ossimetri deve permettere la visualizzazione del valore rilevato e deve essere posizionata all'esterno della sala, nelle immediate vicinanze dell'ingresso, in modo tale che il controllo avvenga in area sicura;
- deve essere presente un allarme acustico-visivo che si attiva nel caso in cui si verifichi un abbassamento della concentrazione di ossigeno nel locale e la centralina deve prevedere almeno due soglie di allarme: una alla concentrazione di ossigeno del 19%, l'altra al 18%;
- deve essere prevista una ripetizione dell'allarme (remotiz-

zazione), almeno per la seconda soglia di allarme, o in un luogo presidiato 24 ore su 24 (ad es.: centrale operativa) che consenta di avvertire il personale addetto ed eventualmente i servizi di emergenza e/o di assistenza sanitaria, o direttamente presso gli operatori;

- l'attivazione dell'allarme acustico-visivo deve automaticamente mettere in funzione un sistema di ventilazione forzata dell'ambiente e, al raggiungimento della soglia del 18% di ossigeno, dovrebbe anche comportare la chiusura della valvola di radice della linea sottovuoto ove presente e l'interruzione del rifornimento di azoto in caso di un sistema di riempimento automatico;
- il sistema di ventilazione forzata deve essere del tipo "a tutta aria esterna" e deve assicurare almeno 6 ricambi/ora in condizioni normali ed un ricambio ottimale di 25 ricambi/ora, comunque non inferiore a 20, in caso di allarme per rilevazione di una condizione di sotto ossigenazione; deve poter essere avviato anche manualmente dall'operatore (per esempio durante le attività di riempimento manuale dei contenitori criobiologici);
- deve essere disponibile un impianto di rilevamento incendio in grado di individuare e segnalare la presenza di un incendio all'interno della sala;
- deve essere presente un impianto elettrico e di illuminazione conforme alle norme tecniche in materia;
- apparecchi o impianti elettrici critici presenti nella sala criobiologica dovranno essere costantemente alimentati anche in caso di interruzione dell'erogazione di corrente attraverso collegamento a gruppo elettrogeno o a gruppo statico di continuità (UPS – *Uninterruptible Power Supply*);
- la sala criobiologica deve essere circoscritta e delimitata da

segnaletica di sicurezza, di prescrizione, di avvertimento e di divieto di accesso alle persone non autorizzate, previsti dalla normativa vigente e poste in posizione ben visibile;

- all'interno del locale insieme alla cartellonistica prevista, dovrà essere sempre esposta e facilmente consultabile la scheda di sicurezza del liquido criogenico utilizzato fornita dalla stessa ditta produttrice;
- l'impiantistica di sicurezza (sistemi di allarme acustico e visivo, il funzionamento delle sonde e della ventilazione forzata) deve essere posta a monitoraggio periodico con manutenzione preventiva semestrale;

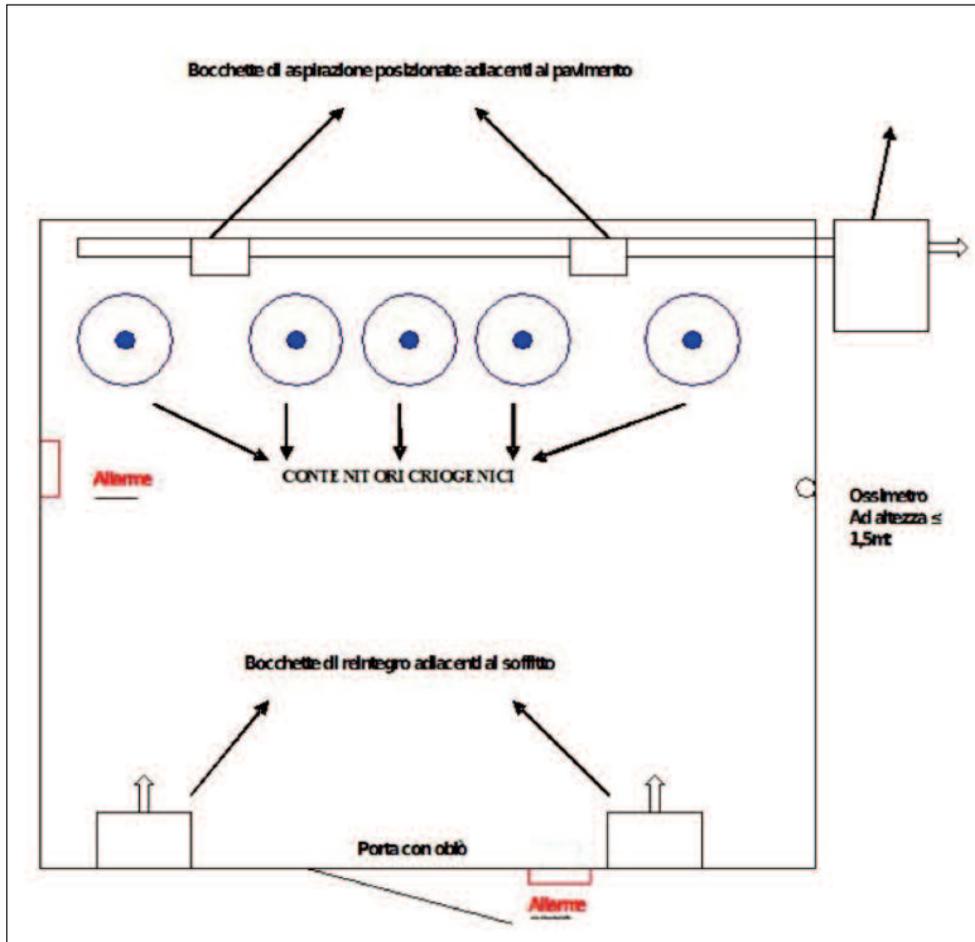


Fig. 1
Piantina di una sala criobiologia

- la sala di criobiologia destinata allo stoccaggio non è un locale classificato; qualora tale stanza si aprisse nel laboratorio di grado D, deve essere classificata D anch'essa, preferibilmente con un ΔP più basso (circa $\frac{1}{2}$ rispetto la ΔP del laboratorio).

STRUMENTI DI STOCCAGGIO E GESTIONE CAMPIONI

La condizione di stoccaggio più comunemente utilizzata nei laboratori di PMA consiste nel mantenimento dei campioni biologici a temperature criogeniche ($-196^{\circ} C$), immersi in azoto liquido in criocontenitori dedicati allo stoccaggio (o *Dewar*).

I *Dewar* sono caratterizzati dalla presenza di aree sotto vuoto che separano le pareti interne del contenitore da quelle esterne, consentendo l'isolamento termico tra il contenuto e l'ambiente; quelli più utilizzati nei nostri laboratori sono in alluminio a riempimento e rabbocco manuale, leggeri e compatti, caratterizzati da un basso tasso di evaporazione statica ed un minimo consumo di azoto liquido garantendo una medio-alta capacità di stoccaggio (Fig. 2).

Tuttavia, diverse tipologie di *Dewar* possono essere presenti nella sala criobiologica, a seconda della progettazione della sala stessa: criocontenitori a rifornimento automatico (Fig. 3 A) se il rifornimento di azoto è tramite sistema automatizzato, e/o criocontenitori a riempimento e rabbocco manuale (Fig. 3 B) nel caso in cui il riempimento e rabbocco è eseguito manualmente; in quest'ultimo caso, il rifornimento può essere effettuato anche tramite criocontenitori pressurizzati specifici per il trasporto e la conservazione di azoto liquido (Fig. 3 C).



Fig. 2. Schema strutturale di un contenitore Dewar.

A Design del coperchio per facilitare la manutenzione

B Collo del recipiente resistente che riduce le perdite di azoto

C Sistema di ritenzione chimica del vuoto che fornisce una prestazione superiore per tutta la vita del prodotto

D Contenitore in alluminio a basso peso e ad elevata resistenza

E Intercapedine isolante che garantisce la massima prestazione termica



Fig. 3 A, B, C. Diverse tipologie di contenitori Dewar per lo stoccaggio in azoto liquido.



Le operazioni manuali di riempimento e rabbocco possono essere effettuate nella sala criogenica o comunque in locale attiguo con le stesse caratteristiche di sicurezza.



È obbligatorio disporre di sistemi e/o procedure che garantiscano il monitoraggio continuo delle condizioni di stoccaggio e consentano la registrazione delle operazioni di rabbocco.

Nel caso in cui non sia disponibile un sistema informatizzato sul controllo delle condizioni di stoccaggio, possono essere utilizzate semplici schede di registrazione che diano evidenza del monitoraggio continuo e delle operazioni eseguite.



Oltre alle dimensioni per lo spazio di manovra, si raccomanda anche di mantenere una distanza minima tra i contenitori di azoto e le pareti della sala (non inferiore a 30 cm) e una distanza minima tra i criocontenitori stessi (non inferiore a 20 cm).



Ciascun criocontenitore dedicato allo stoccaggio dovrà essere univocamente identificato ed etichettato mediante la denominazione del Centro di appartenenza, numerazione (se necessaria) e descrizione del materiale biologico contenuto e dotato di sistemi di chiusura;



è utile siano adeguatamente corredati di maniglie e/o carrello per consentirne, in caso di necessità, il rapido spostamento.

Per far fronte ad eventuali eventi avversi, quali malfunzionamento o necessità di eseguire manutenzione e/o sanificazione di uno di quelli in uso.



è opportuno disporre di un criocontenitore libero ed attrezzato per lo stoccaggio, sempre fornito di azoto.

Benché sia consigliabile pianificare gli interventi di manutenzione e sanificazione in successione, la gestione di tali procedure e la programmazione delle scadenze dipende da variabili quali tipologia e capienza dei criocontenitori e frequenza di apertura; in particolare è necessario tener presente che le scadenze relative agli interventi di manutenzione dipenderanno soprattutto dalla durata di estensione della garanzia (per la tenuta del vuoto presente nell'intercapedine isolante del criocontenitore), dato fornito dalla fabbrica produttrice.



Ogni fase di manipolazione e di stoccaggio dei tessuti gonadici, gameti ed embrioni deve essere registrata; è necessario disporre di un sistema di monitoraggio degli errori, delle non conformità e degli eventi avversi. In particolare, secondo quanto definito dal D. Lgs. 191/2007, devono essere presenti procedure operative scritte per i seguenti processi connessi allo stoccaggio e alla criopreservazione:

- qualificazione del personale per tali tecniche;
- controllo dell'accesso ai contenitori criogenici;
- riempimento dei contenitori criogenici;
- pulizia e manutenzione dei contenitori criogenici;
- localizzazione dei campioni ed eventuale durata della crioconservazione;
- contenitori differenziati per campioni criopreservati contaminati (se applicabile);
- trasporto di campioni contaminati.



I dati identificativi dei soggetti donatori da cui provengono i tessuti gonadici, i gameti e da cui sono stati generati gli embrioni devono essere accuratamente registrati; i campioni devono essere etichettati in modo da non consentire alterazioni non autorizzate e non riconoscibili.

La documentazione dei campioni crioconservati deve includere:

- il numero di ovociti contenuti in ciascun supporto di congelamento e il loro stadio maturativo;
- la concentrazione e motilità pre-congelamento degli spermatozoi contenuti nelle *paillettes*;
- il numero di embrioni contenuti in ogni supporto di congelamento;
- lo stadio dello sviluppo embrionario;
- il numero di supporti crioconservati per ogni paziente;
- i dati specifici relativi alla tracciabilità durante le fasi di manipolazione (lotto di appartenenza dei materiali e terreni venuti a contatto con le cellule ed i tessuti).



Inoltre, al fine di garantire una gestione controllata e sicura, la normativa in materia prevede che ciascun centro abbia una procedura per verificare periodicamente, almeno una volta all'anno, la corrispondenza tra il materiale biologico crioconservato e la relativa documentazione.



Tuttavia, per minimizzare i possibili rischi da in-giurie termiche e/o contaminazione che tale operazione può comportare, la verifica può essere effettuata controllando la correttezza della rintracciabilità e registrazione dei dati quando dobbiamo disporre di un campione da scongelare.

Com'è noto, uno degli obiettivi delle direttive europee è quello di impedire l'eventuale trasmissione di malattie attraverso le tecniche.



Per tale ragione i donatori dovranno eseguire esami sierologici come previsto nel punto 2, Allegato III. del D.Lgs. 16/2010 "Criteri di selezione ed esami richiesti per i donatori di cellule riproduttive".

Nei Centri in cui è prevista la crioconservazione di campioni positivi (o di cui non sia disponibile il risultato) per gli esami sierologici previsti (l'Annex III del D.Lgs. 16/2010 prevede l'obbligo di eseguire esami) sarà necessario disporre di criocontenitori per lo stoccaggio dei campioni negativi, criocontenitori dedicati per le diverse patologie *screenate* e almeno

un criocontenitore dedicato alla "quarantena", dove verranno temporaneamente criopreservati eventuali campioni ancora in attesa dei referti sierologici (Fig. 6).



Fig. 6.

NORME COMPORTAMENTALI



L'accesso alla sala criobiologica deve essere controllato e limitato esclusivamente al personale autorizzato. Devono comunque essere disponibili procedure scritte nelle quali vengano definite le modalità e le condizioni per l'accesso ai locali, sotto il controllo del Responsabile del Centro.

Diversi sono gli aspetti da considerare per quanto concerne la tutela della sicurezza e della salute del personale che opera in tale ambito.



È compito del Responsabile del Centro assicurare l'attuazione degli adempimenti previsti dal D. Lgs. 81/08 e norme correlate.

In particolare ricordiamo che il lavoratore è tenuto ad osservare scrupolosamente i seguenti obblighi:

- osservare disposizioni e istruzioni
- utilizzare correttamente macchine e attrezzature, ecc.
- utilizzare correttamente i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)
- segnalare carenze e condizioni pericolose
- non agire autonomamente in operazioni di manovra che possono comportare rischi
- prendere parte ai programmi formativi e di addestramento previsti dal datore di lavoro
- sottoporsi periodicamente ai controlli sanitari

Nella gestione di un programma di assicurazione della qualità devono essere incluse tutte le procedure e le precauzioni necessarie per il mantenimento di un ambiente di lavoro sicuro; tali procedure devono uniformarsi alla normativa europea, nazionale e locale.

È necessario assicurare l'identificazione e la minimizzazione dei rischi, pur mantenendo un livello di qualità e sicurezza del materiale biologico adeguato allo scopo prefissato (Sez. B, p.5 dell'ASR del marzo 2012).

Tutte le operazioni che contemplano l'utilizzo diretto del-

l'azoto liquido dovranno essere eseguite in sicurezza e specifiche Istruzioni Operative (I.O.) dovranno essere dedicate (es. estrazione campione biologico, rabbocco dei criccontentitori, laddove sia previsto, ecc.).

Tutto il personale coinvolto nelle attività di stoccaggio e in tutte le attività ad esso correlate, deve essere adeguatamente formato.



L'addestramento specifico dovrebbe prevedere l'informazione e la formazione per i rischi relativi alla manipolazione di un liquido criogenico.

I principali rischi legati alla manipolazione dell'azoto sono:

- **ustioni da contatto** con il gas in forma liquida (temperatura -196°C); nel caso che il contatto sia prolungato le lacerazioni possono essere molto gravi in quanto dovute a congelamento dei tessuti
- **lesioni oculari** dovute a contatto con il liquido o vapore criogenico
- **asfissia** dovuta alla presenza del mezzo criogenico in forma gassosa nell'ambiente con conseguente diminuzione della concentrazione di ossigeno presente nell'aria; l'inalazione di vapori a bassa temperature può comportare danneggiamenti ai polmoni.

Per ridurre il rischio da contatto nelle fasi di lavorazione in cui è prevista la manipolazione diretta del gas liquefatto refrigerato, la norma prevede:

L'utilizzo di specifici DPI (Fig. 7) marcati CE:

- occhiali o visiere facciali (Fig. 7 A) per la protezione da spruzzi di liquido criogenico: conforme alla norma EN 166;

- guanti diatermici molto larghi in modo da poterli sfilare facilmente in caso di penetrazione (Fig. 7 B): DPI di II categoria conforme alle norme EN 511;
- paragambo e pantaloni lunghi o tuta contro gli spruzzi alle gambe o altre parti del corpo (Fig. 7 C): DPI di II categoria conforme alle norme EN 511;
- calzari a protezione dei piedi e del polpaccio; quando non vengano indossate calzature completamente chiuse (Fig. 7 D).



Fig. 7.
DPI



Si riporta di seguito un elenco non esaustivo di norme comportamentali specifiche di prevenzione:

- maneggiare sempre l'azoto liquido con la massima cautela;
- tenere il contenitore aperto il minor tempo possibile per evitare il pericolo di condensazione e formazione di gas;
- non toccare con la pelle non protetta tubazioni e recipienti contenenti azoto liquido per ridurre il rischio di ustioni;
- non rovesciare azoto liquido inutilizzato, negli scarichi o sul pavimento;
- utilizzare esclusivamente acqua calda per sbloccare valvole congelate;

- indossare idonei DPI;
- raccogliere dietro la nuca i capelli lunghi;
- tenersi sempre ad una distanza di sicurezza dall'azoto che bolle o schizza e dal gas da esso emanato;
- è consigliabile usare scarpe alte o comunque sufficientemente chiuse;
- quando si maneggiano dei liquidi in contenitori aperti, per evitare di non versarli dentro le calzature, indossare sempre pantaloni all'esterno delle calzature;
- eseguire sempre lentamente le operazioni di riempimento di un recipiente o di immersione nel liquido di oggetti non raffreddati così da minimizzare ebollizione e schizzi;
- usare sempre delle tenaglie o delle pinze dalla presa sicura per immergere o estrarre oggetti dal fluido criogenico, mai le mani;
- evitare di riempire i contenitori oltre il livello di sicurezza: l'eccesso di liquido aumenta il tasso di evaporazione ed il pericolo di trabocchi durante il trasporto;
- per il trasferimento di contenitori pieni utilizzare sempre mezzi appropriati (per es. carrelli);
- ricordare sempre che oggetti normalmente morbidi e pieghevoli a temperatura ambiente diventano estremamente duri e fragili alla temperatura di questi liquidi;
- evitare di lavorare da soli durante le attività che comportino l'uso e/o la manipolazione dell'azoto liquido;
- avvertire i colleghi prima di eseguire qualsiasi operazione particolarmente pericolosa;
- non avvicinarsi a zone ove si effettuano operazioni pericolose, se non vi è la necessità;
- rispettare la segnaletica di sicurezza presente;

- non tenere nella sala criobiologica quanto non sia strettamente necessario per lo svolgimento delle attività (ad es. effetti personali), in particolare materiali ingombranti o facilmente combustibili;
- non utilizzare tubi per misurare il livello di azoto liquido (effetto camino).

L'impiantistica di sicurezza adeguata prevista dalle norme stesse, come descritto nel paragrafo dedicato (2.1), consente la minimizzazione del rischio di asfissia.



Tuttavia, a seguito di un'attenta valutazione dei rischi, può talvolta essere consigliato l'utilizzo di più ossimetri in base alla dimensione della sala criogenica e/o ossimetri portatili indossati direttamente dall'operatore. Nel caso in cui risulti necessario, a seguito di una valutazione dei rischi, può essere previsto disporre di autorespiratore.

Dovranno essere dettagliatamente descritte, mediante procedure dedicate, le regole comportamentali a cui il personale dovrà attenersi in caso di condizioni di rischio quale diminuzione della tensione di ossigeno nel locale (tenendo conto delle diverse situazioni operative possibili: presenza o meno di personale). A tal proposito, è importante considerare che un abbassamento della concentrazione di ossigeno nel locale può verificarsi sia per rottura e/o malfunzionamento di un criocontenitore con conseguente fuoriuscita di azoto liquido, sia durante alcune fasi operative che prevedono il travaso del mezzo criogenico e/o la frequente introduzione nel mezzo stesso di materiali a temperatura ambiente.

Devono inoltre essere definite procedure di emergenza quali “Procedura d’intervento in condizione eccezionale di carenza di ossigeno nella sala criogenica” e “Procedura di emergenza per mobilitazione e trasferimento delle crio-banche”.



Per quest’ultima è necessario che ogni Centro abbia definito specifici accordi con un altro potenziale Centro ricevente, in modo da garantire la sicurezza, l’accessibilità e la continuità del trattamento.

PROBLEMATICHE RELATIVE ALLA SICUREZZA DEL CAMPIONE

I potenziali rischi di contaminazione correlati all’applicazione delle tecniche di crioconservazione e allo stoccaggio dei campioni nella PMA sono stati ampiamente trattati in letteratura (2, 3); una delle principali problematiche emerse nella nostra pratica laboratoristica è data dall’utilizzo dell’azoto allo stato liquido.

Sebbene l’azoto liquido fornito dalle ditte produttrici presenti un grado di purezza elevato, le modalità di stoccaggio dei campioni all’interno dei criocontenitori non consentono la sterilità in tali ambienti: è ipotizzabile nel tempo un aumento della contaminazione del mezzo di stoccaggio imputabile principalmente a quanto accade durante le fasi di estrazione o inserimento dei campioni.

In effetti, l’azoto liquido può andare incontro a contaminazione di origine atmosferica e microbica.

La prima condizione è ammissibile a causa della liquefazione dell’ossigeno atmosferico nel mezzo di stoccaggio con conseguente possibilità di reazioni di ossidazione e potenziale danneggiamento del materiale crioconservato. Mentre, il verificarsi

di una contaminazione microbica è ipotizzabile come conseguenza della formazione di cristalli di ghiaccio sulla superficie dei materiali costituenti i dispositivi per lo stoccaggio; tali aggregati possono intrappolare virus, batteri, spore batteriche e fungine e detriti che, accumulandosi nel mezzo di stoccaggio, potrebbero potenzialmente contaminare i campioni.

È stato largamente dimostrato che gran parte dei microorganismi quali *Neisseria gonorrea*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, gli streptococchi, il citomegalovirus, i virus dell'epatite, il simplex virus, gli adenovirus, i poliovirus, *Trichomonas vaginalis*, *Aspergillus* spp e *Candida albicans* sopravvivono alle temperature criogeniche e alle procedure di congelamento/scongelo grazie ad alcune componenti dei mezzi comunemente utilizzati in tali procedure (4, 5).



Risulta quindi fondamentale disporre di procedure sicure che consentano una manipolazione rapida ed accurata in tutte le fasi di stoccaggio, di rintracciabilità e di spostamento del materiale biologico in altri criocontenitori (6-8). Un approccio consapevole a tali criticità comporta la pianificazione nel tempo della sanificazione dei criocontenitori dedicati allo stoccaggio.

Benché ad oggi nel campo della PMA non vi siano evidenze scientifiche di contaminazione e cross-contaminazione legati all'utilizzo dell'azoto nella fase liquida (9), l'importanza sempre maggiore delle tecniche di criopreservazione in tale ambito, impone una approfondita conoscenza delle metodologie utilizzate per una coerente e completa valutazione dei rischi che possono potenzialmente essere insite nelle tecniche.

Lo stoccaggio dei campioni in vapori d'azoto consente una notevole diminuzione dei rischi di contaminazione e cross-contaminazione (10-12); a dispetto di ciò, i costi proibitivi per l'installazione e la gestione di tali impianti rappresentano un grosso limite per la maggior parte dei Centri.

BIBLIOGRAFIA

1. Mortimer D, Mortimer S. Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2009.
2. Bielanski A, Vajta G. Risk of cotamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod.* 2009;24:2457-2467.
3. Tomlinson M. Risk management in cryopreservation associated with assisted reproduction. *Cryo Letters.* 2008;29:165-174.
4. Rall WF. Avoidance of microbial cross-contamination of cryopreserved gametes, embryos, cells and tissues during storage in liquid nitrogen. *Embriologists' Newsletter.* 2003;6:2-15.
5. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irvin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet.* 1995;346:137-139.
6. Tomlinson M, Morrol D. Risk associated with cryopreservation: a survey of assisted conception units in the UK and Ireland. *Hum Fertil (Camb).* 2008;11:33-42.
7. Benifla JL, Letur- Konirsch H, Collin G, Devaux A, Kutten F, Madelenat P, BrunVezinet F, Feldmann G. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a preliminary study with human immunodeficiency virus – I. *Hum Reprod.* 2000;15:2186-218.
8. Letur-Konirsch H, Collin G, Sifer C, Devaux A, Kutten F, Madelenat P, BrunVezinet F, Feldmann G, Benifla JL. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a study with human immunodeficiency virus-I under cryopreservation conditions. *Hum Reprod.* 2003;18:140-144.
9. Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril.* 2010;94:1181-1188.
10. Cobo A, Romero JL, Perez S, de Los Santos MJ, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocyte in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril.* 2010a;94:1903-1907.
11. Eum JH, Park JK, Lee WS, Cha KR, Yoon TK, Lee DR. Long term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertil Steril.* 2009;91:1928-1932.
12. Grout BW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapor as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology.* 2009;71:1079-1082.

CAPITOLO 7

IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E TRACCIABILITÀ NEL LABORATORIO DI FECONDAZIONE *IN VITRO*

PRINCIPI GENERALI

Ogni laboratorio di PMA deve definire e mettere in atto un accurato ed effettivo sistema in grado di garantire l'identificazione dei pazienti e la tracciabilità dei loro tessuti e cellule riproduttive in ogni fase, dalla donazione alla disposizione finale, e viceversa.

È inoltre necessaria la registrazione di tutti i dati rilevanti connessi alle procedure, operatori, date e orari, materiali e strumenti critici che sono stati in contatto con le cellule durante il trattamento (Direttiva 2004/23/EC art.8; Direttiva 2006/86/EC art. 9; Decreto Legislativo 2007, n. 191 art.8).

INDICE

- **Numero identificativo**
- **Tracciabilità dei tessuti, gameti ed embrioni**
- **Tracciabilità durante la crioconservazione**
- **Tracciabilità degli operatori**
- **Tracciabilità dei materiali critici**
- **Tracciabilità della strumentazione critica**
- **Analisi delle fasi critiche del processo**
- **Sistemi automatizzati per l'identificazione dei pazienti e la tracciabilità delle cellule**
- **Flow-chart**
- **Referenze**

IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E TRACCIABILITÀ NEL LABORATORIO

PRIMA DELLA DONAZIONE

- Assegnare un ID al paziente/coppia e alla singola donazione;
- Il ID deve essere alfanumerico e deve garantire univocità
- Il ID deve essere associato a tutta la documentazione del paziente/donatore;
- Immediatamente prima della donazione/consegna del materiale biologico deve essere verificata e registrata la corrispondenza tra paziente e ID.

DURANTE LA LAVORAZIONE

- Segnare in modo chiaro e indelebile tutti i contenitori di materiale biologico con il ID;
- Controllo in doppio dei passaggi critici;
- Organizzare incubatori e tanks in modo da semplificare il ritrovamento del materiale;
- Registrare dati critici: procedure, data e ora, operatori e testimoni, valutazioni qualitative e quantitative dei campioni, destino di ogni cellula (incluso eventuale crioconservazione), materiali e strumenti critici utilizzati.

AL TRANSFER

- Prima del trasferimento embrionale, effettuare l'identificazione diretta della paziente;
- Effettuare il controllo in doppio della corrispondenza tra la paziente/coppia/ID e piastra contenente gli embrioni;
- Preparare una relazione dove vengono riportate procedure eseguite, valutazioni qualitative e quantitative, destino di ogni ovocita, zigote, embrione, campione di spermatozoi inclusa l'eventuale crioconservazione di tessuto, gameti e/o embrioni;
- I dati (moduli/registri) devono essere conservati per un periodo minimo di 30 anni.

NUMERO IDENTIFICATIVO



Prima della donazione il centro deve assegnare un codice univoco o numero identificativo (ID) al paziente/coppia e alla singola donazione.

Questo ID può ad esempio essere composto da nome/cognome, codice identificativo coppia e data della donazione (o codice donazione). Viene quindi utilizzato durante tutte le procedure di approvvigionamento, lavorazione, controllo, stoccaggio, distribuzione e smaltimento dei tessuti e cellule riproduttive. Il ID deve inoltre essere associato a tutta la documentazione critica del paziente (cartella clinica contenente consensi informati ed esami ematochimici, genetici e virologici, schede di laboratorio, registri cartacei o elettronici, referti) che deve essere disponibile alla verifica da parte degli operatori al momento della donazione/ricezione.



Ad ogni donazione (prelievo ovocitario, prelievo di tessuto ovarico, testicolare o epididimale oppure raccolta del liquido seminale) o ricezione (*embryo transfer*) la/il paziente deve essere identificato/a direttamente dall'operatore.

L'identificazione deve avvenire in forma attiva chiedendo al paziente di dire il proprio nome e cognome e verificandone la corrispondenza sulla documentazione ad esso associata.



Si consiglia, inoltre l'utilizzo di etichette durante tutto il percorso PMA. Deve a tal fine essere definita una POS per la stampa, la verifica dei dati presenti sulle etichette e la corrispondenza con il paziente/coppia (Fig. 1).



Fig. 1. Esempio di etichetta (vengono riportati nome/cognome data di nascita/numero identificativo).

TRACCIABILITÀ DEI GAMETI E DEGLI EMBRIONI

I tessuti e gameti devono essere identificabili e tracciabili in ogni fase della lavorazione. Per identificare gli ovociti, spermatozoi, zigoti ed embrioni dalla donazione alla disposizione finale (uso clinico, crioconservazione o scarto) ogni contenitore (provette, piastre, paillettes) deve riportare ID univoco del paziente/coppia da cui provengono i gameti o da cui sono stati generati gli embrioni. L'etichettatura deve essere permanente ed indelebile in modo da non consentire alterazioni non autorizzate o non riconoscibili. In ogni caso, non devono mai essere trattate cellule provenienti da donatori/coppie diversi/e contemporaneamente dallo stesso operatore, ovvero non deve mai essere trattato materiale biologico proveniente da due diverse donazioni/coppie nella stessa area di lavoro (piano della cappa).



Il codice identificativo (ID) deve essere riportato su ogni contenitore prima che vengano riposte cellule o tessuti. L'etichettatura deve essere permanente e indelebile. Deve essere trattato un solo campione alla volta.

La tracciabilità delle cellule è invece garantita da un adeguato sistema di modulistica e registrazioni.

TRACCIABILITÀ DURANTE LA CRIOPRESERVAZIONE



Su ogni contenitore criogenico (paillette, straw, vial,) contenente tessuto, gameti o embrioni devono essere riportati il ID univoco del paziente/coppia, il numero e la tipologia delle cellule contenute. L'etichettatura deve essere permanente, indelebile e resistente all'azoto liquido (Fig. 2).

La documentazione relativa ai gameti, zigoti ed embrioni crioconservati (modulo di crioconservazione) deve includere:

- Operatore
- ID univoco paziente/coppia;
- Tecnica di congelamento utilizzata;
- Tipo e numero di lotto del crioprotettore usato;
- Numero di ovociti, zigoti o embrioni contenuti in ogni contenitore criogenico (paillette/straw/vial);
- Stadio di sviluppo (ad es. MII, oppure ore dall'inseminazione);
- Ove applicabile, concentrazione degli spermatozoi nella fase precedente alla crioconservazione;
- Numero di contenitori crioconservati per ogni paziente/coppia;
- Posizione nella quale vengono riposti i contenitori criogenici.



Fig. 2. Esempio di etichette per la crioconservazione (vengono riportati nome/cognome data di nascita, numero identificativo, numero e tipologia cellule)

L'organizzazione nello stoccaggio dei gameti e degli embrioni deve essere ottimizzata al fine di ridurre il tempo necessario per il ritrovamento e la manipolazione durante le fasi di inserimento ed estrazione dei contenitori criogenici dai tanks. Ogni scongelamento deve essere registrato indicando chiaramente data, ora, destino dei gameti/embrioni, numero di contenitori criogenici scongelati ed eventualmente rimasti, operatore.



Oltre al modulo di crioconservazione del singolo paziente, è consigliabile avere un registro cartaceo o elettronico che riporti (ad es. in sequenza temporale) le crioconservazioni effettuate. Se tale registrazione viene effettuata deve riportare almeno ID, data della crioconservazione, numero contenitori criogenici, tipologia di cellule, tipo e lotto del crioprotettore utilizzato, posizione di stoccaggio.

Almeno una volta l'anno deve essere verificata la corrispondenza dei dati relativi al materiale biologico effettivamente stoccato. Tale verifica può essere effettuata semplicemente a campione incrociando i dati riportati sul registro delle crioconservazioni con quelli riportati sulla modulistica dei pazienti.

È consigliabile infatti evitare di estrarre e riporre i gameti ed embrioni crioconservati, per il rischio di danneggiamenti del materiale.

TRACCIABILITÀ DEGLI OPERATORI



Ogni procedura effettuata da un operatore (ricezione, lavorazione, valutazione o stoccaggio di materiale biologico) deve essere registrata sul modulo di laboratorio indicando data/ora e firma (o sigla) dell'operatore.

Tutti passaggi critici del processo devono essere identificati e sottoposti a verifica in doppio (due operatori oppure operatore e sistema elettronico ove applicabile) e registrati nel momento in cui vengono effettuati.

Il testimone che si accerta della corretta procedura d'identificazione durante i passaggi critici deve essere adeguatamente formato a tale scopo e deve conoscere il sistema di tracciabilità del centro. Può essere un altro biologo, un tecnico di laboratorio, un medico o un membro del personale para-sanitario. Esempio di passaggi critici che richiedono la presenza del secondo operatore:

- trasferimento del liquido seminale dal barattolo alle provette per lavaggio/centrifugazione;
- trasferimento dell'aliquota selezionata del seme trattato alla provetta finale;
- passaggio degli ovociti dal liquido follicolare alla piastre di coltura *in vitro*;
- inseminazione degli ovociti con l'aliquota di liquido seminale;
- messa in coltura dopo l'inseminazione (ICSI);
- cambio di piastre durante la coltura *in vitro* delle cellule (terreni sequenziali);

- selezione e messa in piastra del/degli embrione/i per il trasferimento *in utero* o la crioconservazione;
- scongelamento di ovociti/spermatozoi/embrioni.

TRACCIABILITÀ DEL MATERIALE CRITICO

Una lista di tutti i reagenti critici deve essere predisposta e resa disponibile al personale di laboratorio.

I terreni, i reagenti, i materiali ed i contenitori utilizzati per il prelievo, l'analisi, la conservazione e lo stoccaggio delle cellule o degli embrioni devono essere corredati da certificati di sterilità e qualità con standard riconosciuti in campo internazionale. Ogni lotto di reagenti critici o materiali di consumo deve essere riconducibile alla rispettiva procedura (prelievo, lavorazione, conservazione) in cui sono stati utilizzati.

Nel caso si tratti di reagenti o terreni di coltura prodotti presso il laboratorio stesso devono essere registrati il lotto, data produzione e scadenza, operatore e protocollo e report di validazione del prodotto.

Nel caso di materiali e reagenti commerciali non provvisti di certificazione di conformità, la qualità del prodotto deve essere confermata da protocolli di validazione interni oppure ricavabile dalla letteratura scientifica internazionale.



Devono essere registrati tutti i reagenti e materiali critici che sono stati in contatto con le cellule durante la ricezione, lavorazione, valutazione e/o stoccaggio e che possono avere un effetto sulla qualità del prodotto. La registrazione deve comprendere almeno nome della ditta produttrice/codice prodotto/lotto/data di scadenza.

La registrazione può essere effettuata direttamente sulla scheda di laboratorio di ogni singolo paziente/coppia.

In alternativa, può essere utilizzato un registro dei materiali/reagenti, dove vengono riportati oltre ai dati del prodotto stesso anche la data di inizio e fine uso (specificando il primo e ultimo ciclo in cui è stato utilizzato il prodotto).

Infine, è possibile anche una registrazione giornaliera dei materiali e reagenti utilizzati. Questa scheda deve essere datata, numerata e conservata. Sulla scheda di ogni paziente devono quindi essere riportati i riferimenti alle schede dei materiali utilizzati ogni giorno della lavorazione.

Esempio di lista del materiale e reagenti critici:

- ago per il prelievo ovocitario;
- terreni di coltura che sono entrati in diretto contatto con i gameti ed embrioni (terreni per la manipolazione e la coltura, mezzo di coltura per il transfer);
- kit/terreni di congelamento/scongelo;
- catetere per *embryo transfer*;
- materiale di plastica o vetro che è entrato in diretto contatto con le cellule (provette, piastre, siringhe, piallette, tip di denudazione, pipette Pasteur, aghi per la micromanipolazione).

TRACCIABILITÀ DELLA STRUMENTAZIONE CRITICA

Per strumentazione critica si intende le attrezzature e i dispositivi tecnici che hanno potenzialmente effetto sulla qualità e/o sicurezza di cellule e tessuti o sono a contatto con cellule e tessuti (es. incubatori e tanks). Tutte le apparecchiature critiche devono essere identificate, convalidate e mantenute

per garantire nel tempo le caratteristiche e l'affidabilità delle prestazioni predefinite. Ogni apparecchiatura critica è accompagnata da un *logbook* dove, oltre all'anagrafica dello strumento, sono registrate tutte le attività di manutenzione e i risultati dei controlli e della eventuale verifica di taratura. La documentazione va conservata per almeno 10 anni dalla data dell'uso clinico (Decreto Legislativo n. 16 del 25 gennaio 2010). I valori dei parametri critici quali temperatura, % di CO₂ e O₂, pH, livello di azoto liquido, devono essere regolarmente rilevati e registrati.



Devono essere identificati e riportati sulla scheda di lavorazione tutti gli strumenti critici che sono stati in contatto con le cellule e che possano avere una influenza sulla qualità del prodotto.

La verifica dei parametri ambientali critici, quali conta delle particelle aerotrasportate, pressione, temperatura, umidità, numero dei ricircoli di aria, test microbiologici, è effettuata con la periodicità predefinita e i risultati sono registrati in documenti archiviati per almeno 10 anni. I risultati del monitoraggio fanno parte del *batch record* delle cellule o del tessuto e devono essere considerati al momento della decisione se il prodotto possa essere utilizzato.

ANALISI DELLE FASI CRITICHE DEL PROCESSO

a) **prelievo chirurgico di gameti:** prima di cominciare la procedura chirurgica, in sala operatoria, deve essere effettuata l'identificazione diretta del paziente che deve essere regi-

strata in una apposita scheda. Deve essere quindi accertata la corrispondenza tra paziente/coppia/ID. Tutti i contenitori devono essere pre-assegnati con ID prima che vengano riposte le cellule. Devono essere registrati i materiali critici utilizzati sia in sala operatoria che in laboratorio. Devono essere registrati: procedure effettuate, operatori e testimoni che sono intervenuti durante l'atto chirurgico e durante la lavorazione dei tessuti e cellule. Alla fine della procedura chirurgica e laboratoristica deve essere accertato che non siano rimaste provette o piastre non analizzate in sala operatoria ed in laboratorio.

b) accettazione del liquido seminale: prima dell'accettazione del campione di liquido seminale deve essere effettuata l'identificazione diretta del paziente che deve essere registrata in una apposita scheda/modulo di consegna. Deve inoltre essere accertato che i dati riportati sul contenitore corrispondano a quelli del paziente. Registrare ora/data della raccolta e operatore che ha effettuato l'accettazione. Il paziente sottoscrive il modulo.

Qualora il liquido seminale sia raccolto fuori dal centro, la documentazione relativa al campione deve contenere:

i) denominazione e indirizzo del laboratorio per PMA a cui è destinato; ii) dati anagrafici del donatore (nome cognome e data di nascita); iii) data e ora della raccolta; ii) motivo della raccolta (tecnica di PMA o crioconservazione).

Al momento della consegna deve essere effettuata e registrata l'identificazione diretta del paziente.

Il paziente inoltre autocertifica che il campione contenuto all'interno del contenitore consegnato è stato da lui prodotto e sottoscrive il modulo di consegna. Il campione deve essere

inoltre accompagnato (o associato) al consenso informato al trattamento (tecnica di PMA o crioconservazione) e a tutta la documentazione clinica del paziente.

Prima della lavorazione in laboratorio, deve essere controllata la corretta compilazione del modulo di consegna e la documentazione relativa al campione (consensi informati, esami virologici).

c) lavorazione: tutti i contenitori (provetta/piastra/paillette/vial o altro) contenenti la/e cellula/e riproduttiva/e, lo zigote, l'embrione, devono riportare ID del paziente/coppia prima che il campione venga depositato in esso.

Ogni passaggio critico che comporta la movimentazione di cellule da un contenitore all'altro richiede la presenza di un secondo operatore (o sistema automatizzato ove applicabile) che funge da testimone e autocertifica l'attività svolta.

In schede di laboratorio e/o in registri cartacei e/o informatici del laboratorio, devono essere indicati tutti i passaggi eseguiti, in particolare deve essere tracciabile l'evoluzione di ogni singolo ovocita, zigote, embrione e l'utilizzo del campione di spermatozoi, nonché i protocolli di lavorazione che sono stati applicati, dove e come sono stati conservati e stoccati, il destino del materiale biologico (utilizzato, mantenuto, consegnato, trasferito, crioconservato, scartato), l'operatore che ha eseguito ogni passaggio e l'operatore testimone, gli orari di esecuzione delle procedure.

- liquido seminale: devono essere registrati il periodo di astinenza osservato, l'orario e il luogo della raccolta, tempo trascorso tra raccolta e la preparazione del campione, parametri del liquido seminale, metodo di preparazione del campione, parametri del liquido seminale post-preparazione.

- prelievo chirurgico di spermatozoi (PESA, MESA, PESE, TESE, biopsia testicolare): devono essere registrati ora dell'intervento, la tipologia e la descrizione del campione ottenuto, il numero e la motilità degli spermatozoi ottenuti e l'eventuale trattamento eseguito (lavaggio con terreno di coltura, crioconservazione).

- lavorazione di ovocita/zipote/embrione: la scheda di laboratorio deve contenere ogni valutazione osservazionale rilevante, ad esempio la descrizione morfologica del complesso cumulo-ooforo, la descrizione morfologica dell'ovocita dopo decumulazione, il numero dei pronuclei e l'eventuale classificazione morfologica dei nucleoli dello zipote, il numero e la simmetria delle cellule embrionali, il tasso di frammentazione, i tempi di sviluppo, l'aspetto morfologico delle blastocisti e l'eventuale valutazione genetica.

d) **embryo transfer**: prima di cominciare la procedura di trasferimento embrionale, direttamente in sala operatoria, deve essere effettuata l'identificazione diretta della paziente che deve essere registrata. In seguito viene accertato dall'operatore, in presenza del testimone, la corrispondenza tra la paziente/coppia/ID e la piastra contenente gli embrioni.

e) prima di effettuare lo **scongelo** dei gameti o embrioni, vengono verificati dall'operatore i dati identificativi presenti sul visiotube e sulla paillette/straw/vial. Un testimone verifica quindi la corrispondenza tra le etichette riportate sul materiale crioconservato e i dati anagrafici e biologici riportati sulla cartella clinica/biologica, prima che l'operatore proceda allo scongelamento (riportare sulla cartella biologica sigle degli operatori/testimoni).

Nella scheda di laboratorio devono essere registrati tutti i dati

in accordo a quanto affermato da “Conferenza Stato Regione del 15 marzo 2015, Sezione E”, ad esempio: procedure eseguite (es. IUI, FIV, ICSI), valutazioni qualitative e quantitative, destino di ogni ovocita, zigote, embrione, campione di spermatozoi (trasferito, congelato, estinto) incluso l’eventuale crioconservazione di gameti e/o embrioni, tempo intercorso tra pick-up ovocitario e transfer e tra l’inseminazione dell’ovocita e il transfer. Questa relazione viene allegata alla cartella del/la paziente/coppia.



Si consiglia, in caso di pazienti con markers infettivi positivi, di riportare il dato su ogni modulo e registro utilizzato per la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione del materiale biologico e/o di quello che ne risulta (zigote, embrione).



I dati necessari ad assicurare la tracciabilità dei donatori e delle cellule in tutte le fasi della lavorazione (moduli/registri) devono essere conservati per un periodo minimo di trenta anni dopo l’uso clinico. L’archiviazione dei dati può avvenire anche in forma elettronica.

I registri informatici devono essere mantenuti in un sistema convalidato, e ci devono essere le procedure per eseguire il backup dei record elettronici per prevenire la perdita, la corruzione e l’accesso non autorizzato con conseguente modifica.

SISTEMI AUTOMATIZZATI PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E LA TRACCIABILITÀ DELLE CELLULE

La figura dell'operatore testimone che si assicura che le procedure critiche siano effettuate in modo corretto ricopre un ruolo fondamentale per eliminare i sempre possibili, seppur rari, errori umani. Ogni centro deve quindi mettere in atto un adeguato sistema che preveda la presenza di un secondo operatore ad ogni passaggio che può comportare lo scambio di gameti o embrioni.

Esistono dei sistemi automatizzati che usano barcodes e lettura a radio frequenza per l'identificazione e la tracciabilità delle cellule (*witnessing* automatico) che sono stati appositamente concepiti per il laboratorio di PMA. In assenza di tali sistemi, come suggerito dal HFEA 2014 (punto 18.7) l'embriologo non può lavorare da solo quando vengono effettuate procedure critiche.

La scelta del sistema di *witness* automatico si deve basare sulle seguenti caratteristiche:

- il sistema non deve essere dannoso per i gameti ed embrioni;
- il sistema deve essere consistente e sicuro;
- la ditta produttrice deve essere in grado di fornire evidenza sulla sicurezza e consistenza del sistema e del software (valutazione di falsi positivi e falsi negativi, rischio di rottura o interruzione del sistema);
- la ditta produttrice deve essere in grado di garantire la produzione di etichette e tags.

Ogni sistema si basa in ogni caso sugli operatori che lo utiliz-

ziano, è quindi necessaria un'adeguata formazione (e mantenimento della competenza) del personale prima dell'introduzione e durante l'utilizzo del sistema.

Questi sistemi sono appositamente predisposti per rivelare (allarme sonoro e visivo) e registrare l'errore. Esso può quindi essere risolto dall'operatore responsabile (prima che abbia conseguenze irreversibili) in presenza di un testimone, che fornisce un'adeguata descrizione dell'accaduto e della risoluzione del problema, prima di poter continuare la procedura. Gli errori registrati dal sistema devono essere oggetto di analisi periodica in modo da poter identificare i punti deboli delle procedure e minimizzare i problemi successivamente.

Non è possibile basarsi unicamente sui sistemi automatici per l'identificazione dei pazienti e la tracciabilità delle cellule in quanto alcuni passaggi richiedono comunque la presenza di un testimone umano per garantire la sicurezza della procedura (ad es. riconoscimento del paziente, identificazione del singolo embrione durante la diagnosi pre-impianto).

Tutti i sistemi di etichettatura che riportano ID completo del paziente devono quindi essere leggibili anche dagli operatori che in qualunque momento possono effettuare il *witnessing* manuale.

BIBLIOGRAFIA

1. Direttiva 2004/23/EC.
2. Direttiva 2006/86/EC.
3. HFEA code of practice 2014.
4. Decreto legislativo 191/2007.
5. Linee Guida Legge 40 (2015).
6. Accordo di Conferenza stato regioni 15 marzo 2012.
7. EDQM Guide 2nd edition 2015.

CAPITOLO 8

MOVIMENTAZIONE E TRASPORTO DI GAMETI ED EMBRIONI TRA CENTRI

OBIETTIVI

Le indicazioni legislative sul trasporto tra Centri di materiale conservato a temperature criogeniche (temperatura compresa tra -196°C e -150°C) ed il riconoscimento delle responsabilità vanno interpretate e rese realizzabili dai vari servizi. In questo capitolo viene proposta una Istruzione Operativa di Servizio (IOS) per il Rilascio e l'Accettazione di materiale biologico crioconservato che regola il trasporto tra Centri nel rispetto delle Leggi e dei Decreti.

INDICE

- Flow chart iniziale
- Requisiti obbligatori per il trasporto
- Enti coinvolti e relativa documentazione
 - Definizioni per il materiale
 - Definizioni per il trasporto pericoloso
- **INTERPRETAZIONE DEI REQUISITI**
(IOS rilascio gameti ed embrioni, documentazione)
- Note legali
- Precauzioni per la movimentazione di materiale crioconservato
- Caratteristiche del criocontenitore da trasporto
- Confezionamento del pacco
- Trasporto via terra
- Trasporto via aerea
- Problemi che possono presentarsi al momento dell'accettazione del materiale
- Conclusioni
- Flow chart finale
- Bibliografia

TRASPORTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO TRA CENTRI

REQUISITI MANDATORI

- LEGGI E DECRETI
- ENTI
- DEFINIZIONE DEL MATERIALE
- DEFINIZIONE CONDIZIONI DI TRASPORTO



MODULISTICA INTERPRETAZIONE REQUISITI (IOS)

- RICHIESTA MOVIMENTAZIONE DAL CENTRO A AL CENTRO B
- IDENTIFICAZIONE DEL TRASPORTATORE
- CONSENSO INFORMATO O CERTIFICAZIONE PER LA CRIOCONSERVAZIONE
- INDICAZIONI METODOLOGICHE SULLA CRIOCONSERVAZIONE
- ESAMI INFETTIVOLOGICI
- INFORMATIVA PER TRASPORTATORE
- ETICHETTA DI VIAGGIO
- INFORMAZIONE ENTI PER TRASPORTI INTERNAZIONALI
- FAX DI CONFERMA DI AVVENUTO RICEVIMENTO



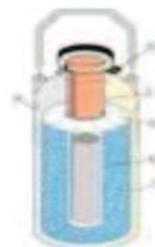
CARATTERISTICHE DEL TRASPORTO

- NAZIONALE
- INTERNAZIONALE
- VIA TERRA
- VIA AEREA



CARATTERISTICHE DEL CONTENITORE DI TRASPORTO CONFEZIONAMENTO

- DRY SHIPPER
- CONTENITORE AD AZOTO LIQUIDO TRASPORTABILE
- CONFEZIONAMENTO DEL PACCO



PROBLEMI ALL'ACCETTAZIONE

- CONTROLLO DOCUMENTAZIONE
- STATO DEL CRIOCONTENITORE E DEL MATERIALE
- IDENTIFICAZIONE MATERIALE
- ACQUISIZIONE E STOCCAGGIO



CHECK LIST

- CONSEGNA MATERIALE
- RICEZIONE MATERIALE



REQUISITI OBBLIGATORI PER IL TRASPORTO



Per l'attuazione di un trasporto di materiale biologico crioconservato da un Centro PMA ad un altro è indispensabile:

- ricevere una richiesta di movimentazione (FAX o mail) da un Centro PMA, autorizzato e certificato dalla rispettiva autorità competente, che esprima la volontà del/dei pazienti a trasportare il proprio materiale biologico;
- reperire la documentazione necessaria per la DICHIARAZIONE DI IDONEITA' ALL'UTILIZZO CLINICO e la tracciabilità completa del materiale: consenso informato al trattamento e alla crioconservazione del materiale; copia degli esami infettivologici del/della paziente ai sensi di legge;
- controllare la corretta identificazione del materiale biologico e la tracciabilità dei materiali utilizzati.
- reperire ed allestire un criocontenitore idoneo alla tipologia di trasporto;
- confezionare il pacco secondo le normative;
- in caso di trasporto aereo, compilare il report per l'esenzione del controllo radiogeno e contattare l'USMAF in tempo utile per codifica;
- informare il Trasportatore o il Corriere autorizzato delle corrette condizioni di trasporto da rispettare;
- accertare che le corrette condizioni siano state rispettate durante il trasporto (mediante l'utilizzo di sistemi di rilevazione della temperatura, come ad esempio: data logger);
- accertare che il materiale identificato sia giunto a destinazione in maniera conforme e completo della documentazione richiesta;
- comunicare l'avvenuto ricevimento al Centro di provenienza.

REQUISITI OBBLIGATORI PER TRASPORTI INTERNAZIONALI



- **Tutti quelli previsti per i trasporti Nazionali.**



- **È fortemente consigliato contattare un Corriere autorizzato per i trasporti per via aerea.**



- **Comunicare all'USMAF la data del trasporto**
- **Comunicare l'avvenuta importazione/esportazione entro 48 ore al CNT e all' ISS.**

ENTI COINVOLTI E LINEE GUIDA

- **IATA: *International Air Transport Association. IATA Dangerous Goods Regulations Manual.*** Definisce anche il tipo di imballaggio consentito, cioè combinato (imballaggi interni contenuti in un imballaggio esterno *Packaging Instruction 202*).
- **ICAO (*Organizzazione Internazionale dell'Aviazione Civile*).** **Annesso 18 ICAO: *The Safe Transport of Dangerous Goods by Air.*** **Doc 9284 ICAO: *Technical Instructions for the Safe Transport of Dangerous Goods by Air (T.I.)*.**
- **USMAF (*Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera*).**
- **CNT (*Centro Nazionale Trapianti*), ISS (*Istituto Superiore di Sanità*): ai sensi del Decreto Legislativo 191/2007 e N. 10/2012**

(Art. 8), il Centro italiano deve comunicare, entro 48 ore dalla ricezione o dall'invio del materiale, al CNT e all'ISS l'informazione di avvenuta importazione o esportazione di gameti ed embrioni, specificandone i codici identificativi, il Centro di provenienza e di destinazione finale.

- **World Health Organization:** *WHO Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2007-2008.*

DEFINIZIONI PER IL MATERIALE

Il materiale biologico crioconservato di cui ci occupiamo appartiene alla categoria "**prodotti biologici**", cioè materiali biologici finiti ad uso umano e veterinario secondo la classificazione delle Nazioni Unite estratta dalle raccomandazioni dell'ONU. Solo se si tratta di materiale infetto, appartiene alla categoria: **Biological Substance Category B UN3373.**

Se il contenitore per il trasporto materiale biologico contiene azoto liquido, il trasporto viene considerato "pericoloso" e segue regole diverse a seconda del mezzo utilizzato.

DEFINIZIONI PER IL TRASPORTO PERICOLOSO

- **ADR:** accordo europeo relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose su **strada**.
- **RID:** regolamento relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose per **ferrovia**, che figura come appendice C alla convenzione sul trasporto internazionale per ferrovia (COTIF).
- **ADN:** accordo europeo relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose per **vie navigabili interne**.
- **IATA:** per il trasporto aereo

IDENTIFICAZIONE DEL PRODOTTO

L'azoto viene identificato come segue

Nome commerciale: AZOTO REFRIGERATO

Formula chimica: N₂

Classificazione della sostanza:

Classe di pericolo e codice di categoria del Regolamento CE 1272/2008 (CLP)

Pericoli fisici: Gas liquefatti refrigerati

Pittogramma di pericolo GHS04: Classificazione: bombole o altri contenitori di gas sotto pressione, compressi, liquefatti, refrigerati, disciolti. Precauzioni: trasportare, manipolare e utilizzare con la necessaria cautela (Fig. 1).



Fig. 1.
Pittogramma di pericolo GHS04.

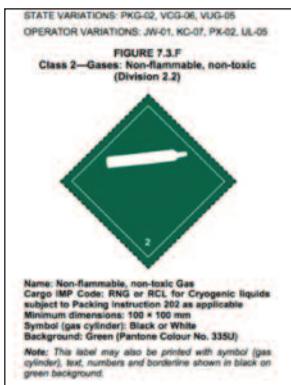


Fig. 2.
Hazard label: Non-Flamm Gas e Criogenic Liquid

COLONNA D del 4.2 DGR IATA per trasporto aereo

UN ID Number: 1977

Proper Shipping Name: Refrigerated Nitrogen

Hazard Class: 2.2

Hazard label: Non-Flamm Gas e Criogenic Liquid (Fig. 2)

PASSENGER AND CARGO AIRCRAFT

EQ code: Quantità netta massima per *inner packaging*: 30 g/30 ml (E1)

Packaging Instructions: 202

Max Qty/Packaging: 50 Kg

CARGO AIRCRAFT

Packaging Instructions: 202

Max Qty/Packaging: 500 Kg

Disposizione Speciale (SP): A152

Guida di Emergenza Speciale (ERG): 2L

PACKING INSTRUCTION 202: si applica per gas liquidi refrigerati posti in contenitori aperti o chiusi caricati su aerei passeggeri o solamente di carico.

SPECIAL PROVISION A152: riguarda i contenitori con azoto liquido completamente assorbito da un materiale poroso (DRY SHIPPER), che non sono soggetti alla regolamentazione 202 quando caricati su di un aereo. Questi contenitori infatti, non possono rilasciare liquido refrigerato all'esterno in qualsiasi posizione si trovino e non sono sottoposti ad aumenti di pressione al loro interno. Quando viene usata questa condizione, è necessario utilizzare la dicitura "*NOT RESTRICTED*" ed includere la SPECIAL PROVISION A152 nella descrizione del trasporto della "Lettera di Vettura".

INTERPRETAZIONE DEI REQUISITI

Viene proposta una Istruzione Operativa di Servizio (IOS), che interpreta e rende realizzabile il trasporto tra Centri del materiale biologico crioconservato nel rispetto delle normative sovraespresse.

IOS RILASCIO GAMETI ED EMBRIONI

Attivazione della procedura:

L'attivazione della procedura è rappresentata dall'invio di una richiesta via fax o via mail del Centro richiedente indirizzato

al Responsabile del Centro che ha in consegna il materiale, in cui, a nome del paziente o della coppia proprietaria del materiale biologico, viene chiesto il trasferimento.



È consigliato che il Centro richiedente individui la persona che eseguirà il trasporto, cioè colui che sarà responsabile del materiale durante lo spostamento (Trasportatore) e lo comunichi al Centro che ha in consegna il materiale. Malgrado spesso nell'ambito della PMA il Trasportatore, sia il/la paziente stesso/a, è consigliabile affidarsi ad un corriere autorizzato ai sensi dell'Articolo 24 DLG 191/2007.

Dichiarazione di idoneità del materiale biologico all'uso clinico: Il Responsabile del Centro che ha in consegna il materiale, prende atto della richiesta, verifica la completezza e conformità della documentazione a seguito elencata dichiarandone così l'idoneità al trasporto per il successivo utilizzo.



Referente del trasporto, è consigliato individuare un Referente che si occupi del trasporto fino al suo compimento. Solitamente è un Biologo del Centro che esegue il controllo del materiale, verifica la sua corretta identificazione e tracciabilità, si occupa di confezionare il pacco rispettando le normative stabilite per un trasporto pericoloso e verifica che il materiale sia giunto a destinazione correttamente. Questa figura conferisce importanti caratteristiche di sicurezza alla procedura.

ELENCO DOCUMENTAZIONE (vedi moduli allegati da 1 a 9):

N.1) Richiesta di movimentazione di cellule riproduttive

Il paziente/pazienti richiede al Centro Inviante la movimentazione del materiale biologico.

N.2) Fax di richiesta di trasporto del materiale:

Il Responsabile del Centro richiedente invia un fax su carta intestata al Responsabile del Centro che conserva il materiale in cui richiede, a nome della coppia, la movimentazione del materiale biologico.

Indica inoltre il **Trasportatore**, cioè chi fisicamente eseguirà il trasporto specificando i dati anagrafici che consentiranno la sua certa identificazione.

N.3) Copia del consenso alla procedura o attestazione firmata del Responsabile del Centro inviante della corretta raccolta del consenso.

N. 4) Indicazioni precise sul materiale biologico a seconda della tipologia di materiale

4 A) spermatozoi

4 B) ovociti

4 C) embrioni

Indicazioni precise sulla metodologia di crioconservazione.

Per ogni tipologia di materiale indicare:

- concentrazione, numero, maturità, stadio di sviluppo;
- metodo di crioconservazione;
- tipo e molarità dei crioprotettori utilizzati indicando ditta, lotto di produzione e data di scadenza. Fornire, se necessario, indicazioni utili per il successivo scongelamento.

5) Esami infettivologici

Verificare la validità di tutti gli esami infettivologici richiesti dalle normative ed allegarne copia dei referti di laboratorio.

Se il materiale trasportato fosse positivo per uno degli agenti infettivi, la scritta **“Sostanza biologica Categoria B UN3373”** e **relative etichette**, devono essere aggiunte all’etichetta allegata al contenitore di trasporto. Giunto a destinazione, il materiale deve essere stoccato in contenitori dedicati.

N. 6) Informativa per il Trasportatore

È necessario predisporre un’informativa in cui siano indicate le prescrizioni sia per la documentazione che per il materiale. In essa vengono inoltre elencate le generali precauzioni da prendere per il trasporto di sostanze pericolose come l’azoto liquido. Questa informativa viene letta e spiegata dal Referente del trasporto al Trasportatore, che successivamente firmerà un **“accordo per il mantenimento delle condizioni di trasporto richieste”** (N. 7) impegnandosi così a rispettarlo.

N. 8) Etichetta di viaggio

È indispensabile per il trasporto. Su di essa vanno indicate:

- le informazioni sul materiale;
- le indicazioni precise sul destinatario e sul mittente con i relativi recapiti;
- le etichette previste dalle normative per la sicurezza e le modalità del trasporto;
- le etichette per materiale infetto in caso di positività.

N. 9) Fax di conferma dell’avvenuto ricevimento del materiale

Allo scopo di assicurare che il materiale venga consegnato al destinatario in modo da rispettare i termini di legge, viene predisposto un modulo di **“avvenuto ricevimento del materiale”**. Esso deve essere compilato dalla persona che accetta il materiale al momento del suo arrivo ed essere inviato via fax o mail al Centro di provenienza. Il ricevimento di questo fax, correttamente compilato, rappresenta la chiusura della procedura.

La suddetta documentazione di trasporto deve rimanere sempre unita al contenitore e giungere a destinazione completa.

NOTE LEGALI

Il Centro ricevente ha la responsabilità di comunicare alle autorità competenti le informazioni sul successivo destino del materiale ricevuto (conservazione, utilizzo, eliminazione, ecc.).

In caso di trasferimento di gameti, degli zigoti ed embrioni, è responsabilità del Centro ricevente accertare l'esistenza del consenso dei soggetti da cui provengono i gameti e da cui sono stati generati gli embrioni all'uso e alla crioconservazione dei gameti e degli embrioni trasferiti.

PRECAUZIONI PER LA MOVIMENTAZIONE DEL MATERIALE CRIOCONSERVATO

Il materiale biologico stoccato a temperature criogeniche non deve subire variazioni di temperatura né durante la sua permanenza nei contenitori criobiologici di stoccaggio né durante gli spostamenti richiesti dalla necessità di movimentazione.

Per ottenere questo, durante le movimentazioni è necessario adottare alcune precauzioni fondamentali.



È consigliato prepararsi agli spostamenti individuando in precedenza i campioni, per poter eseguire le manovre in maniera sicura e rapida. È consigliato lasciare intatti i piccoli astucci (goblet) in cui si inseriscono i dispositivi contenenti i campioni (paillettes, ecc.) in modo che l'azoto liquido in esso contenuto non possa fuoriuscire consentendo ai campioni di rimanere immersi ...



... durante i piccoli spostamenti (da un contenitore ad un'altro, da un contenitore statico ad un contenitore per il trasporto). La comune pratica di bucarli per facilitare il flusso dell'azoto al loro interno va assolutamente evitata.

È consigliato inoltre prestare particolare attenzione ai campioni crioconservati con la tecnica di vitrificazione. Questa tecnica, prevedendo che il materiale biologico sia conservato in un minimo volume ($< 1\mu\text{l}$), rende i campioni più sensibili ai cambiamenti di temperatura di quelli crioconservati con il metodo lento (volume $250\mu\text{l}$) (McDonald et al., 2011).

CARATTERISTICHE DEL CRIOCONTENITORE DA TRASPORTO

L'azoto liquido (-196°C) può essere contenuto e trasportato solo in contenitori adeguati a sopportare temperature molto basse detti vasi di Dewar dal nome dall'inventore, James Dewar (1892) fisico e chimico. Si tratta di contenitori, solitamente realizzati in acciaio inox o in alluminio, che mantengono il contenuto isolato dall'ambiente esterno, in quanto costituiti da due pareti tra cui è posta un'area di vuoto che garantisce un isolamento termico. Il vuoto è usato solo come isolamento termico mentre il contenuto non è sotto vuoto.

Su questi contenitori deve essere apposta un'etichetta sulla quale è indicato che il contenuto è azoto liquido (Fig. 3).



Fig. 3.
Schema vaso Dewar.

Le tipologie di contenitori proposte per il trasporto sono le seguenti e nessun altro tipo di contenitore può essere accettato come idoneo:

DRY SHIPPER: hanno il vantaggio di non contenere in realtà azoto liquido, ma un materiale spugnoso che assorbendolo, mantiene la temperatura criogenica. In questo modo, non si presentano i pericoli legati alla presenza del liquido refrigerato ed il trasporto non sottostà ad alcuni vincoli previsti per i trasporti pericolosi perché esso avviene in **vapori di azoto**. Per questa ragione è consentito il trasporto aereo. La temperatura di -150°C viene mantenuta per un tempo che varia a seconda della tipologia del contenitore.

Questi contenitori devono essere caricati con azoto liquido (LN_2) il giorno precedente all'utilizzo in modo che esso venga assorbito completamente dal materiale spugnoso. Devono essere poi rabboccati poco prima del trasporto preoccupandosi di eliminare l'azoto in eccesso. È consigliato pesare il contenitore vuoto e dopo completo riempimento. Questo peso andrà poi controllato a destinazione al momento della consegna del contenitore.

I due formati più comunemente utilizzati:

a) Caratteristiche del contenitore criobiologico rappresentato in Figura 4:

- capacità di: 3,5-8 L
- peso pieno: 8,50-17 kg
- autonomia: circa 20 gg.

È un contenitore costoso, ma può essere utilizzato per decine di viaggi ed è adatto per trasporti su lunga distanza.

Nel caso di trasporto di materiale infetto, il dewar deve essere decontaminato tramite sterilizzazione.

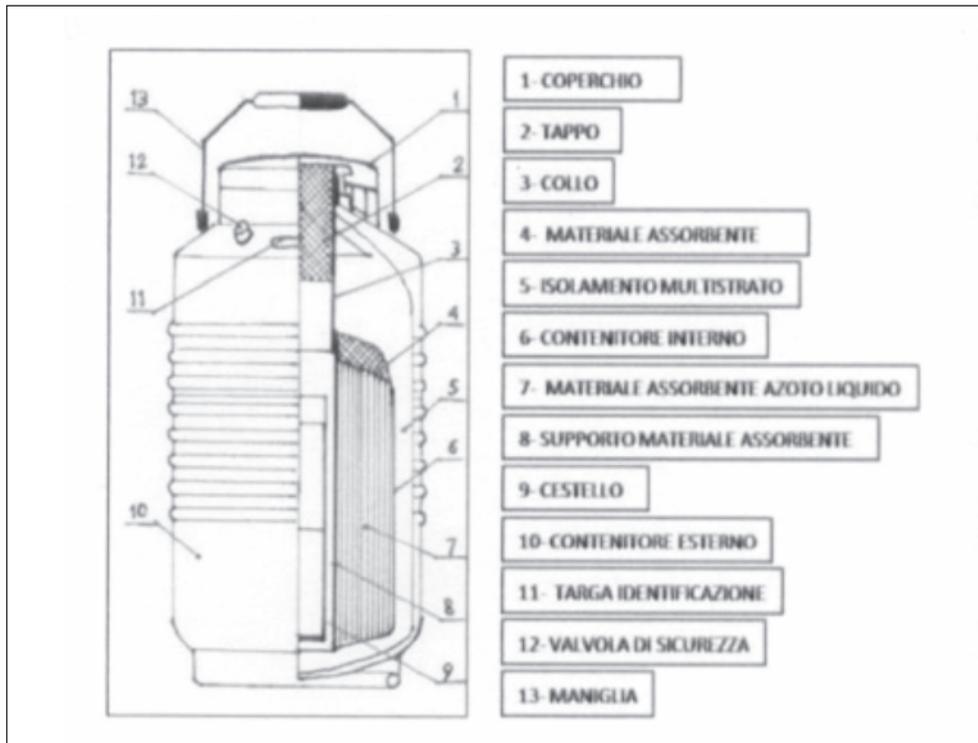


Fig. 4. Caratteristiche del contenitore criobiologico.

b) Caratteristiche del contenitore rappresentato in **Figura 5**:

- Capacità: 6,4 L
- Peso pieno: 7 kg
- Autonomia: 8 giorni (consigliato max 2 gg).

È un contenitore economico, è **monouso** quindi particolarmente adatto per il trasporto di materiale infetto. adatto per trasporti a breve distanza ed è idoneo al trasporto aereo.



Fig. 5. Contenitore monouso.

Contenitori criobiologici ad azoto liquido trasportabili di piccole dimensioni (Fig. 6). In questo caso, il materiale viaggia



Fig. 6.
Contenitori criobiologici ad azoto liquido trasportabili.

immerso nel liquido. Questi contenitori sono costosi, ma possono essere presi in affitto da ditte specializzate e possono essere sterilizzati o sanificati dopo il trasporto di materiale infetto.

Trasportare questi contenitori è pericoloso a causa della presenza di azoto liquido. Per questo motivo non vengono accettati in aereo ma possono essere trasportati solo via terra e solo se posti all'interno di un altro contenitore (**Fig. 7**) che viene "piombato". Dato che il contenitore non può essere sigillato, è sufficiente applicare una fascia chiusa firmata da un Operatore del Centro di provenienza che verrà poi aperta solamente dall'Operatore del Centro che riceve il materiale.

Nel caso in cui il materiale biologico crioconservato sia costituito da spermatozoi che devono essere utilizzati in giornata, è possibile inviare il materiale al Centro ricevente già pronto all'uso, dopo scongelamento e lavaggio.

Il materiale può così essere trasportato in contenitori sterili, sigillati ed identificati. Deve essere provvisto di un imballaggio esterno idoneo a mantenere la temperatura di stoccaggio o di trasporto indicata nelle procedure operative del laboratorio del centro PMA.

Tutti i contenitori e gli imballaggi utilizzati devono essere convalidati come idonei allo scopo.



Fig. 7.
Contenitore piombato.

CONFEZIONAMENTO DEL PACCO

Requisiti generali:

deve essere di buona qualità, resistente agli spostamenti cui dovrà essere sottoposto durante il trasporto. Dovrà essere assemblato in modo da prevenire ogni perdita che può essere causata in normali condizioni di trasporto da vibrazioni o cambi di temperatura, umidità e pressione.

Deve essere costituito da **tre componenti (Fig. 8)**, in modo da costituire un triplo involucre:

(a) contenitore primario: è il dispositivo che contiene il materiale biologico

(b) contenitore secondario;

(c) contenitore terziario rigido.

Il contenitore primario deve essere inserito nel secondario in modo che, in condizioni normali di trasporto, non possa rompersi, essere perforato o disperdere il contenuto nel conteni-

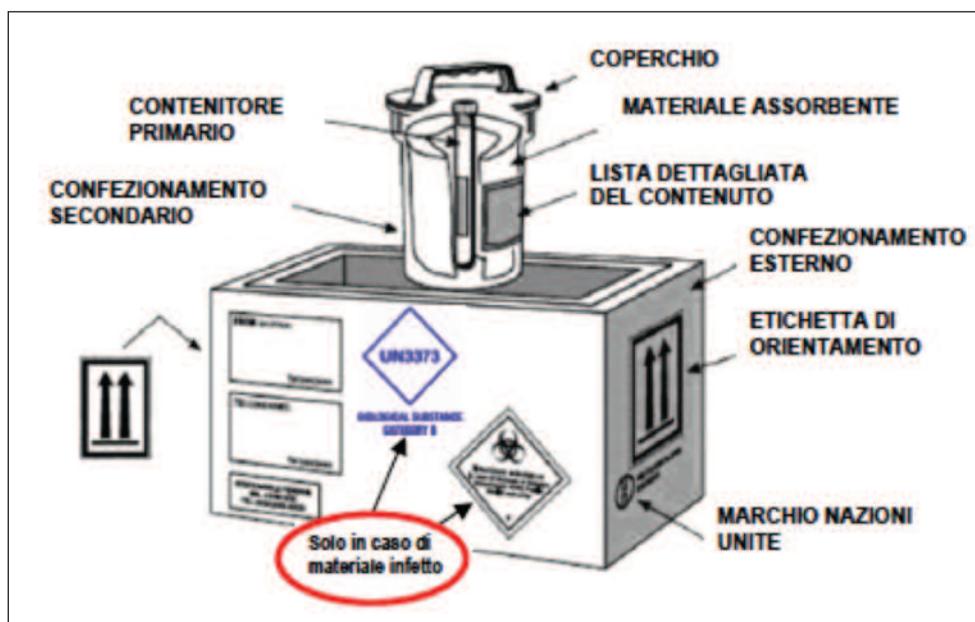


Fig. 8.

In caso di materiale non infetto si deve utilizzare l'etichetta: PRODOTTO BIOLOGICO; in caso di materiale infetto si deve utilizzare l'etichetta: BIOLOGICAL SUBSTANCE CATEGORY B UN3373

tore secondario. Quest'ultimo deve essere inserito nel contenitore terziario con materiale di imbottitura appropriato. Qualsiasi perdita del contenuto non deve compromettere l'integrità del materiale di imbottitura del contenitore terziario.

TRASPORTO VIA TERRA

Rispettando tutte le prescrizioni, è consentito l'utilizzo di contenitori Dry Shipper e di azoto liquido per trasporti in auto o treno.

TRASPORTO VIA AEREA

È consentito solamente il trasporto di Dry Shipper ma non di contenitori contenenti azoto liquido. L'USMAF richiede di compilare il seguente report di **ESENZIONE DI CONTROLLO RADIOGENO**, in modo che il materiale non venga sottoposto a questo controllo:

Data.....

Mittente:.....

Destinatario:.....

Oggetto: **Esenzione dal controllo radiogeno**

Il sottoscritto **Dott**..... in qualità di **Responsabile del Laboratorio PMA**....., attesta che la spedizione contiene **GAMETI UMANI MASCHILI E/O FEMMINILI** destinati a: **Dott.** **Centro**.....



stesso.

Si richiede che la spedizione non sia sottoposta a controllo radiogeno, perché i raggi X danneggerebbero in modo irreparabile il contenuto

Qualsiasi altro metodo di controllo che non esponga la spedizione a raggi X o equivalenti è utilizzabile

In fede

_FIRMA _____

Object; DO NOT X RAY REQUEST

I underline **Dott.**as **_Laboratory Director**.....

...certify that the shipment contains **Human female and/or male gametes** to be used for **Dott.** **Center**.....



I request that the shipment is not subjected to X RAY control, because the X ray damage irreparably the content of the shipment

Any other control which does not expose the shipment to X ray or equivalent can be used.

SIGNATURE _____

PROBLEMI CHE POSSONO PRESENTARSI AL MOMENTO DELL'ACCETTAZIONE DEL MATERIALE

Il Centro ricevente può rifiutare di accettare il materiale biologico al momento dell'arrivo qualora la documentazione non fosse completa (consensi, esami infettivologici risalenti alla data del congelamento o successivi, informazioni tecniche) o i campioni non fossero correttamente e chiaramente identificati (es. non identificati i singoli dispositivi oppure identificati solamente tramite un codice a barre).



In questi casi sarà necessario contattare il Centro di provenienza e sarà possibile accettare il materiale solo se le informazioni mancanti potranno essere recuperate.

Al momento dell'accettazione è inoltre necessario controllare che lo stato del contenitore criobiologico da trasporto sia corretto. Nel caso in cui vengano individuati dei problemi come ad esempio un materiale biologico non mantenuto a temperatura criogenica e giunto a destinazione scongelato per cause varie (durata del trasporto più lunga della dichiarata capacità del contenitore criobiologico di mantenere la temperatura criogenica, caduta del contenitore, temperatura ambientale eccessiva durante il trasporto), il Centro ricevente deve contattare quello di provenienza, dichiarare ai pazienti che il materiale potrebbe essere stato danneggiato dalle condizioni di trasporto non corrette e aprire una non conformità o una dichiarazione di evento avverso (vedi capitolo 11).

CONCLUSIONI

Il trasporto di materiale biologico crioconservato rappresenta sempre motivo di preoccupazione per tutte le persone coinvolte. Nel caso in cui il materiale biologico sia costituito da cellule germinali, si aggiunge l'aggravante della unicità.

Nello svolgimento di tali procedure è necessario predisporre ogni precauzione per la sicurezza del materiale e delle persone coinvolte e in modo che il trasporto venga eseguito e compiuto nei tempi e nelle condizioni ideali.

Per il trasporto sicuro sono molto importanti la programma-

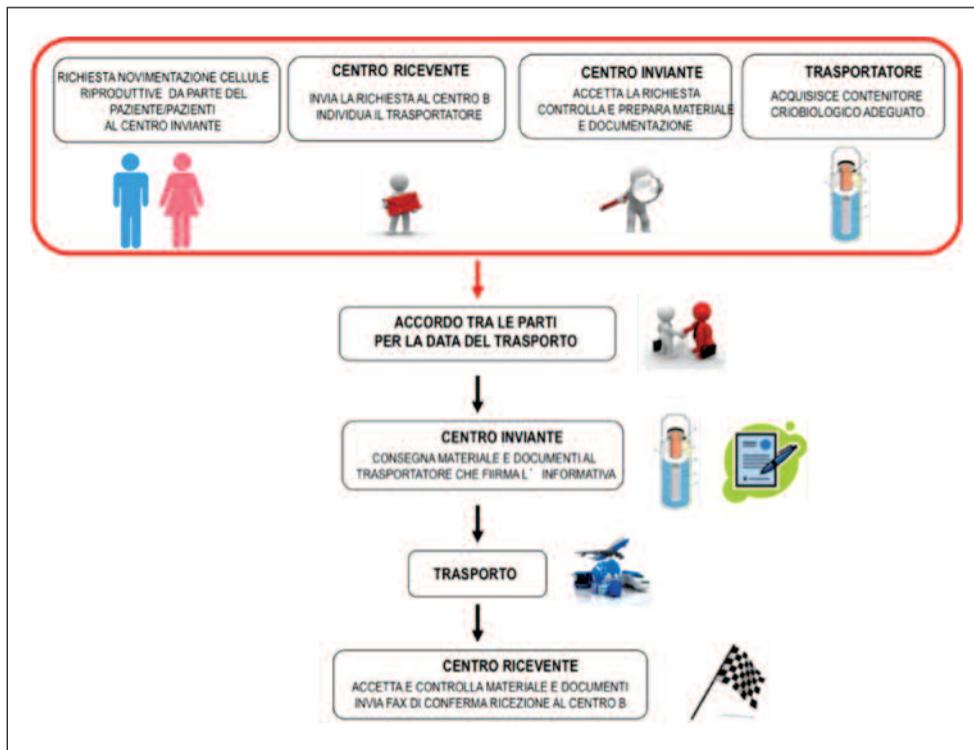


Fig. 9.

Flow chart del trasporto

Centro A: Centro che richiede la movimentazione del materiale (ricezione)

Centro B: Centro che ha il materiale richiesto in stoccaggio (provenienza)

zione e il coordinamento tra le varie componenti. Per questo motivo è consigliato individuare delle figure fondamentali per la buona riuscita della procedura. Il Referente del trasporto è, tra queste, molto importante perché prende in carico il lavoro, lo organizza, lo pianifica, controlla che la documentazione sia completa, che il materiale sia identificato, che l'attrezzatura di trasporto sia appropriata ed, infine, dopo essersi accertato del successo del trasporto, conclude la procedura. L'altra figura fondamentale è il Trasportatore che deve comprendere il significato e l'importanza del rispetto delle prescrizioni che gli vengono spiegate e fatte sottoscrivere dal Referente per poi assumersi la responsabilità di eseguire il trasporto in sicu-

rezza e qualità. In PMA, spesso il Trasportatore è il proprietario del materiale biologico e comprende bene il valore del materiale e l'importanza di rispettare le modalità di trasporto. Per la sicurezza del trasporto, sarebbe comunque consigliato rivolgersi ad un trasportatore autorizzato.

Naturalmente, a monte della sicurezza e qualità del trasporto, è di fondamentale importanza che i Centri che crioconservano e/o hanno in consegna il materiale, applichino le norme di qualità, sicurezza e tracciabilità per poter fornire, al momento del trasporto, tutte le indicazioni indispensabili ed un materiale correttamente crioconservato, stoccato, identificato ed idoneo all'utilizzo clinico.

BIBLIOGRAFIA

- Legge 40/2004.
- Decreti Legislativi N. 191/2007 e N. 16/2010.
- Decreto Legislativo N. 35/2010 (recepisce la Direttiva CE 2008/68/CE).
- Decreto M 10/10/2012.
- Decreto Legislativo N. 81/2008 Testo unico in materia di sicurezza sul lavoro.

LETTERATURA SCIENTIFICA:

- McDonald CA, Valluzzo L, Chuang L, Poleshchuk F, Copperman AB, Barritt J. Nitrogen vapor shipment of vitrified oocytes: time for caution. *Fertility and Sterility*. 2011;V. 95 N. 8 2628-2630.

CAPITOLO 9

TRATTAMENTO DELLE COPPIE POSITIVE O SIERODISCORDANTI ALLO SCREENING VIROLOGICO

OBIETTIVI

Negli ultimi anni le coppie in cui uno o entrambi i partner sono affetti da patologie infettive quali HIV, HCV o HBV, si sono rivolte sempre più spesso alla procreazione medicalmente assistita. Il loro desiderio di genitorialità è identico a quello di qualsiasi altra coppia; inoltre, il miglioramento della qualità e della aspettativa di vita, insieme con la maggior efficacia delle terapie farmacologiche, ha fatto sì che queste coppie trovassero nella procreazione medicalmente assistita un valido strumento per la realizzazione di tale desiderio.

Tale situazione può riguardare sia coppie per le quali sia stata effettuata una diagnosi di infertilità, sia coppie potenzialmente fertili che si rivolgono appositamente ad un centro di infertilità al fine di eliminare il rischio di contagio. Essendo infatti queste infezioni virali sessualmente trasmissibili con elevato rischio anche per il feto, costituiscono una causa ostativa alla riproduzione consentendo pertanto alle coppie in cui uno o entrambi i partner sono affetti da patologie infettive di accedere alle tecniche di riproduzione medicalmente assistita.

Il centro di procreazione medicalmente assistita che decide di trattare coppie positive o sierodiscordanti deve predisporre un sistema di gestione e controllo interno, atto a garantire la sicurezza per le coppie non infette trattate nel medesimo centro, per le coppie positive o sierodiscordanti stesse, per l'eventuale nascituro e per gli operatori.

INDICE

- **Procedura generale**
- **Esami diagnostici**
- **Impianto e organizzazione del laboratorio nella gestione del materiale infetto**
- **Gestione pratica del trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti**
- **Trattamento dell'uomo infetto**
- **Trattamento della donna infetta**
- **Crioconservazione del materiale infetto**
- **Pulizia e sanificazione**
- **Riferimenti bibliografici**

IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E TRACCIABILITÀ NEL LABORATORIO

PRIMA DEL TRATTAMENTO

- Scrivere Procedure Operative specifiche e aggiornarle periodicamente
- Predisporre percorsi separati (spazialmente o temporalmente) per la gestione dei materiali e delle cellule potenzialmente infettive
- Verificare la validità esami sierologici di Anti-HIV-1,2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV Ab ed eventualmente l'HTLV-I, malaria, Zika... per i pazienti esposti alle zone a rischio: validità di 90 giorni per il primo tentativo e di 180 giorni dal secondo in poi
- Predisporre almeno una banca di quarantena per conservare temporaneamente il materiale sottoposto a trattamento e in attesa del referto
- Se possibile, vaccinare per l'epatite B il personale così come il partner di un soggetto infetto da HBV

DURANTE IL TRATTAMENTO

- Limitare l'accesso del personale autorizzato ed adeguatamente istruito a quello strettamente necessario per l'effettuazione del trattamento
- Indossare i Dispositivi Individuali di Protezione
- Prevedere il maggior impiego possibile di materiale monouso
- Lavorare in modo pulito, contaminando meno strumentazione possibile e pulendo immediatamente eventuali stravasi accidentali
- Utilizzare incubatori differenti opportunamente segnalati e ben identificati per le diverse patologie
- Utilizzare banche separate per ogni patologia opportunamente segnalate e ben identificate per la crioconservazione dei gameti e degli embrioni ottenuti

DOPO IL TRATTAMENTO

- Eliminare tutti i rifiuti negli appositi contenitori per lo smaltimento di rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo (prestare particolare attenzione al materiale pungente e tagliente)
- Pulire e sanificare tutta la strumentazione, le attrezzature e gli ambienti utilizzati per il trattamento di materiali e cellule potenzialmente infetti
- Registrare tutte le operazioni effettuate sugli appositi registri

PROCEDURA GENERALE

Il laboratorio di procreazione medicalmente assistita che tratta coppie positive o sierodiscordanti deve assicurare requisiti di sicurezza e tracciabilità particolari e mettere a punto procedure operative specifiche. Tali procedure devono essere opportunamente scritte ed inserite nel Manuale Operativo e devono essere sottoposte a revisione periodica.

In particolare, devono essere stabiliti percorsi e modalità di trattamento e conservazione dei materiali infetti diversi e separati da quelli previsti per le coppie negative. Tali percorsi riguardano sia la gestione della coppia sia quella dei campioni, e devono coinvolgere anche i materiali, la strumentazione e le attrezzature che vengono utilizzate. La separazione dei percorsi può essere sia di tipo spaziale, utilizzando laboratori od aree del laboratorio differenti, o di tipo temporale, programmando il trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti in momenti diversi dai pazienti negativi. Questo può essere realizzato mettendo le sessioni di lavoro come ultime della giornata o concentrandole in periodi particolari dell'anno, appositamente dedicate ai soli pazienti positivi. Ovviamente in qualsiasi caso alla fine di ogni singolo trattamento dovrà essere predisposta una pulizia straordinaria della strumentazione e delle attrezzature utilizzate.

ESAMI DIAGNOSTICI



Tutte le coppie in procinto di iniziare un ciclo di procreazione medicalmente assistita devono obbligatoriamente effettuare i seguenti test biologici:



Anti-HIV-1,2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV Ab (DLG-16-2010, all. III, par.2.2). In caso di positività di HBcAb devono essere eseguiti ulteriori test per definire il rischio relativo a HBV (Tab. 1).

In aggiunta, deve essere effettuato anche il test per l'HTLV-I per pazienti che vivono o sono originari di aree geografiche con alta diffusione di tale virus, o che hanno partner o genitori provenienti da tali aree (DLG-16-2010, all. III, par.2.4). I campioni di sangue vanno prelevati non oltre 90 giorni prima dell'inizio del trattamento e ripetuti ogni sei mesi durante il trattamento (Conferenza Stato Regioni del 12-03-12, sezione C, par. 1.1).

Si specifica che la prescrizione e la valutazione della sierologia è esclusivamente di competenza medica e non del personale biologico e del laboratorio. Ad ogni modo si ritiene utile inserire nel presente capitolo una cartina riportante la diffusione nel mondo del virus HTLV-I (Fig.1) e una tabella per l'interpretazione dei marcatori del virus HBV (Fig. 2), a titolo puramente informativo.

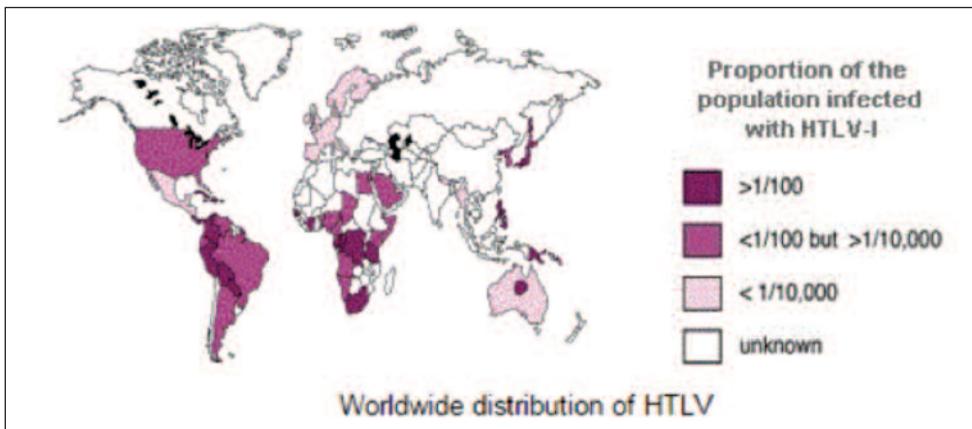


Fig. 1.
Diffusione nel mondo del virus HTLV-1.

Tabella1. L'interpretazione dei marcatori del virus HBV.

Interpretazione dei marcatori del virus HBV

HBsAg	HBcA b(IgM)	HBcAb (IgG)	HbsAb Anti-HBs	HBV- DNA	Diagnosi	Rischio contagio
+	-	-	-	-	Infezione recente (fase iniziale)	SI
+	-	-	-	+	Infezione (fase tardiva)	SI
+	+	+	-	+	Infezione attiva (+/- epatite)	SI
-	+	-	-	+	Infezione in risoluzione (+/- epatite)	SI
-	+	+	-	+/-	Infezione in risoluzione (+/- epatite)	SI
-	+/-	+	+	-	Guarigione iniziale	NO
-	-	+	+	-	Pregressa infezione	NO
-	-	+	-	-	Pregressa infezione	NO
+	-	+	-	+	Infezione cronica	SI
+	-	+	-	+/-	Portatore inattivo (HBV-DNA < 100.000 copie/ml)	SI
-	-	+/-	+/-	+	Infezione occulta	SI
-	-	-	+	-	Vaccinazione	NO

IMPIANTO E ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL MATERIALE INFETTO

Sebbene la normativa vigente non richieda spazi separati per la gestione del materiale infetto, è necessario verificare la corretta idoneità e sicurezza degli spazi e della strumentazione.



È consigliabile che il laboratorio sia equipaggiato con strumentazione e attrezzature specifiche per il trattamento e la manipolazione del materiale infetto. È quindi opportuno utilizzare strumenti dedicati e utilizzare materiali monouso in tutte le fasi di lavoro che lo consentono.

Nel caso in cui ciò non fosse possibile, bisogna predisporre una procedura di pulizia e decontaminazione appropriata e validata, che garantisca la disinfezione dopo l'uso.

Nello specifico è consigliabile utilizzare:

Materiale di consumo e piccola strumentazione: si raccomanda di utilizzare sempre se possibile materiale monouso e strumentazione dedicata. Ove questo non sia possibile, è bene identificare in modo chiaro la strumentazione necessaria, che deve comunque essere ridotta al minimo e pulita e sanificata, seguendo l'apposita procedura, dopo ogni suo impiego. In caso di separazione temporale dei trattamenti, è consigliabile identificare in modo chiaro le aree in cui verranno trattati i campioni infetti, che dovranno essere comunque il più limitate possibile e devono essere pulite e sanificate dopo ogni utilizzo. È fortemente sconsigliato l'uso di materiale tagliente

e pungente (aghi, siringhe, vetro, ecc.) per ridurre al minimo il rischio di contagio degli operatori.

Ove indispensabile, si raccomanda di utilizzare questo tipo di materiale con estrema cautela eliminandolo immediatamente dopo l'uso negli appositi contenitori per lo smaltimento di rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo taglienti e pungenti.

Cappa: nel caso in cui sia il partner maschile ad essere infetto, si raccomanda l'utilizzo di cappa a flusso laminare verticale di classe II che permette di garantire protezione sia all'operatore sia al campione trattato. La cappa deve essere utilizzata per la valutazione, la preparazione e la manipolazione di spermatozoi infetti. Nel caso in cui sia la partner femminile ad essere infetta, essendo necessario introdurre sotto cappa uno stereomicroscopio per la manipolazione di ovociti ed embrioni, la classe II non potrebbe comunque più essere garantita, pertanto è sufficiente l'impiego di una cappa a flusso laminare verticale. In entrambi i casi, deve essere garantito il grado A dell'aria, come previsto dalla normativa vigente.

Incubatori dedicati per la coltura embrionale.



All'interno dello stesso incubatore, deve essere trattata una sola patologia per volta.



Lo stesso, dopo opportuna sanificazione e pulizia, può essere riutilizzato per un'altra patologia o per coppie sieronegative. È inoltre necessario che gli incubatori destinati al trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti siano opportunamente segnalati e ben identificati quando vengono utilizzati per questo tipo di trattamenti.

Il numero di incubatori da dedicare alle coppie positive o sierodiscordanti deve essere stabilito anche sulla base del numero di cicli previsti e deve tenere conto della possibilità di avere due o più patologie in combinazione tra loro.

È consigliabile l'impiego di incubatori provvisti di ciclo di sterilizzazione.

4. Centrifuga dedicata al materiale seminale positivo.



È consigliabile disporre di una seconda centrifuga per il trattamento del seminale infetto. Qualora non fosse possibile, è consigliabile destinare alloggiamenti separati in cui gestire le diverse patologie. È buona norma procedere comunque con la sanificazione della centrifuga dopo ogni utilizzo, con le appropriate procedure di pulizia.

5. Stereo-microscopio e postazione per la micromanipolazione dedicati, se possibile.



In alternativa, prevedere la pulizia e sanificazione del piano di lavoro dopo ogni uso.

6. Micropipette e pipettatori dedicati o, dove possibile, monouso.



7. È obbligatorio l'impiego di banche separate per lo stoccaggio in azoto liquido di gameti ed embrioni (DLG-16-2010, all. III, par.2.2 e Conferenza Stato Regioni del 12-03-12, sezione B, par. 6.2).

Per escludere quindi il rischio di trasmissione di infezione tra campioni conservati.



È necessario dotarsi di banche separate e dedicate per ciascuna patologia trattata. È inoltre necessario avere almeno una banca di quarantena per conservare temporaneamente il materiale sottoposto a trattamento e in attesa del referto.



È consigliabile quando possibile impiegare dispositivi di stoccaggio ad alta sicurezza per la crioconservazione di gameti ed embrioni.

GESTIONE PRATICA DEL TRATTAMENTO DI COPPIE INFETTE O SIERODISCORDANTI

Il laboratorio di procreazione medicalmente assistita che intende trattare pazienti affetti o positivi per patologie virali, ha il compito di mettere in atto procedure di sicurezza interne specifiche e accurate al fine di garantire la sicurezza non solo dei pazienti con infettivologia negativa ma anche del personale e delle stesse coppie infette. È necessario che il centro di procreazione medicalmente assistita che tratta materiale infetto predisponga consensi informati specifici per i diversi trattamenti, che devono essere illustrati e fatti firmare dal medico responsabile del trattamento. Le coppie infette o sierodiscordanti devono essere adeguatamente ed esaustivamente informate dei possibili rischi ai quali potrebbero andare incontro, riguardanti sia il partner sano della coppia stessa sia il possibile nascituro.



A tal fine, è consigliato che una coppia sierodiscordante esegua, prima di intraprendere un percorso di procreazione medicalmente assistita, una visita da un medico infettivologo che rilasci una dichiarazione sulle condizioni di salute del/dei pazienti infetti e una specifica consulenza infettivologica. Tale consulenza è fortemente raccomandata qualora la positività dovesse riguardare la partner femminile al fine di mettere in atto tutte le terapie possibili per ridurre la viremia e tutelare l'eventuale gravidanza.

Le coppie devono essere informate circa i rischi di trasmissione verticale del virus e delle particolari procedure da effettuare in caso di parto (soprattutto in caso di donne positive). Devono inoltre essere informate anche del rischio di contaminazione orizzontale del partner sano. L'infettivologo inoltre valuterà lo stato di salute dei pazienti, prescrivendo gli esami e le eventuali terapie necessarie, e rilascerà una consulenza scritta in cui indicherà il momento più opportuno per iniziare il trattamento di procreazione medicalmente assistita. Prima di iniziare il trattamento, le coppie infette o sierodiscordanti dovranno sottoporsi agli esami clinici di laboratorio necessari. Premesso che tutti i campioni dovrebbero essere trattati come potenzialmente infetti, è comunque raccomandabile, al fine di ridurre il rischio di cross-contaminazione tra campioni biologici, che il materiale infetto che entra in laboratorio rimanga sempre confinato negli spazi appositamente dedicati. È buona norma evitare stravasi o schizzi di fluidi potenzialmente infetti (sperma e suoi derivati, fluido follicolare), nel caso in cui ciò dovesse accadere si rende necessario pulire

prontamente ed accuratamente le superfici contaminate in modo da evitare la dispersione del virus e possibili contaminazioni. Al termine delle procedure di manipolazione dei campioni bisogna pulire accuratamente tutte le superfici e gli strumenti utilizzati seguendo la corretta procedura di pulizia e sanificazione. Tutto il materiale monouso utilizzato deve essere eliminato immediatamente dopo l'uso. Inoltre, è indispensabile prestare la massima attenzione alla corretta eliminazione dei fluidi di scarto prodotti dalla pulizia e dalla coltura dei gameti e degli embrioni infetti: questi vanno chiusi in apposite provette per evitare la dispersione aerea ed eliminati con i rifiuti a rischio biologico.



Al fine di garantire la massima sicurezza per gli operatori, è bene che questi si proteggano adeguatamente durante tutte le operazioni di manipolazione del materiale biologico infetto o potenzialmente infetto, utilizzando propriamente i dispositivi di protezione individuale (DPI), che devono essere forniti dalla struttura presso la quale si lavora.

Questi sono costituiti da: guanti monouso, abbigliamento monouso da indossare sopra il normale abbigliamento da laboratorio, occhiali o visiera di protezione (prestando attenzione che sia presente anche la protezione laterale degli occhi) e mascherina. Tutti i DPI vanno regolarmente mantenuti e controllati, seguendo le specifiche istruzioni date dal fornitore.



Inoltre, è buona prassi che tutti gli operatori del centro, così come il partner di un soggetto infetto da HBV, siano vaccinati per l'epatite B.

È necessario che solo il personale autorizzato ed adeguatamente istruito si occupi della gestione del materiale infetto. In caso di contaminazione accidentale del personale con materiale infetto, è bene rivolgersi immediatamente ad un infettivologo ed avviare le adeguate procedure di profilassi. Infine è raccomandato che sia installato vicino al laboratorio un lavaocchi per consentire il lavaggio veloce in caso di contatto accidentale delle mucose con gli agenti infettivi.

Il trattamento di coppie infette o sierodiscordanti può essere effettuato in un centro di PMA, purché il laboratorio sia in grado di garantire adeguati parametri di sicurezza come quelli descritti nel presente capitolo.

Si riporta a titolo informativo, una rappresentazione schematica riassuntiva sulla gestione generale dei pazienti infetti (Fig. 2), specificando che la decisione di iniziare o meno un dato ciclo di trattamento è di esclusiva competenza medica.

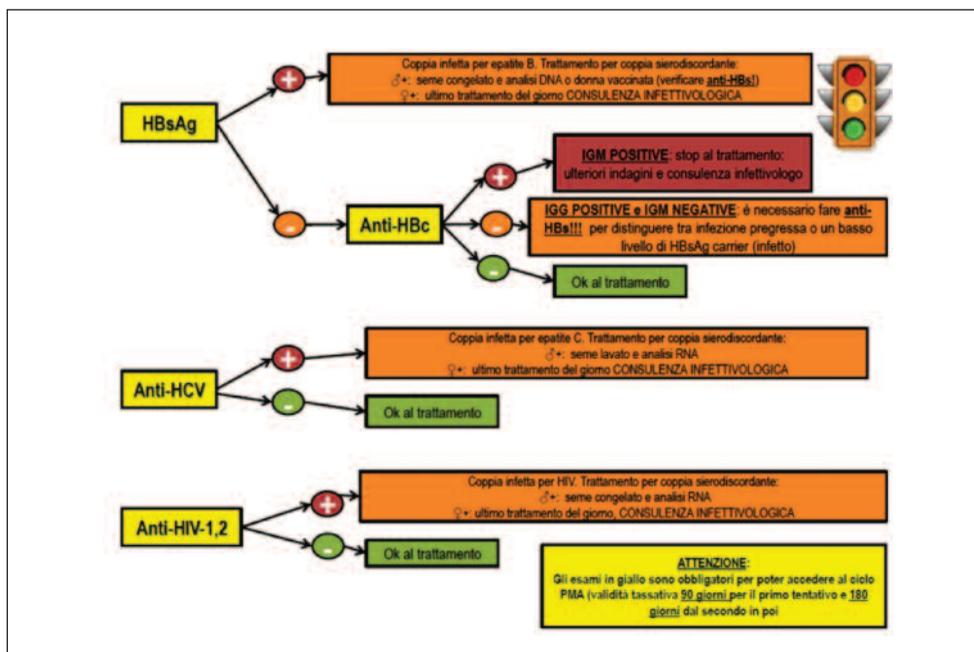


Fig. 2. Gestione dei pazienti infetti.

TRATTAMENTO DELL'UOMO INFETTO

Il contenitore del liquido seminale viene posizionato sotto la cappa dedicata e, dopo liquefazione, viene valutato per i classici parametri seminali. Il campione viene quindi sottoposto al trattamento di preparazione mediante gradiente di densità seguito da un successivo *swim-up* (preferibile) o lavaggio (a seconda delle caratteristiche di base del liquido seminale) in terreno di coltura idoneo per gli spermatozoi mediante centrifugazione (*spermwashing*). Al termine di tale procedura si valuta la concentrazione del campione, si diluisce con una quantità adeguata di terreno di lavaggio e si separa un'aliquota che viene inviata al laboratorio per la valutazione della presenza del virus mediante tecnica di PCR. La restante parte del campione viene addizionata con il crioprotettore e congelata. È consigliabile effettuare il congelamento in supporti chiusi e sigillati (*cryovials* o *paillettes* ad alta sicurezza). Il seme congelato viene quindi posizionato in un bidone di quarantena predisposto ed ad uso esclusivo del campione in esame in attesa del referto di laboratorio.

Se il referto certificherà la negatività del campione, lo stesso verrà spostato dalla quarantena alla banca predisposta per i liquidi seminali negativi, in attesa del suo utilizzo.

Se il referto certificherà la positività del campione, il campione verrà spostato dalla quarantena alla banca predisposta per i liquidi seminali positivi per la patologia in esame e la banca di quarantena sanificata e decontaminata prima di un qualsiasi successivo utilizzo. Tale operazione di pulizia può essere affidata ad una ditta specifica, che rilascerà un certificato, oppure fatta direttamente dal personale di laboratorio secondo le procedure operative scritte. È opportuno sottolineare che

nella banca di quarantena può essere contenuto un solo campione per volta in attesa di referto, per evitare la cross-contaminazione qualora solo uno dei due risultasse positivo.

TRATTAMENTO DELLA DONNA INFETTA

Il prelievo ovocitario viene eseguito secondo la normale procedura chirurgica.



È fortemente consigliato programmare l'intervento in coda all'attività clinica della giornata.

Le provette vengono portate direttamente sotto la cappa predisposta. È consigliabile che la cappa sia foderata utilizzando telini sterili monouso, lasciando scoperta solo la luce dello stereomicroscopio.

I complessi cumulo-ovocita recuperati vengono lavati sequenzialmente per almeno due volte in terreno specifico e posizionati nell'incubatore dedicato.

Tutte le procedure di manipolazione devono essere effettuate sotto cappa specifica, inclusa quella di decumulazione ed eventuale crioconservazione. Anche in questo caso è preferibile, ove possibile, effettuare la crioconservazione di ovociti ed embrioni in sistemi chiusi.

La ICSI andrà effettuata sulla stazione di micromanipolazione predisposta, avendo molta cura a non ferirsi con gli aghi da iniezione.

Nel caso di congelamento, i supporti con gli ovociti/embrioni congelati andranno posizionati nella banca preposta a seconda della patologia virale in questione.

CRIOCONSERVAZIONE DEL MATERIALE INFETTO



In caso di trattamento di coppie infette o sierodiscordanti, dato il rischio di trasmissione di infezione, è obbligatorio dotarsi di banche dedicate specifiche per la patologia infettiva. In particolare, i campioni dei soggetti positivi per HIV, HBV e HCV, devono essere conservati in banche separate da quelle contenenti campioni negativi e da quelle dei campioni di cui manca una documentazione certa di negatività. In aggiunta, il Centro può disporre un tank di quarantena per eventuali campioni in attesa di referto.

È importante sottolineare che lo stoccaggio in azoto liquido è l'unica situazione in cui grandi quantità di materiale biologico proveniente da pazienti diversi sono mantenute insieme in un liquido comune.



Pertanto, sarebbe fortemente consigliato, ove possibile, l'impiego di sistemi di crioconservazione sigillati ad alta sicurezza.

L'utilizzo di vapori di azoto per la crioconservazione è efficace per crioconservazioni a breve termine e per i trasporti. Tuttavia, non si conoscono gli effetti su gameti ed embrioni della crioconservazione a lungo termine nei vapori di azoto. Inoltre, funghi e batteri sono stati descritti anche nella fase gassosa. Un'altra soluzione proposta è la filtrazione dell'azoto liquido, che è comunque una procedura complessa e di non sicura efficacia. Infine, la sterilizzazione dell'azoto può essere impie-

gata durante le procedure di congelamento e scongelamento (è stato riportato che tre risciacqui consecutivi in azoto sterile possono eliminare funghi e batteri) ma è di difficile applicazione per lo stoccaggio nella banche a lungo termine.

Per quanto riguarda la movimentazione di campioni infetti congelati tra Centri di procreazione medicalmente assistita, va ricordato che devono essere rispettate tutte le norme prescritte per i campioni positivi e opportunamente descritte nell'apposito capitolo del presente manuale, tenendo presente che è essenziale fornire tutta la documentazione sierologica relativa al campione trasportato.



È inoltre fortemente consigliato l'utilizzo di contenitori di trasporto monouso.

PULIZIA E SANIFICAZIONE



Tutta la strumentazione e i piani di lavoro impiegati nel trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti devono essere puliti e sanificati al termine di ogni utilizzo e comunque alla fine di ogni ciclo di trattamento, prima di poterli destinare ad un nuovo ciclo.



È fortemente consigliato che questo avvenga anche in quei laboratori in cui la strumentazione (cappe, incubatori, micromanipolatori, microscopi, centrifughe, ecc.) è interamente dedicata al trattamento delle coppie infette, diversa da quella utilizzata per il trattamento dei pazienti negativi.



È consigliabile utilizzare l'autoclave per sterilizzare tutto il materiale e la strumentazione che lo consente (ad esempio ripiani e vaschette degli incubatori, pinze per la manipolazione in azoto liquido).

Per effettuare la pulizia di materiali e strumenti non autoclavabili, è possibile procedere passando prima con garze sterili imbevute di acqua sterile, quindi utilizzare soluzioni contenenti ammonio quaternario, etanolo o ipoclorito di sodio ed infine lasciando asciugare all'aria.

Si aspettano quindi circa venti minuti prima di ricominciare una nuova attività.

Esistono in commercio diverse soluzioni già pronte all'uso, non tossiche per gli embrioni, che hanno effetto disinfettante su batteri, funghi, e alcuni virus e che possono essere utilizzate seguendo le istruzioni di uso fornite con il prodotto stesso.

È bene prestare attenzione nel pulire tutte le parti e gli interstizi di strumenti e piani di lavoro dove è stato eseguito il trattamento del materiale infetto.

L'utilizzo di sistemi a raggi ultravioletti sembra non essere particolarmente efficace per l'eliminazione di patogeni virali, in quanto hanno principalmente un'azione batteriostatica e non hanno invece grande capacità di penetrazione dei materiali. Inoltre devono essere utilizzate con cautela e a distanza dagli operatori, essendo agenti mutageni e dannosi per gli occhi.

È necessario riportare la documentazione di avvenuta pulizia e sanificazione di strumentazione e piani di lavoro in un apposito registro.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

GENERALI

- Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ, Remohí J. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2012;97(1):74-8.
- Coccia ME, Cammilli F, Ginocchioni L, Rizzello F. Role of infection in in vitro fertilization treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1034:219-35.
- Coccia ME, Ruzzello F. Management della patologia infettiva nella coppie sterile. In *Medicina della Riproduzione Umana*. Borini, Ubaldi, CIC edizioni. 2010.
- Elder K, Baker DJ, Ribes JA. *Infections, Infertility, and Assisted Reproduction*. Cambridge University Press, New York, USA. 2005.
- Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vannin AS, Emiliani S, Delbaere A. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):149-62.
- ESHRE position paper on the EU Tissues and Cells Directive EC/2004/23, November 2007.
- Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Human Immunodeficiency virus and infertility treatment. *Fertil Steril*. 2010;94(1):11-5.
- Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, van Inzen W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod*. 2000;15(10):2241-6.
- Hughes C, Grundy K, Emerson G, Mocanu E. Viral screening at the time of each donation in ART patients: is it justified? *Hum Reprod*. 2011;26(11):3169-72.
- Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L; Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1253-62.
- Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1181-8.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Guidelines for Reducing the risk of viral transmission during fertility treatment. *Fertil Steril*. 2008;90:S156-62.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Hepatitis and reproduction. *Fertil Steril*. 2008;90:S226-35.
- Shenfield F, Pennings G, Cohen J, Devroey P, Tarlatzis B, Sureau C; ESHRE ETHICS and LAW Task Force. Taskforce 8: ethics of medically assisted fertility treatment for HIV positive men and women. *Hum Reprod*. 2004;19(11):2454-6.

HIV

- Barnes A, Riche D, Mena L, Sison T, Barry L, Reddy R, Shwayder J, Parry JP. Efficacy and safety of intrauterine insemination and assisted reproductive technology in populations serodiscordant for human immunodeficiency virus: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014;102(2):424-34.
- Cardona-Maya W1, Velilla P, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT. Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: changes in the semen parameters. *Curr HIV Res*. 2009;7(4):418-24.
- Dimitrakopoulos AA. HIV and gamete interactions. *Hum Fertil (Camb)*. 2003;6(2):81-3.
- Douglas NC, Wang JG, Yu B, Gaddipati S, Guarnaccia MM, Sauer MV. A systematic, multidisciplinary approach to address the reproductive needs of HIV-seropositive women. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):257-63.
- Garrido N, Meseguer M, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod*. 2005;20(4):1028-34.
- Gilling-Smith C, Nicopoullos JD, Semprini AE, Frodsham LC. HIV and reproductive care—a review of current practice. *BJOG*. 2006;113(8):869-78.
- Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS*. 2006;24;20(7):967-73.
- Kim LU, Johnson MR, Barton S, Nelson MR, Sontag G, Smith JR, Gotch FM, Gilmour JW. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. *AIDS*. 1999;16;13(6):645-51.
- Manigart Y, Rozenberg S, Barlow P, Gerard M, Bertrand E, Delvigne A. ART outcome in HIV-infected patients. *Hum Reprod*. 2006 Nov;21(11):2935-40.
- Nicopoullos JD, Almeida P, Vourliotis M, Goulding R, Gilling-Smith C. A decade of the sperm-washing programme: where are we now? *Hum Fertil (Camb)*. 2010;13(2):90-7.
- Pasquier C, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, Massip P, Puel J, Bujan L, Izopet J. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS*. 2000 Sep 29;14(14):2093-9.
- Sauer MV. Sperm washing techniques address the fertility needs of HIV-seropositive men: a clinical review. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(1):135-40.
- Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, Albani E, Oneta M, Pardi G. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet*. 1992;28;340(8831):1317-9.

- van Leeuwen E, Repping S, Prins JM, Reiss P, van der Veen F. Assisted reproductive technologies to establish pregnancies in couples with an HIV-1-infected man. *Neth J Med*. 2009;67(8):322-7.
- Vitorino RL, Grinsztejn BG, de Andrade CA, Hökerberg YH, de Souza CT, Friedman RK, Passos SR. Systematic review of the effectiveness and safety of assisted reproduction techniques in couples serodiscordant for human immunodeficiency virus where the man is positive. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1684-90.

HBV

- Hu XL, Zhou XP, Qian YL, Wu GY, Ye YH, Zhu YM. The presence and expression of the hepatitis B virus in human oocytes and embryos. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1860-7.
- Lam PM, Suen SH, Lao TT, Cheung LP, Leung TY, Haines C. Hepatitis B infection and outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer treatment. *Fertil Steril*. 2010;93(2):480-5.
- Lee VC, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Impact of positive hepatitis B surface antigen on the outcome of IVF treatment. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(5):712-7.
- Lutgens SP, Nelissen EC, van Loo IH, Koek GH, Derhaag JG, Dunselman GA. To do or not to do: IVF and ICSI in chronic hepatitis B virus carriers. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2676-8.
- Nie R1, Jin L, Zhang H, Xu B, Chen W, Zhu G. Presence of hepatitis B virus in oocytes and embryos: a risk of hepatitis B virus transmission during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1667-71.
- Oger P, Yazbeck C, Gervais A, Dorphin B, Gout C, Jacquesson L, Ayel JP, Kahn V, Rougier N. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(2):207-12.
- Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995;15;346(8968):137-40.

HCV

- Abou-Setta AM. Transmission risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? *Hum Reprod*. 2004;19(12):2711-7.
- Devaux A, Soula V, Sifer C, Branger M, Naouri M, Porcher R, Poncelet C, Neuzaz A, Alvarez S, Benifla JL, Madelenat P, Brun-Vezinet F, Feldmann G. Hepatitis C virus detection in follicular fluid and culture media from HCV+ women, and viral risk during IVF procedures. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2342-9.
- Garrido N, Meseguer M, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod*. 2005;20(4):1028-34.

ALTRI PATOGENI

- Coppus SF, Land JA, Opmeer BC, Steures P, Eijkemans MJ, Hompes PG, Bossuyt PM, van der Veen F, Mol BW, van der Steeg JW. Chlamydia trachomatis IgG seropositivity is associated with lower natural conception rates in ovulatory subfertile women without visible tubal pathology. *Hum Reprod.* 2011;26(11):3061-7.
- Eggert-Kruse W, Reuland M, Johannsen W, Strowitzki T, Schlehofer JR. Cytomegalovirus (CMV) infection—related to male and/or female infertility factors? *Fertil Steril.* 2009;91(1):67-82.
- Foresta C, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Garolla A. Semen washing procedures do not eliminate human papilloma virus sperm infection in infertile patients. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1077-82.
- Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, Ferlin A. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One.* 2011;7(6):e15036.
- Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, et al. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem? *Int J Androl.* 2011;34(3):242-6.
- Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1723-7.
- Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril.* 2010;93(3):802-6.
- Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011;23(4):232-7.
- Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol.* 2013;100(1):20-9.
- Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, Surcel HM, Paavonen J, Tiitinen A. The role of Chlamydia trachomatis infection in male infertility. *Fertil Steril.* 2009;91:1448-50.

CRIOCONSERVAZIONE

- Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 2000;40(2):110-6.
- Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 2003;46(2):146-52.
- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod.* 2009;24(10):2457-67.
- Cobo A, Romero JL, Pérez S, de los Santos MJ, Meseguer M, Remohí J. Storage

- of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1903-7.
- Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;15;11:41.
 - Hashimoto S, Amo A, Hama S, Ohsumi K, Nakaoka Y, Morimoto Y. A closed system supports the developmental competence of human embryos after vitrification : Closed vitrification of human embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(3):371-6.
 - Morris GJ. The origin, ultrastructure, and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. *Cryobiology*. 2005;50:231-8.
 - Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *ReprodBiomed Online*. 2004;9(2):134-51.
 - Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1525-8.
 - Parmegiani L, Rienzi L. Hermetical goblets for cryostorage of human vitrified specimens. *Hum Reprod*. 2011;26(11):3204-5.
 - Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. 2012 Oct;98(4):870-5.

CAPITOLO 10

STRUMENTI PER IL MIGLIORAMENTO

OBIETTIVI

Il presente capitolo si pone come obiettivo quello di poter consegnare nelle mani di chi lo legge strumenti atti al miglioramento all'interno di ogni centro di fecondazione assistita. Questi strumenti possono facilmente essere adottati e modificati a seconda delle esigenze e degli obiettivi descritti nel controllo di gestione per la qualità del centro stesso.

Nell'ottica del miglioramento continuo non può non essere presa in considerazione l'analisi del rischio in quanto i due concetti sono strettamente interconnessi.

INDICE

- **Il rischio nella procreazione medicalmente assistita**
- **Sistemi di identificazione e gestione del rischio**
 - FMEA/FMECA
 - RCA
- **Strumenti per la gestione del rischio:**
 - definizione organigramma
 - indicatori
 - checklist
 - sistemi di monitoraggio strumenti e ambienti di stoccaggio materiale biologico
 - tracciabilità e witnessing
- **Conclusioni**
- **Bibliografia**
- **Allegati**

STRUMENTI PER IL MIGLIORAMENTO

DEFINIRE I SINGOLI PROCESSI



**ESEGUIRE I PROCESSI SECONDO
PROCEDURE OPERATIVE DEFINITE**



MISURARE
• INDICATORI
• CHECK LIST
• SISTEMI MONITORAGGIO



ANALIZZARE/CONTROLLARE
• ANALISI FMEA
• ANALISI RCA



MIGLIORARE

IL RISCHIO NELLA PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

Errare è umano e *“we cannot change the human condition but we can change the conditions in which humans act”* (Reason, 2000). Il rischio non può essere eliminato ma può essere ridotto introducendo sistemi in grado di limitare il verificarsi dell'errore umano e tecnologico.

La procreazione medicalmente assistita rappresenta un campo in cui l'errore può presentarsi a qualsiasi livello: dal momento della identificazione del soggetto al trattamento vero e proprio con manipolazione di gameti ed embrioni. Fonti di rischio possono presentarsi a livello clinico, laboratoristico e organizzativo.

Ogni sistema di analisi e controllo dell'errore si basa sul principio del ciclo di Deming (Fig. 1), schematizzato come segue: **FASE “PLAN”**: identificare quali processi vogliamo mantenere monitorati e con quali obiettivi di riferimento, proporre ipotetici indicatori; stabilire la corretta modalità di calcolo per ognuno; associare ad ogni indicatore l'unità di misura corri-



Figura 1
Ciclo di Deming.

spondente; stabilire la periodicità e la modalità della loro rilevazione (prendere in considerazione strumenti informatici che possano essere di supporto in questo compito); stabilire chi dovrà avere accesso ai dati; stabilire le responsabilità per la loro gestione (raccolta dati e loro distribuzione); stabilire le responsabilità relative alla loro analisi;

scegliere tra tutti gli indicatori proposti quello che più si avvicina ad avere le caratteristiche sopra elencate.

FASE "DO": misurare le performance, raccogliere i dati, comunicare i dati raccolti.

FASE "CHECK": analizzare e valutare i dati raccolti, analizzare le procedure ed eventuali errori.

FASE "ACT": prendere delle decisioni volte al miglioramento del sistema di misurazione e monitoraggio.

Questo monitoraggio consente l'analisi degli aspetti critici anche in un'ottica di scambio di esperienze tra centri che è di fondamentale importanza nell'ottica del miglioramento continuo.



È interessante visionare anche esempi europei di gestione del rischio nel campo della fecondazione assistita.

L'HFEA (*Human Fertilisation and Embryology Authority*) ad esempio elabora report biennali sulla raccolta di tutti gli eventi avversi pervenuti nell'ottica del miglioramento (*Adverse incidents in fertility clinics: lesson to learn 2010-2012*). Annualmente l'HFEA riceve circa 500/600 report di errori o incidenti classificati per grado di severità e tipologia (Fig. 2), e considerando che annualmente i cicli in UK sono circa 60.000, l'1% provoca una reazione avversa.

Dalla Figura 2 emerge inoltre che il maggior numero di incidenti riportati all'HFEA dal 2010 al 2012 sono da imputare ad errori clinici, al secondo posto vi sono invece gli errori di laboratorio.

La qualità del servizio offerto dal laboratorio dipende principalmente dalla qualità dei protocolli e dei metodi utilizzati, dalla qualità degli strumenti utilizzati e dal grado di espe-

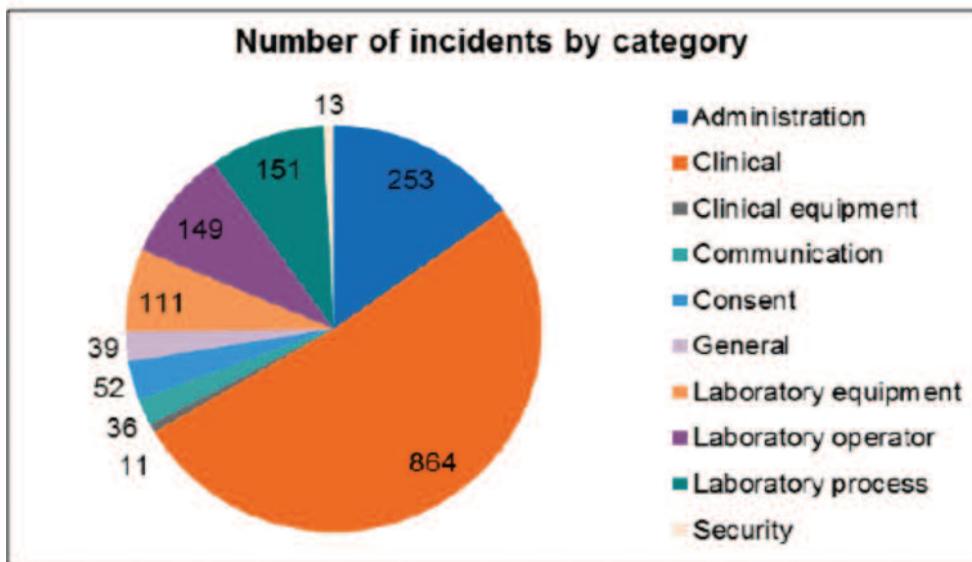
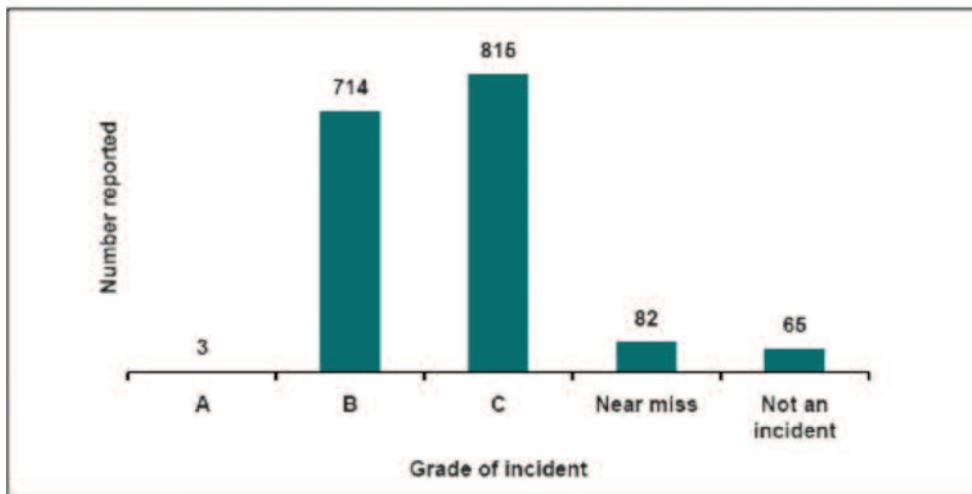


Figura 2
"Adverse incidents in fertility clinics: lesson to learn 2010-2012, HFEA". (A) Grado A=evento maggiormente grave che è raro si presenti; Grado B=evento serio che può accadere ma occasionalmente; Grado C=evento avverso con alta probabilità che si presenti; Near miss=un errore che è stato corretto prima di arrivare al danno; Not an incident=danni che non rientrano nelle tabelle di rischio identificate dall'HFEA; (B) numero di incidenti riportati alla autorità divisi per categorie.

rienza degli operatori. Di conseguenza i possibili errori relativi al laboratorio possono derivare da:

- danno agli strumenti
- errori imputabili all'operatore
- errori di processo

DANNO AGLI STRUMENTI

All'interno di questo gruppo sono compresi gli errori collegati ad un non corretto funzionamento degli strumenti all'interno del laboratorio.

Le situazioni che si possono manifestare sono diverse e vanno prese in considerazione e studiate per prevenirle.

Danno agli strumenti	Azione preventiva consigliata
Mancato funzionamento sistema di allarme su strumenti e contenitori criogenici	Eeguire verifiche periodiche per garantire un corretto funzionamento
Chiusura per distorsione dei tubi che portano la miscela di gas agli incubatori	Verificare alla chiusura giornaliera del laboratorio il corretto posizionamento delle macchine e il corretto posizionamento dei collegamenti agli incubatori. Permettere l'entrata solo di personale autorizzato
Mancanza corrente	Istituzione gruppo elettrogeno di continuità
Impossibilità di utilizzo di alcuni strumenti critici	Istituzione di una convenzione con altro centro autorizzato per trasferimento dei pazienti in trattamento

ERRORI IMPUTABILI ALL'OPERATORE

Errori che possono essere dovuti ad una disattenzione o distrazione per l'operatore ma che possono portare ad un danno irreversibile e grave per la coppia.

Errori imputabili all'operatore	Azione preventiva consigliata
Piastre contenenti gameti ed embrioni eliminate erroneamente	Istituire procedure che assicurino un attento controllo prima di eliminare la piastra con un testimone sempre presente, eseguire una corretta formazione per gli operatori prima di iniziare le procedure pratiche
Pipette accidentalmente danneggiate o urtate con conseguente perdita di campione	Evitare di spostare tutti gli embrioni/gameti in una sola volta quando il loro numero lo consente
Rottura di uno strumento durante il ciclo di trattamento	Se possibile avere un secondo strumento a disposizione (es. micromanipolatore) o avere convenzioni con altro centro per il trasferimento del materiale e il proseguimento del trattamento
Esecuzione di una inseminazione tramite ICSI in maniera non adeguata, errata scelta dell'embrione da trasferire (ad esempio dopo screening genetico), non corretta etichettatura del campione	Eeguire ogni procedura sempre con un testimone al fianco, seguire ogni passaggio della procedura operativa standard, evitare distrazioni il più possibile

ERRORI DI PROCESSO

Questa tipologia di errori può verificarsi quando non vi è un corretto adempimento della procedura e la procedura stessa non è stata elaborata nel modo corretto.

Ogni centro deve quindi possedere procedure che consentano una accurata valutazione e gestione del rischio in ogni parte che compone un trattamento di procreazione medicalmente assistita, dal primo colloquio con la coppia al trasferimento

Errori di processo	Azione preventiva consigliata
Gameti/embrioni spostati dalla piastra senza una corretta etichettatura della piastra nuova	Utilizzo di una procedura dettagliata e costante presenza di un testimone
Trasferimento di embrioni appartenenti ad una altra coppia	Utilizzo di una procedura di trasferimento embrionario che preveda più passaggi che devono tutti necessariamente prevedere la presenza di un testimone. Recuperare dagli incubatori una piastra alla volta, chiedere più volte alla paziente di identificarsi
Materiale criopreservato spostato da un alloggiamento ad uno nuovo senza tracciare il cambio sugli opportuni supporti cartacei e/o elettronici	Utilizzo di una procedura dettagliata e costante presenza di un testimone, uso di checklist

embrionario. Per fare questo il personale responsabile del centro potrà avvalersi dell'utilizzo di specifici strumenti (Tab. 1)

SISTEMI DI INDIVIDUAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO

Il professore e psicologo Reason J. (2000) ha proposto un modello di rischio definito *Swiss Cheese Model* (formaggio svizzero), in cui identifica la possibilità di accadimento di un evento avverso nel superamento delle barriere di difesa (le singole fette del formaggio) mediante l'allineamento dei buchi del formaggio stesso che consente alle debolezze presenti nel sistema ed agli errori latenti di concretizzarsi (Fig. 3). In un mondo ideale ogni strato dovrebbe essere intatto, invece presenta dei

Tabella1. Sistemi di individuazione del rischio e strumenti per la sua gestione.

Sistemi di individuazione e gestione del rischio	Azione	Tipo di risposta	Scopo
1 FMEA <i>Failure mode and effects analysis</i>	Preventiva	Proattiva	Prevenire l'evento avverso in modo che non si presenti
FMECA <i>Failure mode, effects, and criticality analysis</i>	Preventiva	Proattiva	Prevenire l'evento avverso in modo che non si ripresenti indagando il grado di severità delle possibili conseguenze
2 RCA <i>Root cause analysis</i>	Correttiva: l'evento avverso è già presente	Reattiva	Identificare azioni appropriate per individuare la causa ed evitare il suo ripresentarsi
Strumenti per la Gestione del Rischio e per il miglioramento continuo			
1 DEFINIZIONE ORGANIGRAMMA	Preventiva	Proattiva	Definizione dei ruoli e di una corretta formazione, evitando sovrapposizioni o dimenticanze procedurali
2 INDICATORI	Preventiva	Proattiva	Accertatori di risultato, monitoraggio di sistema
3 CHECKLIST	Preventiva	Proattiva	Garantire al personale una conoscenza uniforme di tutta la procedura evitando dimenticanze
4 SISTEMI DI MONITORAGGIO STRUMENTI E AMBIENTI DI STOCCAGGIO MATERIALE BIOLOGICO	Preventiva	Proattiva	Prevenire l'evento avverso utilizzando sistemi elettronici di monitoraggio
5 TRACCIABILITÀ E WITNESSING	Preventiva	Proattiva	Prevenire l'errore assicurando un sistema di doppio controllo del personale "witness"

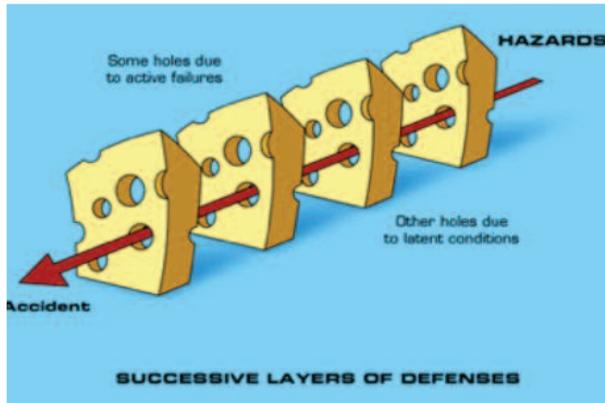


Figura 3
Swiss Cheese Model.

“buchi” che solo nel caso in cui si allineino creano una traiettoria che porta inevitabilmente al verificarsi dell’errore.

Quindi un buon sistema di gestione per la qualità cerca di ridurre la frequenza di

tali errori evitando l’allinearsi di eventuali buchi nel sistema e gli strumenti a nostra disposizione sono diversi.

Tra gli strumenti utilizzati per il controllo dei processi e per diminuire la loro variabilità, si cominciano ad utilizzare anche in ambito sanitario tecniche di analisi già utilizzate da decenni in ambito industriale (soprattutto nell’industria aeronautica e automobilistica). Tra queste vi sono la *Failure Mode and Effects Analysis* (FMEA), la *Failure Mode and Effects Criticality Analysis* (FMECA), la *Root Cause Analysis* e l’utilizzo di checklist. Questi strumenti possono essere “proattivi” o “reattivi” a seconda che il rischio sia rispettivamente un evento avverso già presente o che sia un evento che può accadere e che va prevenuto.

Vengono invece denominati indicatori quei processi che non riguardano le catastrofi, ma sono accertatori del risultato, permettendo il monitoraggio di tutto il sistema e valutando, in termini di risultato, ogni minima modifica in ogni singolo processo del sistema, garantendo così il monitoraggio di modifiche e l’impossibilità dell’instaurarsi di “vizi di sorta” (Tab. 2).

FMEA (FAILURE MODE AND EFFECTS ANALYSIS) - FMECA (FAILURE MODE AND EFFECTS CRITICALITY ANALYSIS)

La FMEA è un'analisi di tipo qualitativo intesa ad identificare quello che potrebbe succedere (guasto/errore). La FMECA aggiunge un percorso di tipo quantitativo orientato all'assunzione di decisioni operative coerenti, infatti incorpora alla analisi il grado di severità delle possibili conseguenze e le rispettive probabilità che si verifichino.

Nell'uso corrente quando si parla di FMEA si intende la FMECA. In ambito sanitario la FMECA può essere definita come *“una valutazione prospettica che identifica e migliora gli step di processo in modo tale da assicurare un outcome sicuro e clinicamente desiderabile”*. Questo tipo di analisi può essere divisa in diversi passaggi, il primo step è quello di identificare il contesto e di mappare i singoli processi, il secondo step è quello di identificare per ogni processo i possibili modi di fallimento e poi di stabilire le possibili conseguenze di questi fallimenti. Dopo queste operazioni sarà necessario identificare le cause e stabilire la possibilità che questo fallimento accada e la gravità del fatto. Tutti gli steps che compongono l'intero processo di fecondazione *in vitro* possono essere sottoposti ad analisi FMEA (Tab. 2).

La frequenza di accadimento del fallimento e la gravità devono essere assegnati identificando delle scale che ogni centro di IVF deve costruirsi. L'FMEA è quindi una tecnica di analisi preventiva per la pianificazione della qualità che consente di identificare i punti deboli nell'esecuzione dei processi prima che si manifestino errori. La stima dell'errore è quindi proba-

Tabella 2. Applicazione dei principi della FMEA nei protocolli di procreazione medicalmente assistita.

Fase del processo	Errore	Causa	Effetto	Azione correttiva
Trasferimento embrioni da protocollo di scongelamento	Mancata effettuazione della terapia della paziente	Errore di comunicazione paziente e medico	Mancato trasferimento/ mancata gravidanza	Formazione del personale, miglioramento nella comunicazione medico paziente
Somministrazione HCG	Ora errata di somministrazione del farmaco	Errore di comunicazione tra paziente e medico	Mancato recupero di ovociti al prelievo ovocitario/ spostamento dell'orario del prelievo ovocitario se possibile	Formazione del personale, miglioramento nella comunicazione medico paziente
Valutazione della dose da somministrare di farmaco	Somministrazione di una dose sbagliata	Scelta del protocollo sbagliata, non corretta valutazione del rischio di OHSS	Risposta alla stimolazione farmacologica non appropriata	Formazione del personale medico, studio più accurato del caso clinico
Identificazione della provetta contenente gameti maschili	Non corretta etichettatura della provetta	Scrittura a mano, mancata presenza di testimone	Non corrispondenza con il dato presente sulla cartella al momento dell'inseminazione	Utilizzo etichette precompilate che evitino errori di trascrizione, presenza di testimone
Stoccaggio materiale crioconservato	Mancato funzionamento del sistema di allarme al verificarsi di un abbassamento del livello di azoto	Non corretto funzionamento del software di gestione degli allarmi	Perdita parziale o totale del materiale crioconservato	Effettuare prove mensili di funzionamento del sistema

bilistica e si basa sulla costruzione di matrici per l'assegnazione di criticità (Tab. 3).

Il suo approccio strutturato ha reso questa metodologia uno degli strumenti più utilizzati per lo sviluppo ed il miglioramento di sistemi di gestione per la qualità anche nel mondo della fecondazione *in vitro*.

Incrociando i due valori ottenuti dalle scale di gravità e di probabilità dell'errore si ottiene un *Criticality Score* cioè un indice di possibilità che l'evento con quella gravità si presenti; più è elevato lo score più l'evento preso in considerazione necessita di un controllo per la sua gestione (vedi area in cui cade l'incrocio dei due valori: azzurro rischio accettabile, fino al rosso). Se lo score non è accettabile per il sistema (valori di riferimento del centro) deve essere elaborata una azione di rivalutazione del processo.

Esempi di analisi del rischio tramite FMEA sono riportati nella seguente tabella, il punteggio verrà assegnato da ogni centro in base alle proprie procedure interne (Tab. 4).

RCA (ROOT CAUSE ANALYSIS)

L'Analisi delle cause (RCA) è costituita da una sequenza di fasi che hanno lo scopo di identificare gli eventi avversi accaduti e di evitare il loro ripetersi. Quindi è una analisi che viene fatta a posteriori quando gli errori sono già accaduti, a differenza della FMEA.

Quando si studiano i meccanismi, le cause e la natura degli errori particolare attenzione va tenuta sui fattori psicologici e umani perché la responsabilità dell'errore è fortemente subordinata dalle condizioni e dal contesto di lavoro. Ad esempio se un medico comunica alla paziente una dose errata di

Tabella 3. La tabella indica i livelli di probabilità e gravità dell'evento.

Gravità Probabilità	Insignificante ¹	Minore ²	Significante ³	Maggiore ⁴	Grave ⁵
Quasi impossibile ¹	Accettabile	Accettabile	Potrebbe essere giustificato	Può essere giustificato	Inaccettabile
improbabile ²	Accettabile	Potrebbe essere giustificato	Potrebbe essere giustificato	Può essere giustificato	Inaccettabile
Probabile occasionalmente ³	Accettabile	Potrebbe essere giustificato	Potrebbe essere giustificato	Può essere giustificato	Inaccettabile
Probabile ma non frequente ⁴	Accettabile	Potrebbe essere giustificato	Può essere giustificato	Può essere giustificato	Inaccettabile
Quasi certo e frequente ⁵	Accettabile	Potrebbe essere giustificato	Può essere giustificato	Inaccettabile matrice del rischio	Inaccettabile

Tabella 4. Esempi di analisi FMEA nella fecondazione assistita.

Processo	Inseminazione	Trasferimento	Inseminazione embrionario	Stoccaggio materiale crioconservato
Causa errore	Assenza del secondo operatore/ Testimone	Errata comunicazione medico-paziente	Mancato funzionamento micromanipolatore	Mancato funzionamento del sistema di allarme
Errore	Inseminazione ovociti con seme di altra coppia	La paziente non ha eseguito correttamente la terapia di preparazione al trasferimento da scongelamento embrionario	Impossibilità ad eseguire la ICSI	Perdita parziale o totale del materiale crioconservato

Tabella 4. Esempi di analisi FMEA nella fecondazione assistita.

Processo	Inseminazione	Trasferimento	Inseminazione	Stoccaggio embrionario materiale crioconservato
P Probabilità che la causa dell'errore si presenti (1-5)	1	3	1	2
G Gravità nel caso in cui si presenti l'errore (1-5)	5	5	5	5
R Possibilità che l'errore possa essere individuato dalle misure di controllo presenti nel sistema (1-5)	1	3	1	2
Indice di priorità del rischio (P*G*R)	1*5*1=5	3*5*3=45	1*5*1=5	2*5*2=20
Azione correttiva per evitare che si presenti l'errore	Assicurare all'interno del laboratorio la presenza di un numero di operatori sufficiente all'attività e di un testimone qualificato	Assicurare una corretta procedura di comunicazione della terapia alla paziente possibilmente non telefonica ma su supporti cartacei o informatici	Assicurare la presenza di due micromanipolatori creare convenzione con secondo centro per il proseguimento dei trattamenti fino a ripristino funzionamento macchina	Effettuare prove mensili di funzionamento del sistema

farmaco o se vi è uno scambio nella manipolazione dei gameti è necessario intervenire tempestivamente senza nascondere l'accaduto. Dopo avere fatto chiarezza su questo aspetto all'interno del proprio centro è possibile stabilire delle linee operative che siano correttive nel caso in cui si presentino degli eventi negativi. La RCA non ha l'obiettivo di assegnare a qualcuno una colpa ma al contrario serve per il miglioramento e la sicurezza del sistema in esame.

In pratica l'RCA è quindi una indagine strutturata su incidenti avvenuti che utilizza metodi analitici riconosciuti per rispondere alle seguenti domande:

- cosa è successo (evento) e come è successo
- perché è successo (componenti del processo interni o esterni)
- che cosa fare per evitare che si ripeta.

Quindi in primo luogo devono essere valutate le cause radice che hanno portato all'evento avverso, in secondo luogo deve essere strutturato un "Action Plan" cioè una azione correttiva per evitare il ripetersi dell'errore e per terzo non bisogna "nascondere" l'accaduto ma al contrario fare in modo che altre persone coinvolte in questo tipo di attività ne vengano a conoscenza per trarne insegnamenti e per evitarne l'avvenimento all'interno del proprio centro (Fig. 4).

DEFINIZIONE ORGANIGRAMMA



Requisito mandatorio per ogni centro di Procreazione Medicalmente Assistita è quello di adottare un organigramma che identifichi responsabilità e livelli di competenza per ogni figura all'interno del centro.

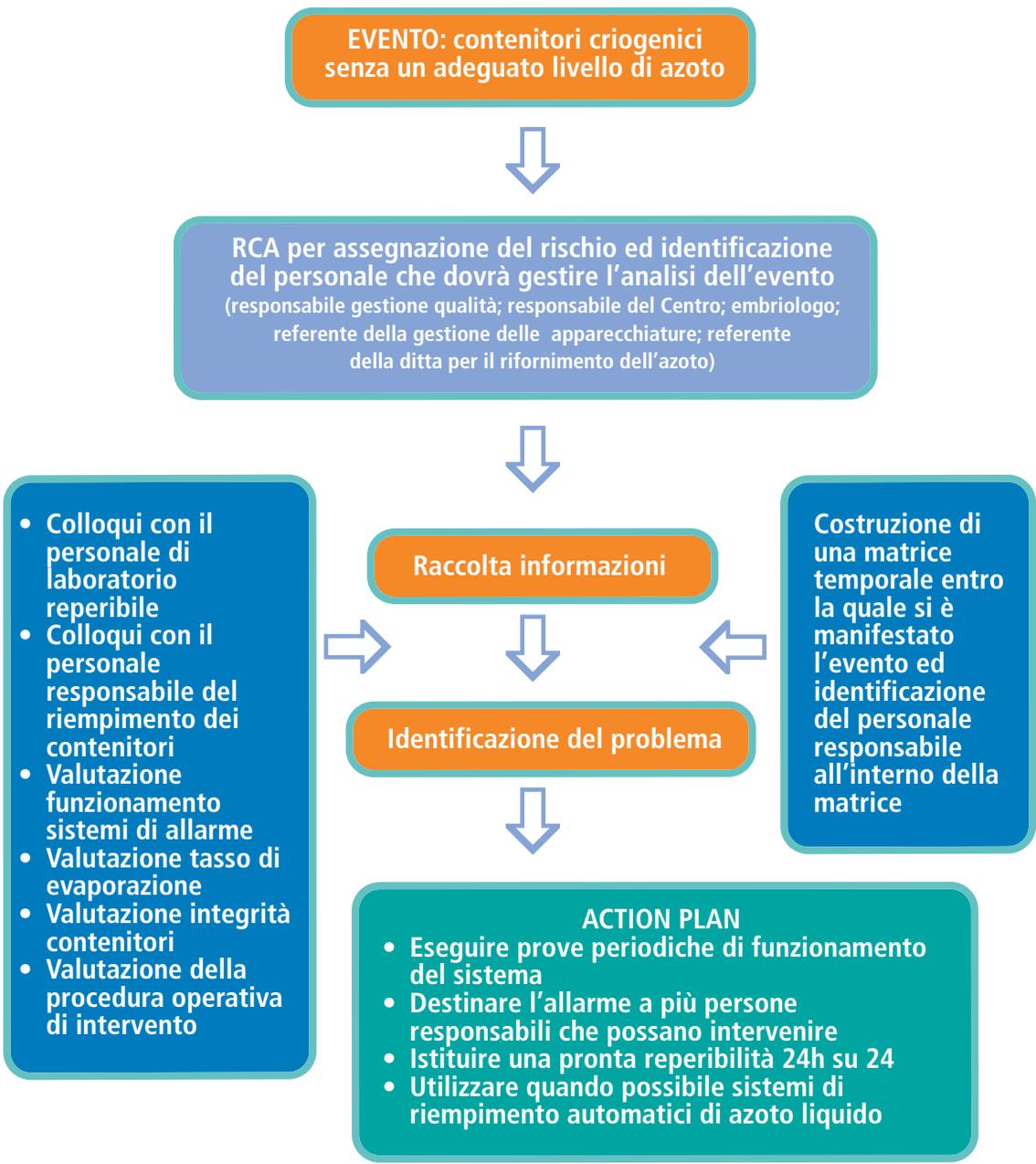


Figura 4
Esempio di RCA nella fecondazione assistita.

Obiettivo di questo è garantire una corretta aderenza alle procedure e una completa formazione del personale. Come esempio di organigramma proponiamo il seguente basato sul sistema PACER riportato all'interno del *Consensus Meeting ALPHA 2014*. PACER è un acronimo per *Personal, Administrative, Clinical, Education, and Research*.

All'interno del Clinical rientra la figura dell'embriologo nei vari livelli di responsabilità dall'assistenza al ruolo di dirigente. In questo modo viene sottolineato il ruolo centrale dell'embriologo all'interno di un programma di fecondazione assistita; l'embriologo deve occuparsi del trattamento e della manipolazione di gameti ed embrioni, aderire alle procedure operative standard del centro e stilare un percorso per ogni singola coppia dipendente da ciò che è stato dichiarato all'interno dei loro consensi informati ed alla loro storia clinica. Deve inoltre assicurare il rifornimento di materiale e reagenti ed un corretto funzionamento di ogni strumento. In ultimo dovrà generare indicatori di performance che consentano a posteriori di valutare il proprio operato. Ai livelli successivi verrà indicato invece un supervisore che dovrà principalmente garantire una corretta formazione del personale ed aderenza alle procedure specifiche. In ultimo il dirigente biologo avrà il compito di revisionare gli indicatori di performance agendo di conseguenza nel miglioramento del processo e dovrà assicurare che il laboratorio mantenga i requisiti minimi richiesti dalla legge in termini di spazi, strumenti, pulizia e personale. L'elaborazione di un organigramma all'interno di un centro di fecondazione assistita è quindi uno strumento necessario ed utile per la regolazione delle responsabilità nel cercare di ridurre al minimo gli errori tramite l'aderenza alle procedure operative standard e alla definizione di responsabilità nei vari processi.

INDICATORI

In un laboratorio IVF, è necessario capire come si sta lavorando in termini di risultati dell'obiettivo finale (la gravidanza) e dei singoli processi (es: percentuale di fecondazione, percentuale di formazione blastocisti). Questo può essere attuato con una verifica dei risultati clinici e laboratoristici, monitorando l'incremento o il calo dei singoli processi per migliorarne i risultati ed eventualmente intervenire sui processi per limitare eventuali errori latenti (Audit).

Per attuare questo monitoraggio è consigliabile introdurre degli indici numerici misurabili (INDICATORI) ed usarli come

riferimento. Tuttavia, bisogna fare molta attenzione nel fissare gli indicatori: non è sufficiente comparare le mele con le mele (Fig. 5), ma va comparato lo stesso tipo di mela.



COME SCEGLIAMO GLI INDICATORI?

Gli indicatori hanno un ruolo cruciale nello sviluppo e nel mantenimento di un sistema di controllo della qualità. Concordando con le massime "non puoi controllare ciò che non puoi misurare" o "tutto quanto non è misurabile rendilo misurabile", gli indicatori devono essere scelti accuratamente in ogni singolo processo. Questo se fatto nel giusto modo ci fornisce indicatori capaci di valutare, quando utilizzati, l'efficacia

di ogni singolo processo sul risultato finale del sistema ed il benefit aggiunto.

Tasso di gravidanza e di impianto sono due buoni indicatori sia per le pazienti che per gli operatori, tuttavia dobbiamo essere coscienti che questi indicatori generali riflettono l'andamento del centro e non di ogni singolo processo.

Per ogni indicatore sarebbe utile avere una tabella di riferimento che contenga le seguenti informazioni: descrizione dell'indicatore, processo di riferimento, metodo di rilevazione utilizzato, sorgente dei dati, metodo di calcolo, unità di misura, periodicità, valore atteso di riferimento.

INDICATORI OPERATIVI E DI PERFORMANCE



È requisito mandatorio che ogni sistema di gestione per la qualità definisca per il suo controllo una serie di indicatori di performance in grado di dare indicazioni sul lavoro effettuato.

Per ogni indicatore dovrebbe essere definito un valore soglia di riferimento. Nel caso in cui non si raggiunga il valore soglia questo non deve rappresentare un fallimento per il centro ma una indicazione di revisione del processo e di eventuale ottimizzazione. Il valore di riferimento non può essere universale per tutti i centri di fecondazione assistita in quanto i protocolli e le politiche interne possono risultare diverse. Per ogni indicatore dovrà essere valutato un andamento medio nel tempo che indicherà la soglia di riferimento. In un recente *ALPHA Consensus Meeting* (2012) sono stati individuati e valutati va-

lori di riferimento riguardo alla criopreservazione, valutando il protocollo di congelamento e i supporti utilizzati. Ogni laboratorio potrà quindi confrontare i propri valori con quelli riportati in letteratura considerando che per ogni parametro dovranno sempre essere “confrontate le mele con le mele” per una accurata e critica analisi.

Schematizzati nell'allegato 1, intendono essere un punto di partenza per fissare i propri indicatori. Ogni centro dovrà scegliere il proprio set di indicatori che collima con le sue esigenze operative ed un altro set di indicatori per le comparazioni con gli altri centri.

Come indicatori generici riferiti all'attività propria del centro possono invece essere individuati:

- Numero e tipologia di tecnica effettuata da ogni operatore con le relative percentuali di successo
- Numero di telefonate giornaliere ricevute dalla segreteria del centro
- Gestione delle complicanze
- Numero di commenti (positivi/negativi) ricevuti dai pazienti afferenti al centro
- Numero di visite su eventuale sito internet

Le misure effettuate attraverso gli indicatori ci permettono di essere oggettivi e non soggettivi nell'esaminare i dati raccolti per poter prendere decisioni basandoci su dati di fatto e non su supposizioni.

Dopo aver descritto gli obiettivi nella politica del centro occorre capire come possiamo assicurarci di raggiungerli, e per questo gli indicatori ci aiutano a capire due cose:

- 1) stiamo facendo le cose nel modo corretto?
- 2) stiamo facendo le cose giuste?

Le misure cambiano a seconda della prospettiva che vogliamo adottare, infatti i dati forniti dagli indicatori vanno sempre interpretati perché, se esaminati senza tenere conto del contesto, possono risultare sterili e privi di significato. Gli indicatori, perché siano davvero utili, devono essere:

- semplici e poco costosi da ricavare
- significativi e pertinenti all'ambito di applicazione
- misurabili oggettivamente (ad es. una quantità, un conteggio, una percentuale, un rapporto, ecc.)
- facilmente accessibili a chi deve compiere delle analisi su di essi
- semplici da interpretare
- facilmente riproducibili e rappresentabili per mezzo di tabelle, istogrammi, diagrammi, ecc
- controllabili
- confrontabili
- condivisibili, cioè trasparenti

Come regola primaria bisogna ricordare che è sicuramente meglio scegliere poche misure chiave aventi le caratteristiche elencate sopra, piuttosto che farsi tentare da un sistema il cui controllo costa più dei benefici che se ne possono ricavare.

CHECKLIST

Un ulteriore strumento di cui possiamo avvalerci è l'uso di checklist, mutuato dalle esperienze in Aeronautica ed Ingegneria Nucleare e che consente di ridurre il rischio di errore. La Checklist previene gli errori e garantisce una conoscenza uniforme e condivisa a tutto il team della procedura.

Nel campo della Medicina Chirurgica è stata individuata dalla Organizzazione Mondiale della Sanità OMS una checklist da

utilizzare durante tutti gli interventi di sala operatoria come strategia di prevenzione dell'errore in Chirurgia.

Riporteremo nell'allegato 2 degli esempi di check-list da applicare ad alcuni processi che compongono un trattamento di procreazione medicalmente assistita, dal primo colloquio con il paziente al trasferimento degli embrioni.

Gli esempi riportati si adeguano al sistema di lavoro del nostro laboratorio ma possono facilmente essere modificati per l'utilizzo all'interno di qualsiasi centro di fecondazione assistita.

SISTEMI DI MONITORAGGIO STRUMENTI E AMBIENTI DI STOCCAGGIO DI MATERIALE BIOLOGICO

Sappiamo che non può essere presente 24 ore su 24 una persona all'interno di un laboratorio di fecondazione assistita e sappiamo che quando un embriologo torna a casa il suo pensiero spesso va agli embrioni presenti all'interno degli incubatori. Esistono in commercio sistemi di monitoraggio che funzionano tramite allarmi in grado di inviare all'operatore sia SMS che e-mail per avvisarlo di eventuali guasti agli strumenti (non arriva più gas agli incubatori, si è abbassato il livello di azoto nelle banche oltre la soglia critica, è scesa la temperatura all'interno dell'incubatore).

In questo modo l'embriologo può monitorare anche a distanza il corretto mantenimento dei parametri all'interno del laboratorio riducendo la probabilità del verificarsi di eventi avversi che in questo caso sarebbero gravi.

CONCLUSIONI

Nella gestione di un sistema di qualità gli strumenti fondamentali da utilizzare nell'ottica del miglioramento continuo sono riferibili alla gestione del rischio e all'utilizzo di indicatori, procedure dettagliate e check-list per il controllo dei processi. Gli eventi avversi esistono e devono quindi poter essere controllati o prevenuti, questo non rappresenta un punto di debolezza ma anzi conferisce ulteriore stabilità e robustezza al sistema all'interno di un centro di fecondazione assistita.

Ogni centro di fecondazione assistita deve avere all'interno della propria documentazione procedure documentate e attivare audit per l'analisi delle possibili fonti di rischio e piani di azione specifici per fronteggiare un possibile errore sia esso più o meno grave.

Gli strumenti a disposizione sono diversi e partono da processi più strutturati preventivi o correttivi (FMEA/FMECA e RCA) che necessitano di team in grado di valutare il processo e le fonti di errore e arrivano a sistemi più pratici utilizzabili nella quotidianità come l'individuazione di indicatori di performance o di check-list che facilitino il lavoro limitandone l'errore.

Le normative vigenti impongono requisiti mandatori che ogni centro di fecondazione assistita deve necessariamente adottare, non bisogna fare l'errore di fermarsi a questo in quanto nell'ottica del miglioramento continuo ogni centro dovrebbe costruirsi i propri strumenti di controllo interno facendo riferimento ad altre realtà italiane e non (HFEA, ASRM).

Nel fare questo non bisogna soffermarsi sul risultato atteso che necessariamente dovrà essere positivo, al contrario è consigliabile porsi domande in grado di evidenziare il rischio di errori di processo.

Solo se le nostre domande saranno poste in maniera corretta il processo potrà essere considerato sicuro e un eventuale esito negativo non dovrà essere visto solo come un errore ma come un corretto funzionamento del processo di controllo.

BIBLIOGRAFIA

LEGISLAZIONE

- Accordo Stato Regioni 15 marzo 2012.
- Costa M, Reina S. Nuove norme sulla Qualità e Sicurezza nella PMA, edizioni internazionali 2010.
- Decreto legislativo n°191, 2007.
- Decreto legislativo n°16, 2010.

LINEE GUIDA

- ESHRE Revised Guidelines for good practice in IVF laboratories, Human Reproduction. 2015;Vol 23:No 6:1253-1262.
- HFEA Adverse incidents in fertility clinics: lesson to learn 2010-2012.

LETTERATURA SCIENTIFICA

- Mortimer D, Mortimer ST. Quality and risk management in the IVF laboratory. 2005.
- Mortimer D. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2007;Volume 21, Issue 4:691-712.
- Reason J. Human error: models and management. BMJ. 2000;Volume 320.
- Alpha Scientists In Reproductive Medicine. The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. Reprod Biomed Online. 2012 Aug;25(2):146-67
- Alpha Scientists In Reproductive Medicine. The Alpha Consensus Meeting on the professional status of the clinical embryologist: proceedings of an expert meeting Reproductive BioMedicine Online. 2015.

APPENDICE CAPITOLO 1

Allegato 1

RAPPORTO AUDIT INTERNO	
Data della verifica.....	
GRUPPO DI VERIFICA ISPETTIVA	
Responsabile della verifica ispettiva:.....	
Aree sottoposte ad audit:.....	
UNITÀ OPERATIVA:.....	PERSONALE CONTATTATO:.....
Riunione di Apertura.....	
Riunione di chiusura.....	
Risultati e considerazioni sulla verifica.....	

Allegato 2

NON CONFORMITÀ E AZIONI CORRETTIVE

IDENTIFICAZIONE

Descrizione delle non conformità.....

Chi ha rilevato la conformità

Firma

SOLUZIONE DA ADOTTARE

Data..... firma.....

VERIFICA SOLUZIONE ADOTTATA

Esito del controllo

Se l'esito è negativo attivare una nuova non conformità

Data..... firma.....

Allegato 3

RAPPORTO DI AZIONE CORRETTIVA E PREVENTIVA

DA COMPILARE A CURA DEL RICHIEDENTE

AZIONE CORRETTIVA

Richiesta di azione correttiva a seguito:

- Non conformità rilevate in fase di audit
- Riesame del SGQ
- Suggerimento da parte del personale

AZIONE PREVENTIVA

Richiesta di azione preventiva a seguito:

- Osservazioni in fase di audit
- Riesame del SGQ
- Analisi degli indicatori di qualità
- Suggerimento da parte del

Descrizione della non conformità rilevata:

ZONA DA COMPILARE A CURA DEI RESPONSABILI DELLA VALUTAZIONE

- Si ritiene valida la proposta di azione
- Non si ritiene valida la proposta di azione

AZIONI DA INTRAPRENDERE

ZONA DA COMPILARE A CURA DEL RESPONSABILE DELLA VERIFICA

Esito della verifica: Positivo Negativo

Se l'esito è negativo, attivare una nuova azione correttiva/preventiva

Data.....

firma.....

Allegato 4

VERBALE RIESAME DEL SISTEMA QUALITA'

Data:

PARTECIPANTI:

N.	Titolo	Data Documento
1	Analisi non conformità	
2	Analisi obiettivi pianificati	
3	Analisi indicatori di processo	
4	Azioni intraprese a seguito degli audit interni	
5	Stato e risultato sviluppo e mantenimento competenze	
6	Stato e adeguatezze delle risorse	
7	Azioni correttive e preventive	
8	Piano sviluppo competenze	

Allegato 5

SCHEDA VALUTAZIONE INDIVIDUALE					
LABORATORIO DI EMBRIOLOGIA	VERIFICA PERIODICA		Dott.....		
TECNICA	N° minimo richiesto	N° eseguiti	Parametri di riferimento	Valori /data	Firma
TRATTAMENTO SEME					
PICK UP OVOCITI					
VALUTAZIONE ZIGOTI					
INSEMINAZIONE FIVET					
PULIZIA IALURONIDASE					
ICSI					
CONTROLLO FERTILIZZAZIONE (CONSECUTIVI)					
VALUTAZIONE EMBRIONI (CONSECUTIVI)					
TRANSFER EMBRIONI					
VITRIFICAZIONE OVOCITI					
SCONGELAMENTO OVOCITI					
VITRIFICAZIONE EMBRIONI					
SCONGELAMENTO EMBRIONI					
VITRIFICAZIONE BLASTOCITI					
SCONGELAMENTO BLASTOCISTI					

Allegato 6

FORMATO DI SCRITTURA DELLA PROCEDURA

NOME CENTRO PMA E LOCO	TIPO DI DOCUMENTO	APPROVATO DA:	CODIFICA...
EMISSIONE: REVISIONE:	TITOLO		PAGINA XXX DI YYY

1. SCOPO
2. CAMPO DI APPLICAZIONE
3. ATTORI
4. MODALITÀ OPERATIVA: IL TESTO DEVE ELENCARE DETTAGLIATAMENTE LA SEQUENZA DI TUTTE LE AZIONI NECESSARIE PER SVOLGERE QUELLA PARTICOLARE ATTIVITÀ, PRECEDENTEMENTE SCHEMATIZZATA IN UN DIAGRAMMA DI FLUSSO
5. MATERIALE RICHIESTO
6. STRUMENTAZIONE RICHIESTA
7. DIAGRAMMA DI FLUSSO
8. INDICATORI
7. RIFERIMENTI /DOCUMENTI CORRELATI: IDENTIFICARE QUALSIASI STANDARD O SPECIFICA CUI LA PROCEDURA FA RIFERIMENTO

REVISIONE N.	FIRMA RESPONSABILE	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA	DATA

REDATTO.....VERIFICATO..... APPROVATO.....

FIRMA..... FIRMA..... FIRMA.....

DATA..... DATA..... DATA.....

Allegato 7

ELENCO DOCUMENTI

Titolo	Codifica	Revisione	Archiviazione	Accesso	Responsabile archiviazione
Manuale Qualità					
Procedure operative e Istruzioni operative					
Moduli					
Archivio verbali					
Cartelle cliniche					
Posta in uscita					
Posta in entrata					
Referti Laboratorio					
Deleghe					
Istruzioni per esami coppia PMA					
Consenso informato					

APPENDICE CAPITOLO 5

		<i>Elenco e piano manutenzioni e tarature apparecchiature</i>
--	--	--

Nr. inventario	Descrizione	Freq M/T	G	F	M	A	M	G	L	A	S	O	N	D
1	INCUBATORI	M	X						X					
		T	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	MICROSCOPI	M	X						X					
3	CAPPE A FLUSSO LAMINARE	M/T	X						X					
4	PIANI RISCALDATI	M	X											
		T	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	MICROMANIPOLATORI	M	X						X					
6	FRIGORIFERI	M/T	X											
7	CENTRIFUGHE	M	X											
8	PIPETTATORI	M	X											
9	TERMOMETRI	M/T	X											
10	RILEVATORI CO ₂ /O ₂	M/T	X											
11	CONTENITORI CRIOGENICI	M	X											

M= manutenzione (PROGRAMMATA)

T= taratura

Data _____

Firma DT _____

SCHEDA APPARECCHIATURA

Descrizione:	N. Inventario:
--------------	----------------

Modello:	Costruttore / Fornitore:	Nr. Serie:
Data Immatricolazione:	Data ricevimento e collaudo:	Ubicazione e nome operatori autorizzati:
Modalità d'acquisizione:	Frequenza dei controlli:	Modalità di Custodia:
Referenza assistenza tecnica:		
<input type="checkbox"/> Contratto	<input type="checkbox"/> A chiamata	
Tel:	Fax:	
E-mail:		

Strumenti di supporto

N. inventario	Descrizione	N. di serie	Ubicazione	Manutenzione / Tarature

STRUMENTO DI MISURA:

Frequenza di taratura:	Modalità o procedura di taratura:	Campione di riferimento:
Campo di misura:	Intervallo di esercizio:	Accettabilità errore:

STRUMENTO DI MISURA:

Frequenza di taratura:	Modalità o procedura di taratura:	Campione di riferimento:
Campo di misura:	Intervallo di esercizio:	Accettabilità errore:

Data _____

Firma Compilatore _____

APPENDICE CAPITOLO 8

Movimentazione e trasporto di gameti ed embrioni tra Centri

MODULISTICA CONSIGLIATA

N. 1) RICHIESTA DI MOVIMENTAZIONE DI CELLULE RIPRODUTTIVE

Il/La/I sottoscritto/a/i

Cognome Nome _____

Data di nascita _____

Luogo di nascita _____

Indirizzo di residenza _____

Documento identità _____

Recapito telefonico _____

DICHIARO/DICHIARANO

Di aver accettato in data _____, di crioconservare presso questo centro PMA, il seguente materiale biologico:

- LIQUIDO SEMINALE
- PRELIEVO O TESSUTO TESTICOLARE
- OVOCITI
- ZIGOTI
- EMBRIONI
- BLASTOCISTI

DICHIARO/DICHIARANO

Inoltre, di voler ritirare per trasferire presso il Centro N. _____ di dispositivi di crioconservazione per un totale di N. _____ ovociti/zigoti/embrioni/blastocisti/spermatozoi (concentrazione espressa in 106/ml) e di essere a conoscenza che il numero di dispositivi residui presso questo centro è di

N. _____ per un totale di N. _____ ovociti/zigoti/embrioni/blastocisti/spermatozoi (concentrazione espressa in 106/ml).

Data

Firme leggibili per accettazione:

Firma di Lei _____

Firma di Lui _____

Firma operatore del centro _____

N. 2) FAX O MAIL DI RICHIESTA DI MOVIMENTAZIONE DI MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO

SU CARTA INTESTATA

Gent.mo Responsabile del centro PMA Certificato -----

Dott. -----

A nome della coppia : Sig. ra ----- nata il ----- a -----

Sig. ----- nato il ----- a -----

Il centro PMA -----

SI RICHIEDE

che il materiale biologico (spermatozoi, ovociti, gameti) stoccato presso il vostro Centro appartenente alla suddetta coppia venga trasportato presso il nostro Centro per il successivo utilizzo.

Si dichiara inoltre, che il Trasportatore del materiale sarà:

Sig./Sig.ra ----- nato/a ----- il ----- a -----

Oppure CORRIERE AUTORIZZATO -----

In attesa di accordi,
distinti saluti

Il responsabile del Centro

Dott.

4) NOTIZIE TECNICHE (4A, 4B, 4C)

N. 4A) NOTIZIE TECNICHE RELATIVE AGLI SPERMATOZOI CRIOCONSERVATI

- Data crioconservazione
- CODICE IDENTIFICATIVO
- N. paillettes restituite contrassegnate dal nome:
- N. spermatozoi x106/paillette, % motilità totale, % motilità rapida, % forme normali
- Provenienza (eiaculato, testicolare)
- Tecnica di crioconservazione:
- Crioprotettore utilizzato, ditta, numero di lotto e data di scadenza
- Firma operatore
- Data

N. 4B) NOTIZIE TECNICHE RELATIVE AGLI OVOCITI CRIOCONSERVATI

- Data crioconservazione
- CODICE IDENTIFICATIVO
- N. paillettes restituite contrassegnate dal nome:
- N. ovociti crioconservati loro suddivisione nei dispositivi di stoccaggio:
- Stadio di maturità degli ovociti:
- Tecnica di crioconservazione:
- Tipo e Molarità crioprotettori utilizzati:
- Ditta, lotto, data di scadenza delle soluzioni di crioconservazione utilizzate
- Firma operatore
- Data

N. 4C) NOTIZIE TECNICHE RELATIVE AGLI EMBRIONI CRIOCONSERVATI

- Data crioconservazione
- CODICE IDENTIFICATIVO
- N. paillettes restituite contrassegnate dal nome:
- N. embrioni crioconservati e loro suddivisione nei dispositivi di stoccaggio:
- Stadio di sviluppo embrionale:
- Tecnica di crioconservazione:
- Tipo e Molarità crioprotettori utilizzati:
- Ditta, lotto, data di scadenza delle soluzioni di crioconservazione utilizzate
- Firma operatore
- Data

N.7) ACCORDO PER IL MANTENIMENTO DELLE CONDIZIONI DI TRASPORTO RICHIESTE

Il sottoscritto
nato a.....Prov.il.....

tipo di documento.....N.....rilasciato il.....
dal Comune di.....

dichiara di aver ricevuto spiegazioni esaurienti, di aver letto e compreso il documento informativo.

Con la presente si impegna a rispettare le prescrizioni per il trasporto sicuro del seguente materiale biologico:

- SPERMATOZOI.....numero dispositivi:.....
- OVULI.....numero dispositivi:.....
- ZIGOTI.....numero dispositivi:.....
- EMBRIONI.....numero dispositivi:.....

Appartenenti a:.....
.....

Dry shipper:

peso vuoto e dopo completo assorbimento di LN2 o dichiarazione di corretto riempimento del contenitore (se non è possibile fare la doppia pesata)

Firma per presa visione dell'informativa

Firma per presa in carico

Data

A CARICO DEL CENTRO

Il materiale viene consegnato alle ore:..... del giorno.....

Il materiale deve giungere presso il centro.....
entro le ore del giorno.....

Firma operatore del Centro PMA _____

**N. 8) ETICHETTA DI TRASPORTO
NO PER DRY SHIPPER**

MITTENTE:

Centro PMA: Indirizzo completo

Referente Dott.

Tel. N.

DESTINATARIO:

Centro PMA: Indirizzo completo

Referente Dott.

Tel. N.

CONTENUTO: PRODOTTI BIOLOGICI

AZOTO REFRIGERATO -196°C

RISCHIO BIOLOGICO (se il materiale è infetto vedi etichette materie infettive)

MANIPOLARE CON CAUTELA – NON IRRADIARE

CONSERVARE AL FRESCO (< 20°C) IN POSIZIONE VERTICALE

ETICHETTE PER MATERIALE INFETTO:

N. 9) FAX RICEZIONE MATERIALE

Il sottoscritto _____
Operatore del Centro di Procreazione Medicalmente Assistita

Dichiara di ricevere in consegna dal Centro PMA _____
come richiesto il seguente materiale biologico arrivato a destina-
zione in data: __/__/__ alle ore ____

- SPERMATOZOI.....numero dispositivi: ____
- OVULI.....numero dispositivi: ____
- ZIGOTI.....numero dispositivi: ____
- EMBRIONI.....numero dispositivi: ____

Appartenenti a:
.....

Dichiara inoltre di aver accertato che le condizioni indicate per il
trasporto sono state rispettate.

In caso di dry shipper è raccomandabile eseguire la verifica del
peso all'arrivo.

In Fede _____

Data _____

N 10.

CHECK LIST CONSEGNA MATERIALE

- verificare l'identità del Trasportatore, informarlo adeguatamente e fargli sottoscrivere l' informativa
- condizioni richieste durante il trasporto
- controllare la dichiarazione di idoneità all'utilizzo clinico (consensi, esami infettivologici)
- controllare le informazioni tecniche sul materiale
- verificare la rintracciabilità dei campioni e la corretta e chiara identificazione dei dispositivi di stoccaggio (nome, cognome, codice identificativo, provenienza)
- verificare la rintracciabilità dei materiali utilizzati (ditta, lotto, data scadenza)
- allestire il contenitore criobiologico a seconda delle sue caratteristiche (dry shipper peso vuoto e dopo completo riempimento)
- compilare l'etichetta e la documentazione di viaggio,
- preparare il fax che verrà completato dal Centro ricevente al momento del ricevimento del materiale a completamento della procedura
- stabilire l'ora di partenza e definire l'orario di arrivo in modo che questi siano compatibili con la sicurezza del contenitore criobiologico di trasporto utilizzato ed indicarli sul fax di ricezione del materiale
- inserire i campioni nel contenitore criobiologico da trasporto
- consegnare il contenitore criobiologico al Trasportatore

N.11

CHECK LIST RICEZIONE MATERIALE

- controllare lo stato del contenitore criobiologico e quello del materiale (peso, livello di azoto liquido, campioni a temperatura criogenica)
- controllare l'orario di partenza e di arrivo in modo da verificare che la durata del viaggio sia stata compatibile alle caratteristiche del contenitore criobiologico di trasporto utilizzato
- controllare la corretta identificazione dei campioni senza manomettere l'identificazione originale
- controllare la presenza e completezza dei documenti di viaggio
- stoccare il materiale nei contenitori di lunga permanenza
- registrare l'acquisizione del materiale nei propri archivi e fornire loro una identificazione
- compilare ed inviare il fax di ricezione del materiale al centro di provenienza.

APPENDICE CAPITOLO 10

Allegato 1 Indicatori di performance

	indicatori	Periodo di riferimento	Valori assoluti	Valore percentuale	Valore di riferimento	Fonte del valore di riferimento
Prelievo di ovociti	% ovociti recuperati / n° follicoli con diametro superiore a 16mm					
Stimolazione ovarica	% ovociti maturi (MI) / n° ovociti recuperati					
Inseminazione (FIVET/CSI) e Fertilizzazione	% 2PN / ovociti inseminati					
	% 3PN/ ovociti inseminati					
	% degenerati / ovociti inseminati					
Manipolazione Gameti	% spermatozoi mobili recuperati / spermatozoi mobili totali					
Sviluppo embrionale	% embrioni arrestati /2PN					
	% embrioni top quality in D3 /2PN					
	% blastocisti/2PN					
Criopreservazione	% coppie che hanno congelato embrioni/coppie totali					
Scongellamento	Ovociti:					
	% ovociti sopravvissuti allo scongelamento/ovociti scongelati				75% congelamento lento 85% vitrificazione (95% per donatrici età <30 anni)	
	% ovociti fertilizzati 2PN/ovociti sopravvissuti				Non più bassa del 10% se comparata con quella degli ovociti a fresco all'interno del centro	
	% di embrioni divisi correttamente/2PN				La stessa degli ovociti inseminati da ovociti a fresco all'interno del centro	
	% di impianto/embrioni trasferiti				Non più bassa del 10-30% della % di impianto misurata sulla popolazione di embrioni a fresco all'interno del centro	
	Embrioni cleavage stage:					
	% di embrioni con più della metà dei blastomeri sopravvissuti allo scongelamento/embrioni scongelati				Congelamento lento: 85% Vitrificazione: 95%	
	% di embrioni con la totalità dei blastomeri intatti dopo lo scongelamento/embrioni scongelati				Congelamento lento: 55% Vitrificazione: 85%	
	% di embrioni che continua le divisioni cellulari dopo la cultura overnight/embrioni sopravvissuti allo scongelamento				La stessa della popolazione di embrioni a fresco all'interno del centro	
	% di impianto /embrioni trasferiti				La stessa della popolazione di embrioni a fresco all'interno del centro	

	Blastocisti:					
	% di embrioni che sopravvivono allo scongelamento/blastocisti scongelate				Freezing: 85% Vitrification: 95%	
Transfer	% di impianto /blastocisti trasferite				La stessa della popolazione di blastocisti a fresco all'interno del centro	
	% transfer con embrioni top quality/tot embryo trasfer					
Gravidanza	% transfer in cui rimangono embrioni nel catetere/tot procedure					
	% gravidanze (beta-HCG +)/ET					
	% gravidanze cliniche/ET					
	% aborti/gravidanze cliniche					
	% gravidanze multiple/gravidanze cliniche					
	% gravidanze Extrauterine gravidanze cliniche					
% Malformazioni neonatali/tot nati						

Allegato 2 Esempi di Checklist

CHECKLIST CONTROLLO ESECUZIONE PIASTRE E TERRENI PER IL GIORNO SUCCESSIVO		
PIASTRE PER IL GIORNO		
	DATA/ORA	Sigla operatore e firma
Piastre pickup		
Piastre hyaluronidase pulizia ovociti		
Piastre post pulizia		
Piastre post ICSI		
Piastre post controllo fertilizzazioni		
Piastre transfer		
Piastre controllo in D3		
Piastre FIVET		
TERRENI PER IL GIORNO		
	DATA/ORA	Sigla operatore e firma
ELENCO TERRENI		
PREPARAZIONE HYALURONIDASE		
PREPARAZIONE GRADIENTI PER TRATTAMENTO LIQUIDO SEMINALE		

CHECKLIST PROCEDURA CRIOPRESERVAZIONE GAMET/EMBRIONI		
Da allegare alla cartella di laboratorio nella sezione del congelamento gameti ed embrioni		
	Esito	Sigla Operatore e firma
Esami infettivi coppia firmati e vidimati da un medico	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Presenza consenso informato firmato da medico e paziente	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Compilazione modulo banche da parte di un embriologo	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Compilazione quaderno congelamenti da parte di un embriologo	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Aggiornamento software di archivio congelamenti	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	

CHECKLIST PROCEDURA MONITORAGGIO STRUMENTI		
Da allegare al modulo corrispondente di controllo strumenti dove saranno annotati i parametri rilevati		
	Esito	Sigla Operatore e firma
Controllo CO ₂ , umidità e temperatura incubatori tradizionali	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Controllo flusso gas e temperatura minincubatori	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Controllo temperatura frigorifero/freezer	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Controllo temperatura dei vari ripiani riscaldati (cappa, piastre...)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Controllo accensione cappe	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Controllo temperatura termostato	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	

WITNESS CARTELLA DI LABORATORIO		
Da allegare alla cartella di laboratorio e firmare in ogni sua parte		
COGNOME	NOME PARTNER FEMMINILE	
COGNOME NOME PARTNER MASCHILE		
ID COPPIA		
<i>Prelievo ovocitario</i>	a) Chiedere alla paziente cognome/nome/data di nascita in presenza di una seconda persona (embriologo/infermiera/medico). Confronta i dati della paziente con quelli scritti sul foglio di laboratorio. (La paziente non deve rispondere sì/no ma deve rispondere in maniera attiva alle domande)	
	Primo operatore	witness
	Firma Mario Rossi	Firma Paola Bianchi
	Sigla MR	Sigla PB
	Posizione Senior Embryologist	Posizione infermiera
	b) Controllare che i dati della paziente (cognome/nome/data di nascita) marcati sulla piastra corrispondano con quelli del foglio di laboratorio	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
Sigla	Sigla	
posizione	posizione	
<i>Preparazione liquido seminale</i>	Marcare le provette con i dati della coppia (cognome/nome/data di nascita). Controllare che i dati marcati sulle provette corrispondano ai dati marcati sul barattolo contenente il liquido seminale. Evitare di avere sul ripiano di lavoro più di un barattolo di liquido seminale.	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
	Sigla	Sigla
posizione	posizione	
<i>Decumulazione ovociti</i>	Controllare che ci sia corrispondenza tra i dati della paziente (cognome/nome/data di nascita) presenti sulla piastra del prelievo ovocitario e la piastra contenente gli ovociti denudati	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
	Sigla	Sigla
posizione	posizione	
<i>ICSI/FIVET</i>	Controllare che sulla provetta del liquido seminale e sulla piastra con gli ovociti da inseminare ci siano marcati gli stessi dati (cognome/nome/data di nascita)	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
	Sigla	Sigla
posizione	posizione	
<i>Passaggio ovociti inseminati in piastra post inseminazione (ICSI) o di semina (FIVET)</i>	controllare che sulla piastra dove vengono trasferiti gli ovociti inseminati vengano marcati gli stessi dati della paziente (cognome/nome/data di nascita) presenti sulla piastra di inseminazione	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
	Sigla	Sigla
posizione	posizione	
<i>Fert-check</i>	Controllare che sulla piastra dove verranno trasferiti gli ovociti fertilizzati siano marcati gli stessi dati della paziente (cognome/nome/data di nascita) presenti sulla piastra post inseminazione	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
	Sigla	Sigla
posizione	posizione	
<i>Passaggio embrioni nella piastra controllo in D3</i>	Controllare che sulla piastra dove verranno trasferiti gli embrioni siano marcati gli stessi dati della paziente (cognome/nome/data di nascita) presenti sulla piastra che conteneva gli embrioni in D3	
	Primo operatore	witness
	Firma	Firma
	Sigla	Sigla
posizione	posizione	

Trasferimento embrioni	<i>a) Controllare che sulla piastra per il trasferimento siano marcati gli stessi dati della paziente (cognome/nome/data di nascita) presenti sulla piastra che conteneva gli embrioni</i>		
	Primo operatore	witness	
	Firma	Firma	
	Sigla	Sigla	
	posizione	posizione	
	<i>b) Chiedere alla paziente cognome/nome/data di nascita in presenza di una seconda persona (embriologo/infermiera/medico) al momento dell'entrata in sala operatoria. Confronta i dati della paziente con quelli scritti sul foglio di laboratorio. (La paziente non deve rispondere sì/no ma deve rispondere in maniera attiva alle domande)</i>		
	Primo operatore	witness	
	Firma	Firma	
	Sigla	Sigla	
	posizione	posizione	
	<i>c) ottenere una ulteriore conferma della corrispondenza chiedendo nuovamente alla paziente di ripetere cognome e nome prima di caricare il catetere) e controllare nuovamente la corrispondenza con la piastra e la cartella di laboratorio</i>		
	Primo operatore	witness	
Firma	Firma		
Sigla	Sigla		
posizione	posizione		
Criopreservazione ovociti	<i>a) Verificare che i dati marcati sulle paillettes corrispondano a quelli presenti sulla piastra contenente gli ovociti</i>		
	Primo operatore	witness	
	Firma	Firma	
	Sigla	Sigla	
	posizione	posizione	
	<i>b) Verificare lo stoccaggio del materiale congelato, compilazione modulo banca e quaderno congelamento ovociti</i>		
	Primo operatore	witness	
	Firma	Firma	
	Sigla	Sigla	
	posizione	posizione	
	Criopreservazione embrioni	<i>a) Verificare che i dati marcati sulle paillettes corrispondano a quelli presenti sulla piastra contenente gli embrioni</i>	
		Primo operatore	witness
Firma		Firma	
Sigla		Sigla	
posizione		posizione	
<i>b) Verificare lo stoccaggio del materiale congelato, compilazione modulo banca e quaderno di congelamento embrioni</i>			
Primo operatore		witness	
Firma		Firma	
Sigla		Sigla	
posizione		posizione	