



Centro Nazionale Trapianti

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

MANUALE PER LA GESTIONE DI UN LABORATORIO DI PMA

COORDINATO DA
Fiorenza Bariani
Rosanna Ciriminna
Roberta Maggiulli
Valerio Pisaturo
Lilium Santilli

INDICE

AUTORI	4
<hr/>	
PREFAZIONE	7
<hr/>	
Capitolo 1. La gestione della qualità	9
1. Introduzione	
2. Gestione delle risorse umane	
3. Gestione della documentazione e procedure operative standard	
4. Indicatori, audit e non conformità/eventi e reazioni avverse	
5. Valutazione e gestione del rischio	
6. Referenze e riferimenti normativi	
<hr/>	
Capitolo 2. Requisiti ambientali e controlli, disegno del laboratorio	23
1. Introduzione	
2. Conta delle particelle aerotrasportate	
3. Conta delle contaminazioni microbiologiche	
4. Strutturazione di un laboratorio di PMA	
5. Accesso al laboratorio, flussi di persone e materiali	
6. Trattamento dei campioni a rischio infettivo	
7. Referenze	
<hr/>	
Capitolo 3. Pulizie e sanificazione dei locali e delle attrezzature	45
1. Introduzione	
2. Classi di disinfettanti in uso	
3. Routine di pulizia nei laboratori di PMA	
4. Modalità operative	
5. Programma di pulizia	
6. Referenze	
<hr/>	
Capitolo 4: Gestione attrezzature e strumentazione, taratura e calibrazione strumenti	57
1. Introduzione	
2. Requisiti minimi tecnologici per laboratori di PMA di I-II-III livello	
3. Requisiti mandatori	
4. Qualifica delle apparecchiature	
5. Caratteristiche delle attrezzature	

6. Strumenti di misurazione di riferimento
7. Verifica di taratura degli strumenti di misura
8. Pianificazione delle attività
9. Gestione degli allarmi
10. Modulistica
11. Marchi e Certificazioni
12. Sistemi di testimonianza elettronica
13. Referenze

Capitolo 5: Manipolare l'azoto liquido in sicurezza **93**

1. Introduzione
2. Dispositivi di stoccaggio
3. Norme comportamentali
4. Movimentazione di azoto liquido tra gli ambienti di stoccaggio e il laboratorio
5. Referenze

Capitolo 6: Movimentazione e trasporto di gameti ed embrioni tra centri **103**

1. Introduzione
2. Avvio della procedura di movimentazione
3. Caratteristiche del criocontenitore da trasporto
4. Etichetta del contenitore da trasporto
5. Ricevimento del materiale crioconservato

Capitolo 7: La gestione di gameti da donazione eterologa **111**

1. Introduzione
2. Donazioni nazionali
3. Importazioni di gameti ed embrioni da banca estera
4. Modalità di importazione ed esportazione
5. Tracciabilità e vigilanza
6. Referenze

Allegati **129**

Capitolo 29 EDQM 5th Edition 2022
Capitolo 30 EDQM 5th Edition 2022

AUTORI

Alessandra Alteri

Scienze della Natalità,
UO Ginecologia e Ostetricia,
IRCCS Ospedale San Raffaele,
Milano

Attilio Anastasi

Società Italiana di Embriologia,
Riproduzione e Ricerca

Roberta Barbaro

Centro Ambra Palermo

Fiorenza Bariani

Centro Nazionale Trapianti, Roma

Silvia Bisin

SOC Immunoematologia,
Medicina Trasfusionale e Laboratorio
AOU IRCCS Meyer

Antonio Carniato

Consulente per il Centro Nazionale
Trapianti, Roma

Marialuisa Cinti

ARC-STER Centro Studi per la Terapia
della Sterilità della Coppia, Mestre (VE)

Rosanna Ciriminna

Centro Ambra Palermo

Michela Dalla Zorza

Aulss 4 Veneto Orientale,
San Donà di Piave

Lucia De Santis

Scienze della Natalità,
UO Ginecologia e Ostetricia,
IRCCS Ospedale San Raffaele,
Milano

Maura Di Domenico

Centro PMA, Ospedale San Salvatore,
L'Aquila

Lisa Dovere

Genera Roma, Clinica Valle Giulia,
Roma

Federico Favero

ARC-STER Centro Studi per la Terapia
della Sterilità della Coppia, Mestre (VE)

Emanuele Licata

U.O.C Fisiopatologia della
Riproduzione e Andrologia, ASL RM2 -
Ospedale "Sandro Pertini", Roma

Roberta Maggiulli

IVIRMA Italia

Donatella Paoli

Laboratorio di Seminologia
Banca del Seme "Loredana Gandini"
Università di Roma "Sapienza"

Lodovico Parmegiani

Next Fertility GynePro NextClinics
International, Bologna

Monica Pinna

SS Procreazione Medicalmente
Assistita, IRCCS Fondazione
Ca' Granda Ospedale Maggiore
Policlinico, Milano

Valerio Pisaturo

UOC Fisiopatologia della Riproduzione
AOU Policlinico Umberto I
Sapienza, Roma

Emilia Rega

PMA Gruppo Villa Claudia, Roma

Stefania Romano

PMA Clinica Villa Margherita, Roma

Liliam Santilli

Centro Nazionale Trapianti, Roma

Catello Scarica

Casa di Cura European Hospital,
Centro Medicina della Riproduzione,
Roma

Gianluigi Soro

Azienda USL Toscana Centro - Firenze

Laura Sosa Fernandez

Centro Embryos
Medicina della Riproduzione & Day
Surgery, Battipaglia (Salerno)

Giovanna Tomasi

CRA - Centro Riproduzione Assistita,
Catania

Gianluca Verdolini

Azienda USL Toscana Centro - Firenze

Angela Vitti

UOC Fisiopatologia della Riproduzione
e PMA, Ospedale "F. Iaja"
Conversano (ASL BA), Bari

Carlotta Zacà

IVIRMA Global Research
Alliance, 9.Baby, Bologna

Revisione finale a cura di:

Massimo Cardillo

Direttore Generale
Centro Nazionale Trapianti

Letizia Lombardini

Direttore Sanitario
Centro Nazionale Trapianti

PREFAZIONE

La **Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca** (SIERR), e il **Centro Nazionale Trapianti** (CNT) hanno il piacere di presentare la Terza edizione del Manuale per i laboratori di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).

La prima edizione, prodotta nel 2012, nacque con l'obiettivo fondamentale di affrontare e approfondire i requisiti di qualità e sicurezza richiesti dalla normativa, con l'intento di tradurli nella realtà specifica dei laboratori di PMA, in un momento in cui le norme europee erano appena state recepite in Italia.

La successiva edizione del 2017, riflettendo sull'evoluzione normativa e sull'esperienza maturata dalla prima pubblicazione, rivedeva e aggiornava il contenuto, consolidando il valore del manuale quale guida pratica per i professionisti del settore.

Questa terza edizione prosegue nel percorso già delineato dalle edizioni precedenti, mantenendo l'obiettivo di fornire elementi di buona pratica che si integrano con l'evoluzione tecnologica e rispondono alle dinamiche del quadro normativo.

Si rammenta che il Manuale non assume il ruolo di un testo legislativo o di una normativa vincolante ma semplicemente può essere considerato come una raccolta di suggerimenti a cui ci si può ispirare, riportandoli nella propria realtà.

Ad integrazione di quanto proposto, si allegano al manuale due capitoli dedicati al mondo della PMA, estratti e tradotti dalla quinta edizione della guida del *European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM)

Ringraziamo tutti coloro che hanno contribuito a rendere possibile la stesura di questa nuova edizione del manuale che ha visto coinvolti, in un lungo lavoro di revisione, gli autori e i coordinatori della SIERR e del CNT e la cui versione definitiva è stata approvata dal CNT e dal Consiglio Direttivo della SIERR.

Ci auguriamo che questo manuale continui ad essere una risorsa preziosa per l'attività quotidiana degli operatori del settore.

Buona lettura e buon lavoro a tutti!

Capitolo 1.

La gestione della qualità in PMA

1. Introduzione

Parlare di gestione della qualità oggi significa andare oltre il mero concetto di applicazione di un sistema gestione qualità documentale, che risponde a un obbligo di legge, per andare verso una stretta sinergia con la cultura della sicurezza e, necessariamente, verso un concetto di prevenzione e gestione degli errori attraverso gli strumenti di gestione del rischio che, è auspicabile, siano sempre più implementati nei centri Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) e nelle Banche di Gameti.

Grazie all'esperienza acquisita dai Centri stessi nell'ambito della qualità, sono state sviluppate competenze, capacità e abilità in questa disciplina. Ora lo sguardo è rivolto al miglioramento continuo, stimolando comportamenti e atteggiamenti che ottimizzino il raffronto delle proprie realtà lavorative.

Il miglioramento non deve necessariamente aver luogo in tutti i processi nello stesso momento, ma essere inquadrato conseguente ad un'analisi dei rischi. Nell'ottica della sicurezza il monitoraggio dell'efficacia dei controlli e delle azioni intraprese, in un costante confronto attivo tra Centri, può realizzare ottime sinergie per arricchire tecniche e processi implementati.

L'obiettivo di questo capitolo è quello di fornire ai professionisti sanitari che operano nei Centri PMA e nelle Banche Gameti aspetti metodologici di facile fruizione affinché possano mappare e presidiare le aree critiche del processo di gestione delle cellule riproduttive.

In tal senso saranno sviluppati gli ambiti:

- **della gestione delle risorse umane, al fine di qualificare la correttezza delle fasi di addestramento e mantenimento delle competenze con le sinergie tra i vari profili professionali richiesti dalla normativa;**
- **della gestione adeguata della documentazione necessaria ad attestare la presenza di un sistema qualità attivo e sinergico;**

- degli indicatori applicabili atti a misurare l'andamento delle prestazioni del Centro;
- della tipologia di audit;
- della gestione delle non conformità tipiche dei Centri PMA e delle Banche Gameti e la modalità corretta di notifica degli eventi avversi e reazioni avverse gravi;
- degli strumenti più comuni per la gestione del rischio, sia in termini proattivi che reattivi.

2. Gestione delle risorse umane

La gestione delle risorse umane rappresenta un aspetto cruciale per il corretto funzionamento di un Centro e si identifica come uno degli elementi portanti del Sistema Gestione Qualità (SGQ). Una corretta identificazione dei ruoli e delle responsabilità è da considerarsi quale elemento primario sul quale fondare un'accurata gestione delle diverse figure che entrano in gioco nel processo.

Il Responsabile Gestione Qualità (RGQ) è la risorsa qualificata, dipendente o consulente esterno che, su mandato della direzione, lavora con continuità per orientare il Centro verso il miglioramento continuo della qualità sia professionale che gestionale. È una figura prevista per legge nei Centri PMA che deve avere conoscenze degli standard nazionali e internazionali dei sistemi di gestione della qualità (es: autorizzazione all'esercizio professionale, norma ISO, ecc.) nonché dei requisiti della normativa vigente sulla specifica materia. Il RGQ implementa un Sistema di Gestione della Qualità del Centro al fine di assicurare che la gestione dei processi corrisponda alle specifiche tecniche desiderate. Oltre al coordinamento della stesura dei documenti di sistema (manuali, procedure, protocolli, ecc.) lavora in stretta sinergia con il Risk Manager e il Responsabile Sicurezza Prevenzione Protezione (RSPP) e armonizza le attività di audit interni (di prima parte), audit di fornitori esterni (di seconda parte) e audit di certificazione e/o di accreditamento (di terza parte).

Il Responsabile del Centro (RC) deve assicurare che l'attività complessiva del Centro sia conforme ai requisiti di legge e in linea con quanto stabilito dal SGQ.

Nel Centro di PMA deve essere nominato un RGQ, possibilmente diverso dal RC e dal Responsabile di Laboratorio (RL).

Nel SGQ deve essere presente l'organigramma/funzionigramma che definisca con precisione i ruoli e le responsabilità di ogni operatore, nonché le relative relazioni funzionali. Il personale deve essere in numero sufficiente alle esigenze del Centro, in relazione al volume di attività svolta e qualificato secondo il profilo professionale ricoperto.

Ogni operatore deve avere una **Scheda del Personale** nella quale si indicano le caratteristiche possedute (curriculum scolastico e professionale) così come qualifica, responsabilità, piano formativo e aggiornamento professionale (es. partecipazione a conferenze, seminari, corsi di studio, ecc.).

Tutti i membri dello staff devono essere istruiti sui loro specifici compiti e le loro responsabilità. Periodicamente lo staff deve aggiornarsi sui cambiamenti delle procedure e delle normative di riferimento con conseguente aggiornamento della scheda personale. Tali schede sono gestite dal RGQ che ne assicura l'accesso ai diretti interessati.

Al momento dell'assunzione di nuove risorse, o variazione di mansioni di personale già dipendente, deve essere messo in atto un **programma di addestramento** (Piano Sviluppo Competenze) che valuti le competenze di ciascuno. Nella Scheda del Personale sono registrati, unitamente agli indicatori individuati, anche i risultati della verifica dell'efficacia delle attività svolte. La scheda della singola risorsa riporta, inoltre, il completamento della formazione ed il conseguimento delle competenze specifiche (*allegato Logbook Training*)

Il **mantenimento delle competenze** è garantito da un numero minimo di procedure o attività e da un indicatore specifico che ne definisca il raggiungimento del grado di competenza (*allegato Logbook mantenimento competenze*). A tal fine, il Centro avrà:

- individuato le principali attività critiche da monitorare;
- definito le attività minime da svolgere;
- definito i relativi indicatori di performance su basi storiche e delle medie dei risultati pubblicati in letteratura, da ottenere per la riqualificazione periodica delle competenze per ciascun operatore.

Allo scopo di assicurare il **mantenimento delle competenze** relative alle tecniche utilizzate, per ciascun operatore potrà essere annualmente registrato il numero di attività svolte durante l'anno con relativo indicatore di performance. La valutazione sarà registrata per ciascuna risorsa sulla Scheda Mantenimento delle Competenze e ne attesta l'abilitazione alle procedure specifiche.

3. Gestione della documentazione e procedure operative standard

Le informazioni documentate del SGQ possono essere strutturate in:

- **Manuale Qualità**
Descrive il SGQ adottato individuandone le responsabilità. Rappresenta lo strumento attraverso il quale il Centro fornisce evidenza delle attività svolte per garantire la conformità dei servizi ai requisiti della norma di riferimento. Definisce l'insieme delle prescrizioni relative ai processi organizzativi e gestionali del SGQ;
- **Manuali di Processo (es. Manuale del Laboratorio)**
Contengono le procedure documentate e rappresentano i documenti di riferimento per il Responsabile di Processo (es. Responsabile del Laboratorio) e per tutte le risorse che partecipano al processo;
- **Protocolli, Procedure Operative, Istruzioni Operative**
Contengono le procedure documentate, descrivono la sequenza delle attività da svolgere nell'ambito di uno specifico processo e costituiscono documenti di supporto per l'addestramento tecnico del personale;
- **Documentazione di origine esterna**
Documenti non prodotti dalla struttura ma utilizzati come riferimento per lo svolgimento dei processi critici al fine di assicurare la conformità ai requisiti specificati;
- **Schede di Registrazione delle attività;**
- **Allegati ai Documenti.**

Ogni documento è **univocamente identificato** mediante un codice alfanumerico ed il relativo indice di revisione, che viene aggiornato ogni qualvolta una modifica viene apportata al documento stesso. La valutazione della necessità di elaborare documenti del SGQ, di apportare modifiche alla documentazione esistente o di confermarne l'idoneità è condotta annualmente dalla Direzione e dai Responsabili di Processo in occasione del riesame del Sistema Qualità o comunque ogni volta se ne evidenzia la necessità.

La verifica periodica della documentazione per la modifica o la redazione delle procedure del SGQ può, in ogni caso, scaturire a seguito di:

- audit;
- non conformità causate da carenze e/o inadeguatezze della documentazione;
- suggerimenti formulati dal personale della struttura;
- modifiche organizzative;
- modifiche delle prassi e dei metodi di lavoro.

Il RGQ verifica che i documenti elaborati soddisfino i requisiti della norma, che rispettino gli standard interni e che, nel caso si tratti di modifiche apportate a documenti preesistenti, presentino l'indice di revisione aggiornato. Inoltre, individua quali collegamenti esistono tra il documento in elaborazione (o modifica) e la parte restante dei documenti del SGQ, definendo gli eventuali altri aggiornamenti da apportare. Tutti i documenti così elaborati e identificati come bozza devono riportare le firme di coloro che ne hanno curato la preparazione. Prima di essere emessi, devono essere verificati e autorizzati per la loro emissione.

Il RGQ assicura che la distribuzione dei documenti nuovi o revisionati sia sempre preceduta dall'aggiornamento dell'**Elenco Documentazione** per tutti i documenti del SGQ. La documentazione relativa al SGQ deve essere disponibile a tutto il personale del Centro su supporto cartaceo o in formato elettronico e, dietro richiesta, a tutti coloro che sono autorizzati ad ispezionare il Centro. Deve essere prevista una procedura di controllo dei documenti per garantire che venga utilizzata solo l'ultima versione in corso. I documenti obsoleti non devono circolare, ma una copia deve essere conservata dal RGQ 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. È consigliabile rivedere la documentazione del SGQ almeno ogni tre anni. Una procedura di controllo meno rigida può essere prevista per documenti specifici (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. L'ac-

cesso alle registrazioni (es. di attività di laboratorio, pazienti, indicatori di monitoraggio, schede di registrazione e immagazzinamento dei prodotti) deve essere limitato ai soggetti autorizzati.

Per i dati conservati in formato elettronico devono essere previste procedure di backup periodico per evitare la perdita dei dati. 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.

4. Indicatori, audit e non conformità/eventi e reazioni avverse

Uno degli aspetti più rilevanti del SGQ in PMA è il monitoraggio periodico del sistema stesso, dei processi da esso controllati e la verifica dei risultati correlati. Gli strumenti più efficaci per il monitoraggio sono gli indicatori di performance (PI), le ispezioni o audit e la rilevazione costante delle non conformità (NC).

Gli indicatori di performance sono **misure oggettive** per valutare aspetti critici nel processo sanitario. Nell'ambito di un laboratorio di PMA, gli indicatori di qualità sono necessari per monitorare e valutare sistematicamente il contributo del laboratorio al percorso di trattamento della coppia e alla gestione dei gameti ed embrioni in sicurezza e qualità, e rappresentano un elemento importante all'interno del SGQ. Ogni PI dovrebbe essere **affidabile e robusto** e la raccolta di dati di routine per l'indicatore dovrebbe essere semplice. Il processo biologico o la procedura da monitorare dovrebbe essere definito. Gli indicatori chiave di performance (KPI) sono indicatori considerati essenziali per:

- valutare l'introduzione di una tecnica o di un processo;
- stabilire standard minimi per la competenza;
- monitorare le prestazioni in corso;
- benchmarking e miglioramento della qualità. In generale, i risultati di una serie di KPI forniranno una panoramica adeguata dei passaggi più importanti nel processo del laboratorio di PMA.

Diverse Società Scientifiche hanno proposto i **livelli minimi di performance (competenza) e i valori a cui aspirare (benchmark) per il labora-**

torio di PMA (*allegato Monitoraggio Indicatori*). (ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine, 2017; Vaiarelli et al., 2023). Ogni laboratorio dovrebbe selezionare il proprio set di KPI basato sull'organizzazione e sui processi del laboratorio o su qualsiasi dato disponibile e utile fornito dai registri nazionali.

Il monitoraggio costante e la valutazione dei risultati sono oggetto di verifica, insieme alle procedure, nel corso degli audit nei Centri PMA e nelle Banche Gameti e sono indispensabili per determinare che il lavoro svolto sia conforme ai requisiti del SGQ stabiliti dal Centro e che esso venga efficacemente mantenuto, in conformità alla normativa. L'attività di audit è fondamentale perché permette, attraverso la revisione critica del sistema, la sua costante valutazione e il miglioramento dei processi. Deve essere sempre pianificato specificando il team di persone che prende parte allo stesso, le persone che sono oggetto della verifica, il luogo e la data dove si terrà. Deve esistere una procedura dedicata che stabilisca come si svolge, il suo campo di applicazione, le responsabilità e le modalità operative.

L'audit interno o di prima parte è svolto in modo autonomo da una persona interna dell'organizzazione che ha conseguito l'abilitazione per svolgere il ruolo di "valutatore" ed ha come obiettivo quello di monitorare sistematicamente le performance del sistema di gestione, identificare eventuali aspetti critici e attivare il processo di miglioramento. Generalmente si esegue con **cadenza annuale**. È incentrato quasi totalmente sul monitoraggio della parte documentale a partire dalla parte organizzativa, organigrammi, riesame della direzione, piani di addestramento ed aggiornamento del personale. Mentre **l'audit di seconda parte** riguarda l'audit di fornitori esterni, **l'audit di terza parte** si riferisce ad una ispezione di certificazione e/o accreditamento (es. certificazione ISO 9001:2015, ispezione da parte del Centro Nazionale Trapianti (CNT)).

A seguito di ogni verifica deve essere prodotto un verbale, letto e approvato da tutti i partecipanti, successivamente firmato dal RC (*allegato Rapporto di Audit*). La copia del verbale deve essere archiviata dal RGQ. Le ispezioni e gli audit sono degli strumenti attraverso i quali possono emergere eventuali NC che rappresentano scostamenti dal sistema di gestione e dalle procedure. Esse possono essere rilevate da qualsiasi componente del personale del

Centro e documentate attraverso la compilazione di moduli dedicati cartacei o format digitali, con indicazione precisa dell'azione correttiva intrapresa (*allegato Registrazione NC*). Qualsiasi NC si verifichi deve essere segnalata al RC e al RGQ, a cui spetta la valutazione e la decisione di intraprendere un'azione correttiva volta alla risoluzione del problema in modo radicale, prevenendone accadimenti futuri. La richiesta di una azione correttiva può essere suggerita anche dal personale durante lo svolgimento di un'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. Inoltre, i risultati degli interventi correttivi devono essere documentati e valutati dopo l'attuazione.

I Centri, inoltre, devono notificare tempestivamente al CNT e all'autorità competente regionale le reazioni o eventi avversi gravi, così come previsto dalla normativa, utilizzando la modulistica prevista e rispettando la procedura definita.

In particolare, nei Centri di PMA e nelle Banche Gameti, le reazioni avverse gravi (RAG) devono essere rilevate, segnalate, indagate e valutate in termini di i) gravità, ii) imputabilità, iii) probabilità di ripetizione o frequenza e iv) conseguenze. Il primo passo nell'indagine è determinare la gravità. Una 'scala di gravità' può essere utilizzata per decidere se una particolare reazione avversa è grave e deve essere segnalata alla Autorità Competente. Una RAG va sempre notificata anche se solo sospetta e se la sua imputabilità non è ancora certa.

Il secondo passo è valutare l'imputabilità. L'indagine dovrebbe concentrarsi sull'individuazione del livello di imputabilità (ossia, fino a che punto i tessuti o le cellule riproduttive possono essere considerati come causa della reazione avversa). Ci si può riferire alla scala di gravità e di imputabilità all'interno della *Guide to the Quality and Safety of tissues and cells for human application* (EDQM, 2022). Il passaggio finale è la valutazione dell'impatto, che stabilisce la probabilità o la probabilità di ripetizione della reazione avversa grave, tenendo conto delle conseguenze per l'individuo, o per il sistema o per la fornitura, selezionando il caso peggiore in ogni categoria. L'utilizzo della matrice di impatto consente di determinare il livello di azione correttiva e preventiva da intraprendere.

L'evento avverso grave (EAG) è ogni evento che potrebbe influenzare la qualità e la sicurezza dei tessuti e delle cellule riproduttive, e che può essere attribuito alla loro raccolta, test, lavorazione, conservazione e distribuzione. I seguenti criteri dovrebbero essere applicati per decidere quali eventi avversi sono da segnalare alle Autorità Competenti: i) gameti, embrioni o tessuti riproduttivi inappropriati sono stati rilasciati per uso clinico, anche se non utilizzati; ii) l'evento potrebbe avere implicazioni per altri pazienti o donatori a causa di pratiche, servizi, forniture, attrezzature critiche o donatori condivisi; iii) 'mix-up' di gameti o embrioni; iv) l'evento è risultato in una perdita di tracciabilità di gameti o embrioni; v) contaminazione o contaminazione incrociata; vi) perdita accidentale di gameti, embrioni, tessuti riproduttivi (ad esempio, guasto degli incubatori, scarto accidentale, errori di manipolazione) che risultano in una perdita totale della possibilità di gravidanza per un ciclo.

Infine, annualmente il RC, supportato dal RGQ deve stilare un **riesame periodico per valutare l'efficacia del SGQ e garantire la piena conformità a tutte le normative di riferimento**. È importante che esso venga svolto in maniera critica individuando 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 e condivisi con tutto il personale. A titolo di esempio, possono essere esaminati diversi aspetti, divisi per area di attività:

Prodotto/processo

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

Sistema di gestione della qualità

- Esito degli audit e delle verifiche ispettive istituzionali;
- Analisi delle non conformità ed eventuali reazioni/eventi avversi gravi;
- Risultati delle azioni preventive e correttive adottate;
- Feedback da parte dei pazienti (reclami e soddisfazione dei pazienti).

Miglioramento continuo

- 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.

5. Valutazione e gestione del rischio

Indagare gli eventi avversi per identificare le cause che maggiormente vi hanno contribuito ed imparare dagli errori può evitare che un simile incidente si ripeta. Diversi sono i metodi e gli strumenti per l'analisi dell'errore e la gestione del rischio che sono stati sviluppati nel corso degli ultimi decenni. La finalità dei metodi di analisi è di individuare le insufficienze nel sistema che possono contribuire allo scatenarsi di un evento avverso e di individuare e progettare le idonee barriere protettive. E' possibile, a tale scopo, utilizzare due diversi approcci:

- a) Approccio proattivo: l'analisi parte dalla revisione dei processi e delle procedure esistenti, identificando, nelle diverse fasi, i punti di criticità. Questo approccio può essere utilizzato anche nella ideazione e progettazione di nuove procedure, di processi e di tecnologie per realizzare barriere protettive che impediscano l'errore umano/attivo;**
- b) Approccio reattivo: l'analisi parte da un evento avverso e ricostruisce a ritroso la sequenza di avvenimenti con lo scopo di identificare i fattori che hanno causato o che hanno contribuito al verificarsi dell'evento.**

Tra gli strumenti di gestione del rischio più adottati nell'ambito sanitario rientrano la **Failure Mode, Effects and Criticality Analysis (FMECA)** e la **Root Cause Analysis (RCA)**. Pur non essendo obbligatori, sono strumenti utili che possono essere applicati per implementare la sicurezza in un approccio orientato alla qualità. Inoltre, è fondamentale riconoscere che il loro successo dipende da un rigoroso impianto metodologico e dalla preparazione culturale del team di risk management. Questi professionisti devono essere adeguatamente formati non solo nelle tecniche specifiche di analisi e valutazione del rischio, ma anche nel contesto culturale più ampio della

sicurezza del paziente e della qualità delle cure.

La **RCA** è uno strumento per il miglioramento della qualità, che aiuta gli individui e le organizzazioni a identificare le cause e i fattori contribuenti correlati ad un evento avverso e sulla base dei risultati possono essere sviluppati progetti di miglioramento. La RCA è un'analisi retrospettiva che consente di comprendere cosa, come e perché è accaduto un evento e può essere applicata in tutti gli ambiti sanitari incluso quello della PMA.

La **FMECA** è un metodo per identificare le vulnerabilità dei processi con approccio proattivo con l'obiettivo di evitare eventi avversi. È quindi un metodo di valutazione quantitativa, basato sull'analisi dei fattori di rischio del sistema, delle relative conseguenze e dei fattori associati ad esse e l'attribuzione di un indice di priorità di rischio calcolato in base alla stima della gravità delle relative conseguenze, della loro probabilità di accadimento e della possibilità di essere rilevato.

Entrambe le metodiche sono descritte in dettaglio nel documento redatto dal Ministero della Salute (Dipartimento della qualità direzione generale della programmazione sanitaria, dei livelli di assistenza e dei principi etici di sistema ufficio III, 2007), oltre che in altri sistemi orientati alla qualità. Si sottolinea l'importanza delle pubblicazioni sul tema, ove si suggerisce che l'uso della FMECA nel campo della PMA è sia efficace che adattabile, basato su una solida base di evidenze (Rienzi et al., 2015; Intra et al., 2016; Cima-domo et al., 2016; Rienzi et al., 2017; Maggiulli et al., 2020).

La checklist si può considerare uno strumento di valutazione del rischio semplice e poco costoso, rappresentata da una lista di voci per l'esecuzione di controlli. Nello specifico, la checklist è un elenco esaustivo di cose da fare o da verificare per eseguire una determinata attività. Nello svolgimento di attività routinarie, che prevedono molti passaggi e richiedono particolare attenzione, la spunta di elementi di una lista di controllo è il metodo più sicuro per ridurre il rischio di errore (*allegato Checklist*).

Un esempio di strumento di valutazione dei rischi che può essere utilizzato per minimizzare il rischio di contaminazione durante il prelievo e le attività di preparazione di gameti ed embrioni è il **Microbiological Risk of Contamination Assessment (MiRCA)**, sviluppato dall'EDQM mirato alla valuta-

zione del rischio di contaminazione microbiologica (EDQM, *Microbiological Risk of Contamination Assessment tool*). L'obiettivo di MiRCA è prevenire la perdita del prodotto a causa di contaminazione microbica durante un processo sterile e ridurre il rischio di infezione del ricevente. MiRCA si fonda sulla premessa che la fonte primaria di contaminazione microbiologica nei processi di lavorazione sterile derivi da operatori e pazienti. Di conseguenza, si focalizza sulle varie origini di contaminazione che contribuiscono al rilascio di microrganismi nel corso della lavorazione. Questo strumento online è progettato per documentare e registrare le decisioni adottate e le motivazioni sottostanti nelle diverse tappe del processo di valutazione del rischio, consentendo ai laboratori di PMA di riconoscere, valutare e mitigare il pericolo di contaminazione microbiologica nei vari processi. Inoltre, può aiutare i laboratori a definire i requisiti minimi per le loro procedure di acquisizione e lavorazione rispetto a tutti i fattori di rischio di contaminazione applicabili e a qualsiasi fase successiva di decontaminazione dopo la lavorazione.

Referenze

1. Cimadomo D, Ubaldi FM, Capalbo A, Maggiulli R, Scarica C, Romano S, Poggiana C, Zuccarello D, Giancani A, Vaiarelli A, Rienzi L. Failure mode and effects analysis of witnessing protocols for ensuring traceability during PGD/PGS cycles. *Reprod Biomed Online*. 2016; 33:360-9.
2. Conferenza Stato, Regioni e Prov. Aut. di Trento e Bolzano, 59/CSR del 15/03/2012, Accordo tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento concernente: "Requisiti minimi organizzativi, strutturali e tecnologici delle strutture sanitarie autorizzate di cui alla legge 19 febbraio 2004, n. 40 per la qualità e la sicurezza nella donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di cellule umane". (SALUTE) Accordo ai sensi dell'articolo 6, comma 1 del decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 191.
3. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 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 distribuzione di tessuti e cellule umani.
4. Decreto Legislativo 6 novembre 2007, n. 191 Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.
5. EDQM, Council of Europe. Guide to the Quality and Safety of Tissues and Cells for Human Application. 2022. 5 edizione.
6. EDQM. Microbiological Risk of Contamination Assessment tool (MiRCA), <https://soho-guides.edqm.eu/>. Ultimo accesso 3 Marzo 2024.
7. ESHRE Special Interest Group of Embryology; Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators. *Hum Reprod Open*. 2017; 2017(2): hox011.
8. Intra G, Alteri A, Corti L, Rabellotti E, Papaleo E, Restelli L, Biondo S, Garancini MP, Candiani M, Viganò P. Application of failure mode and effect analysis in an assisted reproduction technology laboratory. *Reprod Biomed Online*. 2016; 33:132-9.
9. Maggiulli R, Giancani A, Fabozzi G, Dovere L, Tacconi L, Amendola MG, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Assessment and management of the risk of SARS-CoV-2 infection in an IVF laboratory. *Reprod Biomed Online*. 2020; 41:385-394.
10. Ministero della Salute, Dipartimento della qualità direzione generale della programmazione sanitaria, dei livelli di assistenza e dei principi etici di sistema ufficio III. Sicurezza dei pazienti e gestione del rischio clinico: Manuale per la formazione degli operatori sanitari. 2007, https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_640_allegato.pdf Ultimo accesso 3 Marzo 2024.

11. Rienzi L, Bariani F, Dalla Zorza M, Albani E, Benini F, Chamayou S, MinasiMG, Parmegiani L, Restelli L, Vizziello G, Costa AN; Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR), Italy. Comprehensive protocol of traceability during IVF: the result of a multicentre failure mode and effect analysis. *Hum Reprod.* 2017; 32:1612-1620.
12. Rienzi L, Bariani F, Dalla Zorza M, Romano S, Scarica C, Maggiulli R, Nanni Costa A, Ubaldi FM. Failure mode and effects analysis of witnessing protocols for ensuring traceability during IVF. *Reprod Biomed Online.* 2015; 31:516-22.
13. Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca (SIERR), con l'approvazione dell'Ordine Nazionale dei Biologi (ONB). Documento per la definizione del profilo professionale dell'embriologo clinico. 2018. https://www.sierr.it/images/Documenti_SIERR/definizione_del_profilo_professionale_dellembriologo_clinico.pdf
Ultimo accesso 3 Marzo 2024.
14. Vaiarelli, A., Zacà, C., Spadoni, V., Cimadomo, D., Conforti, A., Alviggi, C., Palermo, R., Bulletti, C., De Santis, L., Pisaturo, V., Vigiliano, V., Scaravelli, G., Ubaldi, F. M., & Borini, A. (2023). Clinical and laboratory key performance indicators in IVF: A consensus between the Italian Society of Fertility and Sterility and Reproductive Medicine (SIFES-MR) and the Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 40(6), 1479–1494. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02792-1>

Capitolo 2.

Requisiti ambientali e controlli, disegno del laboratorio

Sono di seguito descritti i requisiti ambientali che un laboratorio di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) deve possedere e le relative modalità con cui effettuare i controlli. Sono inoltre delineate le caratteristiche progettuali di un laboratorio di PMA, tenendo in considerazione i requisiti di sicurezza previsti dalle norme di riferimento generali. In seguito sono trattate le buone pratiche per la gestione dei flussi di persone e materiali, e infine il trattamento dei campioni a rischio infettivo.

Il capitolo non tiene conto di eventuali ulteriori requisiti strutturali e ambientali previsti da normative regionali specifiche.

1. Introduzione

Il laboratorio di PMA deve essere realizzato tenendo in considerazione il **principio della conservazione dei gradienti di pressione**, in modo da consentire un costante flusso d'aria che segue la direzione pulito-sporco. Il locale che presenta la maggior criticità e quindi il maggior grado di pulizia richiesto, deve essere mantenuto in **pressione positiva** verso i locali adiacenti in comunicazione. Le caratteristiche costruttive dei locali, le procedure di ingresso, vestizione e comportamento del personale e le procedure di pulizia devono essere finalizzate al controllo della contaminazione ed al mantenimento dei criteri di classificazione.

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. **La lavorazione deve avvenire di norma sotto cappa a flusso laminare che garantisca il Grado A GMP con ambiente di fondo di grado D.** Anche la zona di accesso al laboratorio deve essere classificata (grado D) e devono essere presenti possibilmente porte interbloccate in modo da consentire un corretto flusso dell'aria e prevenire eventuali mix di aria sporca-pulita. Se la sala criobiologica risulta in continuità con i locali classificati deve rispettare anch'essa gli stessi requisiti (grado D).

La corretta progettazione e strutturazione del laboratorio, l'impianto di trattamento aria, gli adeguati ricambi orari ed il mantenimento dei delta pressori pulito-sporco rappresentano le condizioni prepedeutiche fondamentali per il raggiungimento degli standard di classificazione GMP.

La verifica dell'adeguatezza degli standard di progettazione si articola sulla misurazione periodica di alcuni parametri in determinate condizioni.

I test da implementare per fornire tale evidenza sono articolati sulla misurazione di specifiche **performance di funzionamento del sistema Heating, Ventilation and Air Conditioning (HVAC):**

- Integrità dei filtri HEPA;
- Misurazione dei ricambi orari;
- Misurazione dei delta pressori fra locali adiacenti;
- Misurazione delle condizioni termo igrometriche;
- Test di velocità dell'aria (per quanto riguarda i flussi laminari e unidirezionali);
- Misurazione di parametri fisici (conta delle particelle aerotrasportate descritti nella specifica norma ISO 14644 ed Annex 1 EU in vigore) e microbiologici (verifica della biocontaminazione delle superfici e dell'aria definiti nella norma ISO 17141, Annex 1 EU GMP ed EDQM Tissue and Cells in vigore).

Una corretta gestione dei flussi di persone e dei materiali contribuisce al mantenimento degli standard di classificazione. È necessario che i flussi di pulito e sporco siano separati temporalmente e/o spazialmente nel laboratorio e che le procedure di sanificazione, vestizione e utilizzo dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) consentano di introdurre in laboratorio materiali e operatori in sicurezza.

2. Conta Delle Particelle Aerotrasportate

La classificazione dei locali è stabilita su determinati parametri definiti nell'Annex 1 delle GMP in vigore, nel quale vengono definiti i limiti di concentrazione delle particelle aerotrasportate per metro cubo, riportati nella tabella che segue.

Grado	Limiti massimi per particelle totali $\geq 0.5 \mu\text{m}/\text{m}^3$		Limiti massimi per particelle totali $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	
	at rest	in operation	at rest	in operation
A	3 520	3 520	Non specificato ^(a)	Non specificato ^(a)
B	3 520	352 000	Non specificato ^(a)	2 930
C	352 000	3 520 000	2 930	29 300
D	3 520 000	non predeterminato ^(b)	29 300	non predeterminato ^(b)

(a) Ai fini della classificazione del locale/cappa a flusso laminare non si prendono in considerazione le particelle da 5 micron che dovranno essere invece contate nel monitoraggio in attività se applicabile.

(b) Non sono previsti limiti di accettazione nelle condizioni in operation per il grado D in quanto i limiti devono essere determinati in base alle misurazioni effettuate in campo in attività. La fase di qualifica iniziale determina poi la condizione per le successive misurazioni e limiti in operation relativi al grado D.

Nella tabella di riferimento vengono definite le dimensioni delle particelle da contare per classe di appartenenza e le condizioni **(At rest-In operation)** in cui si devono effettuare le prove di verifica.

Lo stato "at rest" prevede l'impianto di trattamento aria (HVAC) in funzione, gli strumenti ed attrezzature accese (Cappe a flusso laminare) ma senza la presenza degli operatori ed attività correlate.

La condizione "in operation" si differenzia dallo stato "at rest" per la presenza degli operatori nell'espletamento delle procedure. Al fine di garantire la tutela del materiale biologico durante i monitoraggi, è possibile simulare l'espletamento di procedure simulando condizioni operative "estreme" (es. movimenti accelerati, manipolazioni di materiale in eccesso etc).

2.1 Frequenza dei controlli di qualifica

La frequenza con la quale devono essere ripetuti i test di qualifica ai fini di dimostrare la conservazione delle caratteristiche di performance della struttura e delle attrezzature è definita come segue:

- **Per il grado A e B con frequenza almeno semestrale;**
- **Per il grado C e D con frequenza almeno annuale.**

In condizioni di sospensione prolungata del funzionamento del sistema HVAC, sia programmata, sia per sopraggiunte problematiche tecnico funzionali, si dovrà procedere, prima della ripresa delle attività, ad una valutazione dei rischi che consenta di valutare test supplementari di qualifica necessari per fornire evidenza del ripristino/conservazione delle corrette condizioni di classificazione GMP. In merito alle modalità di esecuzione della valutazione dei rischi si rimanda a quanto descritto nel capitolo 1.

2.2 Numero di punti da campionare

La tabella presente nella versione corrente della ISO 14644 definisce i punti minimi di campionamento particellare da effettuare ai fini della classificazione.

Area della clean room (m ²) (minore o uguale a...)	Minimo numero di punti di campionamento da eseguire (NL)	Area della clean room (m ²) (minore o uguale a...)	Minimo numero di punti di campionamento da eseguire (NL)
2	1(*)	76	15
4	2	104	16
6	3	108	17
8	4	116	18
10	5	148	19
24	6	156	20
28	7	192	21
32	8	232	22
36	9	276	23
52	10	352	24
56	11	436	25
64	12	636	26
68	13	1000	27
72	14	> 1000	Vedi formula di seguito

(*) in caso di area inferiore a 2 m² comunque rimane valida la richiesta di almeno un punto di indagine per la classificazione dell'ambiente.

$$N_L = 27 \frac{A}{1000}$$

Dove:

NL: è il numero minimo di punti di campionamento da eseguire (arrotondato al numero pari superiore)

A: è l'area della clean room in m²

2.3 Volume di aria da campionare

Il volume di aria raccolto per ogni singolo campione, V_s è calcolato in litri secondo l'equazione ($V_s = 20 / C_{n,m} \times 1000$) dove C_{n,m} è il limite di classe (N. di particelle per m³) per particelle aventi la maggiore dimensione considerata, specificata per la relativa classe.

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 minuto per ogni punto (ISO 14644-1: 2016, allegato A 4.4).

2.4 Posizionamento dello strumento per la conta delle particelle aerotrasportate

Per quanto riguarda la metodologia di campionamento del grado A GMP (cappa a flusso laminare di area ≤ 2 m²) il numero di punti minimo, come precedentemente espresso, è pari a 1. Il campionatore deve essere posizionato sul piano della cappa, in posizione centro laterale, con la sonda orientata verso il filtro HEPA, seguendo la direzione del flusso laminare. Il secondo punto di campionamento verrà eseguito nel lato opposto.

Per quanto riguarda l'area classificata D, la distribuzione dei punti di campionamento deve seguire il **principio della criticità**. Dopo aver calcolato il numero dei punti minimi da effettuare, secondo la tabella sopra presentata, si deve procedere ad individuare, con l'ausilio del layout arredato dei locali in pianta, quali siano le posizioni più rappresentative in relazione al rischio di contaminazione. Si deve prendere in considerazione sia che il punto scelto

possa essere fonte di contaminazione per i prodotti biologici (es. in prossimità di motori o porte di incubatori, pass box, zone di preparazione materiale etc.), sia che il punto stesso possa costituire rischio di trasferimento della contaminazione al prodotto, come ad esempio tutte quelle postazioni dove il materiale biologico risulta esposto (manipolatore ICSI, stazioni di osservazione). La scelta del posizionamento del campionatore è quindi determinata sia dalle caratteristiche della progettazione sia dalle modalità di svolgimento delle attività produttive ed è funzionale al verificare che i punti teoricamente maggiormente a rischio di contaminazione sia mantenuti sotto controllo. La sonda del campionatore deve comunque essere posizionata ad un'altezza da terra che rappresenti il teorico piano di lavoro.

Il campionatore particellare utilizzato deve essere fornito di adeguato certificato di taratura in corso di validità al momento delle prove.

3. Conta delle contaminazioni microbiologiche

Parte della classificazione GMP è rappresentata dalla conta delle particelle vitali e cioè la verifica del livello di contaminazione microbiologica degli ambienti.

Nella tabella sottostante sono riportati i limiti di accettabilità in numero di unità formanti colonie (UFC) per le diverse zone classificate: cappa a flusso laminare (grado A della norma GMP Annex 1) e l'ambiente di fondo (grado D).

I valori di riferimento si applicano a quattro tipi distinti di campionamento e possono essere suddivisi concettualmente in due aree di interesse. In particolare, riguardano la verifica della qualità microbiologica delle superfici e dell'aria.

Il livello di biocontaminazione dell'aria si distingue in campionamento attivo (con l'utilizzo di uno specifico aspiratore) e passivo (esposizione di piastre di terreno di coltura al flusso d'aria presente).

Campionamento dell'aria UFC/m³

Grado	Air sample UFC/m ³	Settle plates (diametro 90 mm) UFC/4 ore ^(a)	Contact plates (diametro 55 mm) UFC/ piastra
A	No growth		
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

(a) Le piastre di sedimentazione dovrebbero essere esposte per l'intera durata delle operazioni e cambiate secondo necessità, per una durata massima di 4 ore. Il tempo di esposizione non dovrebbe permettere la disidratazione del terreno utilizzato.

3.1 Metodi di campionamento

- **Valutazione "Air sample" (Microrganismi aerei)**

Si effettua utilizzando uno specifico "aspiratore" (campionatore aereo/SAS) che convoglia un flusso d'aria controllato sulla superficie di una piastra di terreno agarizzato. La sua funzione è quella di raccogliere una specifica quantità di microrganismi, eventualmente presenti, in un volume preciso di aria. Per quanto riguarda il grado A il volume minimo da campionare per ogni punto è 1000 litri, mentre per gradi di classificazione inferiore, come ad esempio il grado D, può essere ridotto fino a 200 litri per punto. I risultati ottenuti dopo l'incubazione delle piastre devono essere sempre espressi in UFC/m³ in modo da poterli confrontare con i limiti di riferimento stabiliti nella tabella precedente. Tale modalità di campionamento, infatti, ha la funzione di evidenziare la concentrazione dei microrganismi presenti e quindi fornire evidenza della qualità dell'aria in relazione all'efficienza del sistema di filtrazione e trattamento flussi. Vista la necessità dell'utilizzo di dispositivi di campionamento, tale tecnica viene comunemente applicata in sede di qualifica/riqualifica periodica. Il campionatore utilizzato deve essere idoneo allo scopo con certificato in corso di validità.

- **Valutazione "Settle plates" (Microrganismi per deposizione)**

Il campionamento consiste nell'esporre una piastra di terreno agarizzato al flusso d'aria presente nel punto scelto. Le particelle aerotrasportate si depositeranno sull'agar insieme ai microrganismi eventualmente presenti. Come

riportato in tabella, i tempi di esposizione della piastra non dovrebbero superare le 4 ore per non incorrere nel rischio di disidratazione del terreno.

L'approccio di campionamento è funzionale a verificare l'impatto delle attività produttive sull'ambiente e quindi indirettamente sui prodotti biologici. In funzione di ciò, il tempo di campionamento deve essere in relazione alla durata delle attività di manipolazione del materiale biologico, quindi comprendo la sessione lavorativa intera.

Tale metodica di campionamento è applicata in concomitanza ai campionamenti attivi per le sessioni di qualifica ed in modo indipendente al monitoraggio delle condizioni di operatività.

I risultati vengono espressi in UFC/piastra per max 4 ore.

- **Valutazione "Contact plates" (Piastrre per contatto)**

Per effettuare il campionamento delle superfici si utilizzano piastre da contatto (contact plates). Il dispositivo è costituito da piastre di coltura del diametro di 55 mm nelle quali il terreno agarizzato risulta esposto rispetto al profilo, permettendo così di far aderire alla superficie da campionare il terreno stesso. Dopo aver aperto la piastra, posizionare la stessa sul punto di campionamento, applicando una leggera pressione per far aderire correttamente la superficie del terreno, evitando movimenti rotatori per almeno 5 secondi. I risultati vengono espressi in UFC per piastra.

Se i punti scelti per il campionamento sono costituiti da superfici irregolari o con oggettive difficoltà di prelievo, possono essere utilizzati tamponi sterili adeguati al campionamento ambientale. Il tampone viene umidificato con soluzione sterile, di solito contenuta nel dispositivo stesso, e successivamente si effettua il campionamento di un'area di circa 25 cm² (superficie sovrapponibile alla piastra contact) applicando una rotazione continua della punta del tampone. Successivamente si procede a seminare il materiale raccolto direttamente su una piastra agarizzata da 90 mm oppure ad inviarlo, correttamente sigillato, al laboratorio di esecuzione dei test. I risultati devono essere comunque espressi in UFC/tampone (piastra) e non come concentrazione su un volume di liquido in modo da poter correttamente confrontare i risultati con lo standard di riferimento.

- **Valutazione Impronta delle dita del guanto (Piastrre per contatto)**

Il test viene impiegato per valutare l'igiene dell'ambiente di lavoro e può altresì essere utilizzato per la qualifica del personale. L'impronta delle cinque dita del guanto su piastra a contatto deve essere applicata per circa 5 - 10 secondi, facendo attenzione a non danneggiare la superficie di agar.

3.2 Terreni di coltura utilizzati

La ricerca del livello di biocontaminazione mira a valutare quantitativamente l'inquinamento biologico in relazione all'area specifica. I terreni adatti a questo scopo devono condividere caratteristiche di fertilità comune, in modo da favorire la crescita del massimo numero possibile di microrganismi, senza contenere additivi selettivi.

Schema terreni e modalità di incubazione

Microorganismi	Tipo terreno	Temperatura e tempi- stica incubazione
Aerobi	Tryptic Soy Agar (TSA) + neutralizzanti (se applicabile)	20°C-25°C per 3-5 giorni
Funghi		successivamente 30°C-35°C per 2-3 giorni
Incubazione alternativa		
Aerobi	Tryptic Soy Agar (TSA) + neutralizzanti (se applicabile)	30°C-35°C per 2-3 giorni
Funghi	Sabouraud agar	20°C-25°C per 5-7 giorni

Viene effettuata anche una lettura preliminare al termine della prima eventuale incubazione.

3.3 Numero di rilevazioni

Il numero di punti da campionare deve essere determinato mediante un'analisi dei rischi che tiene conto della struttura dei locali/attrezzature interessati e del livello di attività del laboratorio, secondo quanto specificato nella norma ISO 17141. La scelta del numero e la posizione dei punti di campionamento devono essere razionalmente motivate, al fine di fornire risultati

che siano rappresentativi del reale rischio di biocontaminazione e conformi agli standard di classificazione.

Ad esempio, per la verifica della qualità dell'aria, i punti di campionamento possono essere sovrapponibili a quelli scelti per il campionamento particellare (approccio risk based) in misura di 1/3 (come descritto nell'annex B della ISO di riferimento). Per quanto riguarda la verifica delle superfici un esempio di numero minimo può essere calcolato con la formula $3 + N/3$ (per ogni area di lavoro) dove N è il numero di punti di campionamento definito nella tabella al 2.2.

Per quanto riguarda le superfici dovranno venire presi in considerazione i punti che presentino una maggiore criticità sia in relazione all'eventuale transito del materiale biologico sia per l'impatto che le attività produttive potrebbero avere sul punto stesso. Di conseguenza, nel piano di monitoraggio è essenziale includere la verifica delle superfici situate sotto la cappa, degli incubatori e nelle vicinanze dei micromanipolatori.

3.4 Frequenza dei controlli in operatività

In condizioni operative, il monitoraggio microbiologico, sebbene fornisca risultati solo dopo 5 giorni, costituisce l'unica possibilità di mantenere un controllo oggettivo sul processo e sulle attività correlate, identificando eventuali aumenti del rischio associato al materiale biologico. Nella tabella che segue è indicata la frequenza dei controlli in operatività secondo le norme GMP, EDQM, ISO 17141.

Qualora non sia possibile attivare un piano di monitoraggio microbiologico che rispetti queste norme, la struttura deve definire un proprio piano e la frequenza dei campionamenti dopo aver valutato i rischi della lavorazione asettica sotto cappa a flusso laminare grado A. Per la valutazione dei rischi si richiama quanto descritto nel capitolo 1 e per la sua applicazione nel monitoraggio microbiologico si richiama il Capitolo 4.

DESCRIZIONE	GRADO	FREQUENZA MONITORAGGIO	LIMITI di ACCETTABILITÀ			
			at rest		in operation	
N. particelle aerotrasportate/m ³ di aria Volume per punto ($V_s = 20 / x 1000$) non < 2 litri/1 min N. punti = Tab. 2.2	A	ad ogni processo o almeno ogni 6 mesi	$\emptyset \geq 0,5$ m μ	$\emptyset \geq 0,5$ m μ	$\emptyset \geq 0,5$ m μ	$\emptyset \geq 0,5$ m μ
			3,520	29	3,520	29
	D	12 mesi - at rest	3.520.000	29.300	---	
Velocità media del flusso d'aria (m/sec)	A	6 mesi	0,36 ÷ 0,54			
	D	NA				
Velocità media del flusso d'aria alla barriera frontale (m/sec)	A	6 mesi	≥ 0,40			
Differenziale di pressione (Pa)	D	registrazione giornaliera	>10			
Verifica integrità filtri assoluti HEPA (H14)	A	12 mesi	concentrazione dell'aerosol a valle del filtro uguale allo 0,01% della concentrazione a monte del filtro			
	D					
Verifica unidirezionalità del flusso d'aria (smoke test)	A	12 mesi	in presenza di flusso laminare non devono formarsi zone turbolente			
Tempo di recupero $t_{0,01} = (t_n - t_{100})$	A	12 mesi	10 ÷ 15 minuti			
Prova dell'elettronica (lampada UV, allarmi, ventilatore, pannello di controllo e indicatori)	A	12 mesi				
Verifica temperatura grado °C	D	registrazione giornaliera	18÷24			
Verifica umidità relativa %	D	registrazione giornaliera	30÷65			

DESCRIZIONE		GRADO	FREQUENZA MONITORAGGIO	LIMITI di ACCETTABILITÀ
Verifica della contaminazione dell'aria (ricerca batteri aerobi e anaerobi e funghi)	campionamento attivo dell'aria - SAS (volume di aria = 1 m ³) microorganismi aerei piastre Ø 55 mm	A	ogni giorno lavorativo o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita
		D	6 mesi	≤ 200 UFC/m ³
	campionamento passivo dell'aria microorganismi per deposizione piastre Ø 90 mm	A	ogni giorno lavorativo o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita
		D	6 mesi	≤ 100 UFC/max 4h
Verifica contaminazione delle superfici (ricerca batteri aerobi e anaerobi e funghi)	piastre per contatto Ø 55 mm	A	al termine della lavorazione o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita
	o tampone (area strisciata 24 cm ²)	D	6 mesi	≤ 50 UFC/piastra
Verifica contaminazione del personale	Impronta delle 5 dita del guanto piastre per contatto Ø 90 mm	A	al termine della processazione o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita

La rilevazione di un fuori limite non condiziona di per sé l'approvazione del processo lavorativo relativo ma può costituire un precoce segnale di rischio aumentato. E' necessario quindi registrare, attraverso lo strumento delle non conformità, il risultato non conforme, procedere all'identificazione del microrganismo rilevato ed all'implementazione delle opportune azioni correttive e preventive se necessarie. La natura del microrganismo può aiutare ad identificare le possibili fonti di contaminazione (ambientale o operatore) e verificare la correttezza delle operazioni di pulizia e sanificazione (eventuale presenza di sporigeni e quindi adeguatezza del sanizzante in uso).

La rilevazione di fuori limite ripetuti deve avviare un'indagine più approfondita che permetta di analizzare lo stato di qualifica delle attrezzature ed ambienti, l'efficienza del sistema di trattamento aria ed eventuali cambiamenti nell'equilibrio di conservazione della biocontaminazione.

4. 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 modo tale da agevolare le operazioni di pulizia. A questo scopo, è opportuno utilizzare pareti caratterizzate da una superficie liscia e regolare, con raccordi al pavimento arrotondati. Inoltre, si consiglia l'impiego di prese elettriche a incasso, controsoffitti realizzati in materiale non poroso e sigillati, lampade complanari, bocchette di mandata dell'aria collocate a soffitto e griglie di ripresa posizionate a livello del pavimento. Per evitare l'accumulo di VOC (Volatile Organic Compounds) nell'aria all'interno del laboratorio, è consigliabile utilizzare colle e vernici idonee (basso rilascio di VOC). Inoltre, 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.

E' raccomandabile che il laboratorio sia ubicato in contiguità all'ambulatorio chirurgico/sala operatoria per consentire un passaggio diretto di gameti ed embrioni. In caso vi sia continuità tra laboratorio e ambulatorio chirurgico/

sala operatoria, entrambi i locali devono essere almeno in classe D.

Qualora il passaggio tra i due ambienti sia garantito solo da un pass box, l'ambulatorio chirurgico/sala operatoria deve rispettare i requisiti strutturali richiesti dalla normativa vigente nazionale e regionale.

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 zona classificata D e zona non classificata deve essere almeno di 10 Pa.** L'aria deve essere immessa in laboratorio dopo essere stata sottoposta a filtrazione con filtri assoluti ad alta efficienza (HEPA: High Efficiency Particulate Air con un filtraggio aria del 99.97% e che trattiene particelle con diametro $> 0.3\mu$) con un numero di almeno 10 ricambi d'aria/ora, per permettere un flusso adeguato al mantenimento della pulizia del locale. 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.

I valori di temperatura ambiente dovrebbero situarsi tra 18 e 24°C, con un'umidità mantenuta tra il 30% e il 65%. Tuttavia, si sottolinea che tali indicazioni sono suscettibili di variazioni in conformità con i requisiti minimi autorizzativi della regione di appartenenza, i quali potrebbero differire da quanto precedentemente descritto.

5. Accesso al laboratorio, flussi di persone e materiali

5.1 Accesso al laboratorio

L'accesso al laboratorio deve essere di norma **limitato ai soli operatori e al personale tecnico incaricato di eseguire le manutenzioni**, secondo procedure che limitino il più possibile perturbazioni esterne che inficiare il processo lavorativo.

5.2 Flusso dei materiali

Se l'ingresso e l'uscita del laboratorio sono coincidenti, i flussi di materiali e prodotto finito devono essere **temporalmente separati** per ridurre il rischio di incrocio tra pulito e sporco. In particolare, l'ingresso dei consumabili dovrebbe avvenire a fine lavorazione, e dovrebbe essere seguito dall'uscita

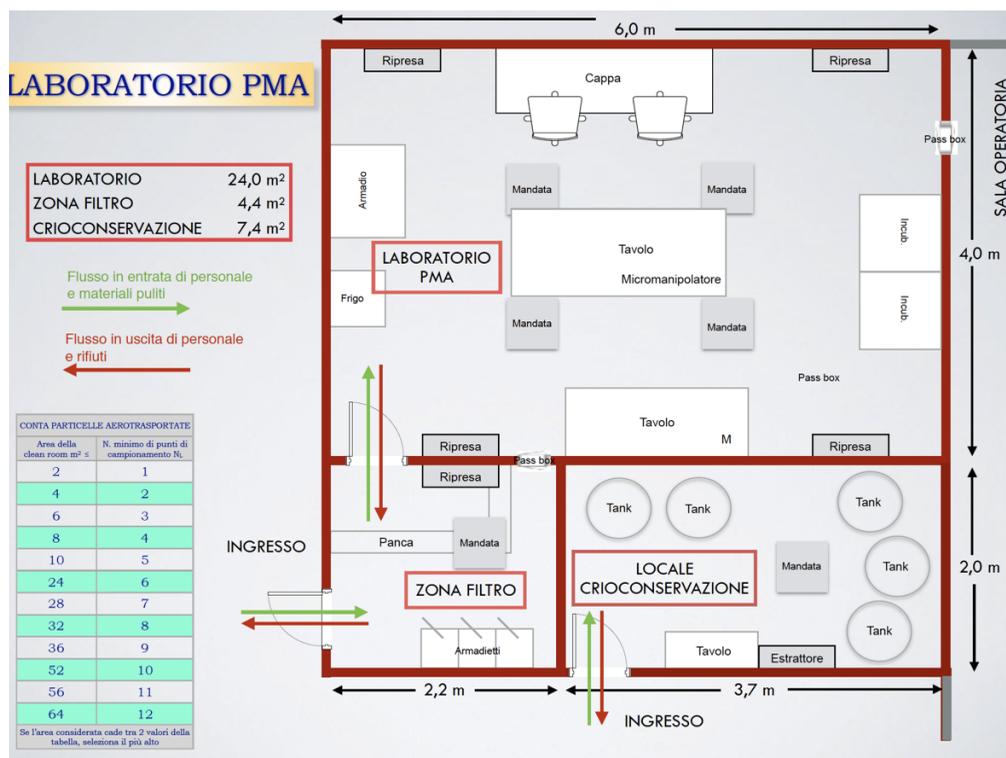
del materiale di scarto.

I consumabili devono essere introdotti in laboratorio (sia negli armadi che nel frigorifero) privi degli imballi di trasporto e delle confezioni esterne. La disinfezione dei materiali è da valutare sulla base del singolo consumabile anche in base alle sue caratteristiche fisiche e resistenza agli agenti, nonché a seconda della destinazione (es. frigorifero, armadio, cappa), ponendo particolare attenzione al materiale riposto sotto cappa (classe A).

Ogni laboratorio dovrà attenersi a quanto dettagliato all'interno delle proprie procedure di pulizia e sanificazione (si rimanda al capitolo 3).

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

Lo stoccaggio delle scorte dovrebbe essere mantenuto all'essenziale per la routine di breve periodo ed avvenire per la maggior parte in un deposito collocato fuori dall'area chirurgica e di laboratorio.



5.3 Abbigliamento e DPI

Al laboratorio si deve accedere in divisa ospedaliera/da laboratorio (preferibilmente in tessuto liscio a basso rilascio di fibre), cuffia chirurgica e mascherina.

E' opportuno ricordare che le divise, così come i camici in cotone di tipo medico, non sono dispositivi di protezione individuale; nello svolgimento delle attività sanitarie, l'operatore deve essere protetto da idonei DPI secondo i criteri di valutazione del rischio anche in ottemperanza al D.Lgs. 81/08. Nel caso si verifichi una contaminazione accidentale dell'abbigliamento o dei DPI è necessario che l'operatore provveda subito al cambio.

Pertanto 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. Le sovrascarpe sono da destinarsi ad eventuali visitatori occasionali ma non possono ritenersi idonee al permanere nella routine lavorativa. 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". La mascherina va sempre indossata durante tutte le fasi delle procedure al fine di evitare la dispersione aerea di possibili contaminanti. La mascherina va cambiata con regolarità e si dovrebbe evitare di abbassarla o rimuoverla, compiere attività differenti (come compilazione, archiviazione, spostamento di materiali) e poi re-indossarla.

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", e devono essere cambiati frequentemente e comunque ad ogni inizio e fine procedura e ogni qual volta vengano in contatto diretto con il materiale biologico per evitare il rischio di contaminare oggetti o superfici.

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.

Il lavaggio delle mani deve avvenire con prodotti adeguati che oltre alla detersione offrano anche un'attività batteriostatica, ponendo attenzione alle componenti potenzialmente embriotossiche.

Durante l'attività è opportuno rimuovere accessori come anelli, bracciali e orologi. I pendenti alle orecchie dovrebbero essere tolti o coperti dalla cuffia. Nel laboratorio classificato non devono entrare indumenti utilizzati all'esterno della zona classificata.

6. Trattamento dei campioni a rischio infettivo

Il principale aspetto di laboratorio da tenere in considerazione nella lavorazione dei campioni a rischio infettivo è la sicurezza. Innanzitutto la sicurezza della coppia e del nascituro, per cui si prevede l'utilizzo di protocolli specifici per ridurre la presenza di virus nel campione finale; in secondo luogo la sicurezza delle altre coppie in trattamento nel centro, per le quali è necessario scongiurare il rischio di cross contaminazione; infine la sicurezza degli operatori, per cui sono necessari accorgimenti specifici a tutela del personale.

E' necessario codificare una procedura operativa standard (POS) che dettagli tutta la procedura relativa ai campioni a rischio infettivo, dall'entrata in laboratorio e per tutte le fasi della lavorazione, includendo anche quali operazioni sono state definite per quanto riguarda pulizia e sanificazione.

6.1 Organizzazione del laboratorio nella gestione del materiale a rischio infettivo

E' consigliabile che i campioni potenzialmente a rischio infettivo seguano un percorso **temporalmente o spazialmente separato** dagli altri campioni al fine di mitigare il più possibile il rischio di contaminazione.

A tal fine, è possibile programmare i prelievi ovocitari e/o il trattamento del seme a fine giornata o in giornate dedicate, suddivise per tipologia di rischio infettivo. In alternativa, seppur di più difficile attuazione, è possibile individuare percorsi di laboratorio separati mediante l'utilizzo di apparecchiature e strumentazione dedicata.

Sebbene gli studi disponibili abbiano evidenziato scarsa o assente presenza di virus di HIV, HCV e HBV nel fluido follicolare e nel liquido seminale, è consigliabile utilizzare cautela in particolare durante le fasi iniziali del processamento di ovociti e spermatozoi. In queste fasi esiste un rischio di generare schizzi o aerosol potenzialmente infetti, con ipotetico rischio di contaminazione delle superfici di materiali e attrezzature. Questo rischio può essere invece considerato trascurabile durante la fase di coltura.

Di conseguenza, mentre la separazione spaziale o temporale dei percorsi è indi-

cata a livello di cappe, strumenti e attrezzature correlati (es. centrifughe, pipetatori), non è necessaria nell'utilizzo degli incubatori. Rimane fondamentale il rigoroso utilizzo di materiale monouso in contatto con fluidi, terreni di coltura e cellule e la scrupolosa attinenza alle buone pratiche di laboratorio.

E' obbligatorio per legge l'impiego di **banche separate per lo stoccaggio in azoto liquido** di gameti ed embrioni potenzialmente a rischio infettivo.

E' inoltre necessario prevedere almeno una **banca di quarantena** per conservare temporaneamente il materiale sottoposto a trattamento e in attesa del referto. Quando possibile, si consiglia l'impiego di dispositivi di stoccaggio ad alta sicurezza per la crioconservazione di gameti ed embrioni.

6.2 Sicurezza degli operatori

Solo in seguito a formazione adeguata, il personale può occuparsi della gestione del materiale a rischio infettivo. Al fine di garantire la massima sicurezza per gli operatori, è necessario che questi si proteggano durante tutte le operazioni di manipolazione del materiale, seguendo procedure ed utilizzando DPI definiti secondo la valutazione del rischio stabilita dal laboratorio. È consigliabile l'utilizzo di 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.

La frequenza del cambio dei guanti riveste particolare importanza nell'evitare la contaminazione di superfici diverse da quelle di lavorazione.

È buona prassi che tutti gli operatori del centro siano vaccinati per l'epatite B. In caso di contaminazione accidentale del personale con materiale infetto, è bene rivolgersi immediatamente ad un infettivologo ed avviare le adeguate procedure di profilassi.

6.3 Trattamento del liquido seminale

Al fine di minimizzare la probabilità che il liquido seminale trattato possa contenere particelle virali, è indicato trattare i campioni seminali a rischio infettivo attraverso gradiente di densità seguito da swim up del pellet. Tuttavia, le scelte metodologiche relative al trattamento del liquido seminale possono differire, in particolare sulla base dei parametri iniziali del campione. Dopo preparazione è possibile procedere con l'utilizzo a fresco. In alternativa, è possibile destinare un'aliquota del campione all'analisi in PCR per valutare la presenza di virus

post-preparazione, congelando il seminale trattato. il campione va mantenuto in un contenitore di quarantena fino all'arrivo dei risultati, che ne determineranno la destinazione finale.

Si ricorda che secondo normativa **è necessario che la procedura analitica di PCR sia validata per la matrice specifica.**

Qualora il campione risultasse positivo, è necessario che il contenitore di quarantena venga sanificato. L'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. E' opportuno sottolineare che nella banca di quarantena può essere contenuto un solo campione per volta in attesa di referto.

6.4 Recupero e trattamento degli ovociti

E' fortemente consigliato programmare il prelievo ovocitario in coda all'attività clinica della giornata. Alle normali procedure di lavaggio sequenziale dei complessi cumulo-ovocita recuperati, ne possono essere aggiunte altre per ridurre il più possibile il trasporto residuo di particelle virali.

6.5 Inseminazione e coltura

Sulla base del quadro infettivologico, non esiste alcuna indicazione alla preferenza tra le due metodiche di inseminazione, Fecondazione In Vitro (FIV) convenzionale e IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI).

Dopo aver utilizzato la stazione di micromanipolazione, sarà opportuno provvedere con la procedura di pulizia e sanificazione codificata.

Durante la coltura non si evidenziano rischi per i quali adottare misure riservate ai campioni potenzialmente infettivi, considerate le normali buone pratiche di laboratorio atte a garantirne la separazione e l'identificazione univoca.

In caso di crioconservazione di embrioni e blastocisti può essere favorito l'uso di sistemi chiusi ed è necessario il collocamento in banca separata secondo agente infettivo.

6.6 Pulizia e sanificazione

La strumentazione e i piani di lavoro a rischio contaminazione devono essere puliti e sanificati dopo ogni procedura secondo le proprie procedure operative e compatibilmente con l'embriotossicità dei prodotti. E' indicato passare

prima con garze sterili imbevute di acqua sterile, quindi utilizzare soluzioni contenenti ammonio quaternario, etanolo 70% o ipoclorito di sodio ed infine lasciando asciugare. In caso di utilizzo di prodotti specifici, attenersi a quanto indicato nelle singole schede tecniche.

E' 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).

Referenze

1. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 "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 distribuzione di tessuti e cellule umani"
2. GMP ANNEX 1 Rev 2022 "Fabbricazione di prodotti farmaceutici sterili" - Norma di riferimento (scopo, raccomandazioni, riferimenti attuativi, limiti di riferimento.)
3. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare EDQM 5th Edition 2022 "Guida alla qualità e sicurezza di tessuti e cellule per l'applicazione umana"
4. UNI EN ISO 14644 - 1 : 2015 "Camere bianche ed ambienti controllati associati - Classificazione della pulizia dell'aria mediante concentrazione particellare"
5. UNI EN ISO 14644 - 2 : 2015 "Camere bianche ed ambienti controllati associati - Monitoraggio per fornire l'evidenza delle prestazioni della camera bianca relativamente alla pulizia dell'aria in termini di concentrazione particellare"
6. UNI EN ISO 14644 - 3 : 2020 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Metodi di prova"
7. UNI EN ISO 14644 - 4 : 2022 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Progettazione costruzione e avviamento"
8. UNI EN ISO 17141 : 2021 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 1: Principi generali e metodi"
9. UNI EN ISO 17141 : 2021 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 2: Principi generali e metodi"

Capitolo 3.

Pulizie e sanificazione dei locali e delle attrezzature

1. Introduzione

Questo capitolo affronta la tematica relativa alla pulizia e sanificazione del laboratorio di Procreazione Medicalmente Assistita (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 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 necessaria 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.

2. Classi di disinfettanti in uso

Per le procedure di pulizia e sanitizzazione si adoperano detergenti, disinfettanti ed attrezzature varie (bastoni, aste, strofinacci, panni anti-rilascio monouso, etc.). Queste ultime devono essere di materiale facilmente 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. Per ciascun prodotto, devono essere disponibili, aggiornate ed opportunamente archiviate, le relative schede tecniche e di sicurezza (copia delle stesse deve essere fornita anche al personale incaricato per la pulizia del locale).

Composti dell'ammonio quaternario

Molti prodotti a base di composti dell'ammonio quaternario sono usati come miscele, spesso in combinazione con altri germicidi, come l'alcol. Hanno buona attività contro le forme vegetative dei batteri e dei virus con involucro lipidico e alcuni tipi (come il benzalconio cloruro) sono usati come antisettici. L'efficacia germicida di specifici composti dell'ammonio quaternario può essere significativamente compromessa dalla presenza di sostanze organiche, dalla durezza dell'acqua e dai detersivi anionici. Pertanto, è di fondamentale importanza dedicare particolare attenzione nella scelta degli agenti per il lavaggio preventivo quando si prevede l'utilizzo di composti dell'ammonio quaternario per fini di disinfezione.

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 per prevenire l'evaporazione, considerando che queste possono altresì causare l'indurimento della gomma e la dissoluzione di specifici tipi di colla. È essenziale etichettare chiaramente le bottiglie contenenti soluzioni alcoliche per evitare il trattamento in autoclave e includere la data di inizio dell'uso della miscela. Questa pratica assicura un utilizzo più efficiente della soluzione stessa. Si raccomanda la sostituzione della miscela ogni 3-4 giorni per garantire l'efficacia continua.

Perossido di idrogeno

Il perossido di idrogeno (H_2O_2), analogamente al cloro, è un potente ossidante e germicida ad ampio spettro. Tuttavia, risulta essere una scelta più sicura per l'uomo e l'ambiente rispetto al cloro. Il perossido di idrogeno è disponibile come soluzione pronta all'uso al 3% o come soluzione acquosa al 30%, che può essere diluita 5-10 volte con acqua sterilizzata.

Le soluzioni di perossido di idrogeno al 3-6% hanno un potere germicida relativamente lento e limitato. Tuttavia, i prodotti attuali contengono stabilizzatori e acceleratori che migliorano l'efficacia germicida e riducono la corrosività. Questo agente può essere impiegato per decontaminare superfici di lavoro, banchi di laboratorio e cappe di biosicurezza.

È importante notare che il perossido di idrogeno può essere corrosivo per alcuni metalli, come alluminio, rame, ottone e zinco. Inoltre, può causare decolorazione di stoffe, capelli, pelle e mucose. Gli oggetti trattati con perossido di idrogeno devono essere accuratamente risciacquati prima del contatto con occhi e mucose. Si consiglia di conservare il perossido di idrogeno lontano dal calore e di proteggerlo dalla luce.

3. Routine di pulizia nei laboratori di PMA

Nella routine dei protocolli di pulizia nei laboratori di PMA è comune l'utilizzo di disinfettanti delle classi precedentemente menzionate. Talvolta, si fa menzione dell'impiego combinato di più disinfettanti, come ad esempio l'etanolo e i composti dell'ammonio quaternario diluiti in acqua sterile. In alcuni laboratori, la scelta del disinfettante può variare a seconda che si tratti di una pulizia ordinaria o straordinaria.

Tra i disinfettanti elencati, l'etanolo al 70% è stato il più utilizzato per diversi anni, grazie alla sua ampiamente documentata efficacia battericida. Tuttavia, è noto che l'etanolo appartiene alla categoria dei composti organici volatili (VOC). Studi condotti per analizzare la presenza di VOC all'interno dei laboratori di PMA hanno evidenziato un collegamento tra le operazioni di pulizia e il rilascio di contaminanti ambientali, come l'isopropanolo, che può influenzare negativamente le colture in vitro di gameti ed embrioni (Cohen et al., 1997; Chang et al., 2010). Di conseguenza, l'uso di etanolo dovrebbe essere considerato solo se è possibile monitorare i livelli di VOC. Per quan-

to riguarda il perossido di idrogeno, il suo impiego è limitato a causa delle proprietà embriotossiche riconosciute, che sono maggiori rispetto a quelle associate all'etanolo (Catt et al., 2013).

I composti dell'ammonio quaternario sono ad oggi considerati sicuri e potrebbero rappresentare un'alternativa potenziale a tutti i disinfettanti menzionati in precedenza, con l'avvertenza costante di evitare l'esposizione degli embrioni all'agente sterilizzante o ai suoi residui (Mortimer et al., 2018).

4. Modalità operative

Generalmente la pulizia e la sanitizzazione delle apparecchiature è demandata al personale di laboratorio, mentre la pulizia dei locali è affidata al personale dell'azienda o a società esterne. In entrambi i casi, è fondamentale che queste attività siano svolte da **personale appositamente addestrato, attenendosi a procedure operative ben definite.**

L'operatore delle pulizie deve rispettare le stesse norme di comportamento, vestizione e introduzione dei materiali previste per il personale del laboratorio, così come per tutto il materiale che entra e esce dai locali a contaminazione controllata. Le operazioni di pulizia e sanitizzazione non devono interferire con le attività di laboratorio, a meno di eccezioni debitamente motivate.

La pulizia deve coinvolgere tutte le aree, comprese quelle meno accessibili. Si consiglia di iniziare la pulizia delle superfici verticali (pareti, porte, finestre, ecc.) dall'alto verso il basso, utilizzando movimenti verticali anziché circolari. Per la pulizia dei pavimenti, si raccomanda di procedere sempre dal fondo del locale verso l'uscita, seguendo strisce parallele. Per quanto riguarda i soffitti, si consiglia di procedere con strisce parallele. È preferibile iniziare dalle zone a maggior pulizia verso quelle più sporche, assicurandosi che il panno entri in contatto con le aree più pulite nelle condizioni migliori, con movimenti unidirezionali (evitando zig-zag o movimenti circolari), sovrappo-
nendo le passate di circa 2 cm.

Durante le operazioni di pulizia è essenziale utilizzare i giusti Dispositivi di Protezione Individuale (DPI), come mascherine e guanti monouso.

5. Programma di pulizia

In generale, un programma di pulizia dovrebbe comprendere sia un'attività ordinaria che una straordinaria e deve essere dettagliatamente descritto in una procedura dedicata.

Per quanto riguarda la pulizia degli strumenti e delle superfici del laboratorio, si consiglia l'utilizzo dei composti dell'ammonio quaternario in quanto dimostrano efficacia e, soprattutto, non risultano tossici per gameti ed embrioni. (Janssens et al., 2007; Verheyen et al., 2014).

Si raccomanda l'utilizzo di questi prodotti seguendo le modalità d'uso consigliate dai produttori per massimizzarne l'efficacia. Nei locali di Grado A e B, i disinfettanti e detergenti devono essere sostituiti entro un periodo di tempo prestabilito dall'apertura. È consigliabile applicare un'etichetta direttamente sul contenitore indicando la data di apertura (EDQM Ed. 5, 2022).

Per prevenire lo sviluppo di batteri resistenti, si suggerisce di adottare un approccio di utilizzo di più disinfettanti, seguendo un programma di rotazione. È consigliabile impiegare un disinfettante con proprietà sporicida diverso da quello utilizzato quotidianamente, almeno durante le pulizie periodiche effettuate nei momenti in cui il laboratorio è privo di gameti ed embrioni (Scientific Committee on emerging and newly identified health risks, 2022).

Pulizia ordinaria

- **Ambiente**

La procedura di pulizia dovrebbe iniziare dalle zone più pulite, avanzando successivamente verso quelle più sporche. Il detergente/disinfettante non andrebbe applicato direttamente sulle superfici da pulire ma piuttosto sui panni sterili. I panni dovrebbero essere conservati nella loro confezione e rimossi solo quando necessario, in prossimità della zona da pulire. Durante le operazioni, il panno, piegato in quattro, dovrebbe essere umido ma non eccessivamente impregnato per ridurre al minimo i residui lasciati sulle superfici. Con una frequenza giornaliera e al termine dell'attività lavorativa, il personale incaricato dovrebbe raccogliere tutti i contenitori destinati ai rifiuti speciali all'interno del laboratorio di PMA. I sacchi portarifiuti devono essere sigillati senza far fuoriuscire l'aria prima di essere rimossi dal contenitore e trasportati fuori dal laboratorio.

Si consiglia di pianificare la pulizia ambientale con una frequenza giornaliera per i pavimenti e almeno bimestrale per pareti, soffitti, scaffali, armadietti e lampade, adattando la programmazione al volume di attività del laboratorio. Tutte le operazioni di pulizia devono essere documentate su un modulo apposito, includendo il nome o la sigla dell'operatore responsabile (*allegato Interventi di pulizia - Laboratori*).

- **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 dovrebbero essere eseguite al termine di ogni procedura specifica di un paziente o in caso di versamenti accidentali di liquidi biologici, nonché alla fine della giornata lavorativa. In particolare, al termine di ogni procedura specifica di un paziente, come tra due prelievi ovocitari di due pazienti diversi, potrebbe essere sufficiente pulire il piano di lavoro. Tuttavia, al termine della giornata lavorativa, si raccomanda una pulizia accurata del piano di lavoro, delle pareti interne ed esterne del vetro, utilizzando panni anti-rilascio monouso sterili e il relativo disinfettante.

Inoltre, tutti gli oggetti, comprese le attrezzature presenti all'interno della cappa, dovrebbero essere decontaminati e rimossi al termine del lavoro, poiché i residui delle colture possono favorire la crescita microbica. È consigliato seguire attentamente le indicazioni del produttore del disinfettante riguardo alle modalità d'uso e ai tempi di contatto.

Per una pulizia più approfondita delle cappe, che include la griglia di ventilazione del flusso laminare e la superficie grigliata sottostante, questa dovrebbe essere registrata come un intervento ordinario secondo un programma di manutenzione predefinito.

- **Incubatori**

Si consiglia di eseguire le operazioni di pulizia ordinaria almeno mensilmente. Inoltre, è consigliabile seguire attentamente le istruzioni fornite dal produttore dello strumento, sia per la routine di auto-sterilizzazione che per la disinfezione manuale e a spruzzi.

Nel caso della disinfezione manuale a spruzzi, si suggerisce di lasciare agire il disinfettante secondo le indicazioni del produttore, impiegando sempre panni anti-rilascio monouso sterili e acqua sterile. Dopo la pulizia ordinaria,

è opportuno attendere almeno un giorno prima di riutilizzare l'apparecchio nella routine clinica. Ciò permetterà una corretta stabilizzazione dei parametri di temperatura, percentuale di CO₂ e N₂, i quali dovrebbero comunque essere verificati prima dell'inizio delle attività.

- **Microscopi**

In generale, si consiglia di pulire il microscopio alla fine di ogni giornata lavorativa e in modo più approfondito alla fine di ogni settimana di utilizzo. La pulizia quotidiana prevede la rimozione della polvere accumulatasi sulle lenti durante la giornata, la pulizia della superficie del tavolino traslatore e la rimozione dello sporco raccolto sulle lenti esterne degli oculari a causa di occasionali contatti con palpebre e ciglia.

Per questa pulizia di routine, è sufficiente rimuovere la polvere con un pennello molto morbido o con un getto d'aria compressa, come quello ottenibile con le bombolette per la pulizia delle lenti delle macchine fotografiche. Per il tavolino, è consigliabile utilizzare un panno anti-rilascio inumidito con una soluzione disinfettante.

La pulizia settimanale segue sostanzialmente le stesse procedure ma include anche la pulizia 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 altre parti del tavolino traslatore che potrebbero essere meno accessibili nella pulizia quotidiana.

Si suggerisce di coprire il microscopio con la copertura di plastica inclusa nel corredo di accessori quando non è in uso, poiché la polvere ambientale può infiltrarsi in ogni fessura e apertura del microscopio, coprendo letteralmente le lenti, anche nella loro parte inferiore o all'interno dei tubi.

- **Centrifuga**

Non è richiesta una pulizia giornaliera della centrifuga, a meno che non si verifichi una rottura accidentale di una provetta o un versamento nella vasca. Settimanalmente o ogni volta che 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. Gli accessori dovrebbero essere sciacquati con acqua distillata e asciugati con carta assorbente soffice.

- **Termoblock**

Si consiglia di pulire il termoblock settimanalmente o all'occorrenza mediante un panno inumidito con la soluzione del disinfettante prescelto, 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, riapertura del laboratorio tra un ciclo e l'altro o dopo un periodo di inattività). 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, etc.	Bimestrale
Piani di lavoro	Giornaliera
Cappa	Giornaliera
Incubatori	Mensile
Microscopi	Giornaliera/settimanale
Centrifuga	Settimanale/quando necessario
Termoblock	Settimanale/quando necessario
Frigorifero	Semestrale

5. 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 (*allegato Interventi di pulizia - Laboratori*).

Referenze

1. Catt, S., Lingham, E., Lee, W., Muthusamy, Y., Kally, C., Chen, P., Pangestu, M., Catt, J., & Temple-Smith, P. (2013). A randomised trial investigating the effectiveness and safety of three IVF laboratory disinfectants. *Human Reproduction*, 28(Suppl 1), i99-i100. [O-240].
2. Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Hum Reprod*. 1997 Aug;12(8):1742-9. doi: 10.1093/humrep/12.8.1742. PMID: 9308805.
3. Decreto Legislativo 6 novembre 2007, n. 191 Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.
4. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 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 distribuzione di tessuti e cellule umani.
5. Decreto Legislativo 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".
6. Decreto Legislativo 30 maggio 2012, n. 85. Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16, recante 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 distribuzione di tessuti e cellule umani.
7. Direttiva 2006/17/CE della Commissione dell'8 febbraio 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani.
8. Direttiva 2004/23/CE Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 31 marzo 2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani .
9. Direttiva 2006/86/Ce Della Commissione del 24 ottobre 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio 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.

10. Good Manufacturing Practices Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. EDQM 5TH Edition 2022.
11. Tien-cheng “Arthur” Chang, PhD, ELD, Carlton A. Eddy, PhD, Ethan S. Jacoby, BA, Mario O. de la Pena, BS, Robert G. Brzyski, MD, PhD, and Robert S. Schenken, MD; Human sperm survival bioassay to examine toxicity of a new clinical laboratory equipment disinfectant. poster ASRM 2010.
12. Laboratory Biosafety Manual, terza edizione (2004). Organizzazione mondiale della sanità.
13. Manuale per le Banche dei Tessuti (I edizione settembre 2009).
14. Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST, et al. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 2018;36(6):658-674. doi:10.1016/j.rbmo.2018.02.005.
15. UNI EN ISO 9001 § 6.4 Ambiente di lavoro.
16. R. Janssens. Novel sterilizing solution Fertisafe™ is effective and non embryotoxic; poster ESHRE 2007.
17. Scientific Committee on emerging and newly identified health risks (SCENIHR). Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. Brussels: European Commission, 19 January 2009, available at http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf, accessed 7 April 2022.
18. Verheyen G, Sas ST, Souffreau R et al. Toxicity testing of decontaminating agents and cleaning products used in human IVF laboratories. *Hum Reprod* 2014; (29)_suppl 1. Munich: ESHRE, July 2014.

Capitolo 4.

Gestione attrezzature e strumentazione, taratura e calibrazione strumenti

1. Introduzione

I centri di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) devono possedere determinati requisiti tecnici e strutturali, come descritto dalle normative vigenti. Tutte le attrezzature e gli strumenti presenti in un laboratorio di PMA devono essere correttamente utilizzati, gestiti e corredati di adeguata documentazione, che ne attesti lo stato di utilizzo e di mantenimento, in modo da poter avere sotto sorveglianza le condizioni in cui vengono processati gameti ed embrioni. In questo capitolo verrà quindi fornito un esempio di sistema di gestione degli strumenti e delle attrezzature, affinché si garantisca sempre l'affidabilità e gli standard tecnologici necessari per eseguire le tecniche di PMA.

Lo scopo principale di un sistema di gestione delle apparecchiature è:

- **soddisfare la destinazione finale del prodotto;**
- **minimizzare ogni rischio per i donatori, i riceventi, gli operatori;**
- **assicurare la qualità e la sicurezza dei tessuti e delle cellule;**
- **mantenere costanti nel tempo le caratteristiche e l'affidabilità delle prestazioni;**
- **garantire la riferibilità delle misure effettuate nei processi e l'uso di apparecchiature efficienti per assicurare che il grado d'incertezza sia noto e compatibile con il grado di precisione e accuratezza richiesti.**

La lavorazione di tessuti e cellule umani è regolata anche da Decreti Legislativi che, fissando ben definiti standard qualitativi, richiedono:

- l'esecuzione di test di qualifica e convalida delle apparecchiature, al fine di valutare l'efficienza funzionale e prestazionale;
- l'implementazione e il mantenimento di un sistema di riqualifica periodica per mantenere lo stato qualificato;

- l'attivazione di una procedura di gestione della manutenzione delle apparecchiature critiche;
- l'identificazione e la definizione di processi adeguati a garantire che gli strumenti di misura siano tarati e verificati a intervalli specificati.

2. Requisiti minimi tecnologici per laboratori 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.

Sulla base delle best practice nazionali ed internazionali un laboratorio di PMA dovrebbe avere almeno:

Laboratorio di I livello:

- Cappa a flusso laminare verticale (classe II A nel caso di lavorazione di materiale infetto);
- Termostato (o incubatore a secco);
- Microscopio ottico a contrasto di fase;
- Centrifuga;
- Pipettatrici;
- Frigorifero;
- 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 per eseguire la tecnica ICSI);
- Stereomicroscopio;
- 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.

3. 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 (Fig. 1);
- 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** (*allegato scheda apparecchiatura e manutenzione*) 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;
- 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 critici 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 o guasto o con parametri critici non più dentro i limiti di accettabilità, l'apparecchiatura deve essere sottoposta a manutenzione straordinaria, aggiustata e riqualficata, oppure declassata o messa fuori servizio;
- Periodicamente è necessario procedere con la verifica della sicurezza elettrica dello strumento.

Nr. ID.	Nr. INV	STRUMENTO	COLLOCAZIONE	ESEMPI DI LIMITI DI SPECIFICA	ALLARME	MANUTENZIONE PREVENTIVA	DATA COLLAUDO	TARATURA	ULTIMO CONTROLLO	PROSSIMA SCADENZA	
1	128577	Cappa a flusso laminare	Laboratorio	T	37,0 ± 1,0 °C	> 38,0 °C < 36,0 °C	semestrale	16/01/2006	semestrale	30/12/2013	06/2014
				Aria	0,36 ± 0,54 m/s /specifiche del costruttore	> 0,54 m/s < 0,36 m/s	semestrale	16/01/2006	semestrale 0,05 m/s	30/12/2013	06/2014
2	137612	Incubatore	Laboratorio	T	37,0 ± 1,0 °C	> 38,0 °C < 36,0 °C	semestrale	01/10/2007	semestrale	10/12/2013	06/2014
				CO ₂	6,0 ± 1,0 %	> 7,0 % < 5,0 %	semestrale	01/10/2007	semestrale	10/12/2013	06/2014
3	120399	Congelatore verticale	Stoccaggio	< - 70 °C	< - 70 °C	semestrale	17/11/2003	semestrale	13/12/2013	06/2014	
4	124745	Frigorifero verticale	Stoccaggio	2,0 – 8,0 °C	> 8,0 °C < 2,0 °C	semestrale	16/11/2004	semestrale	10/12/2013	06/2014	
5	117357	Contenitore criogenico	Sala criobiologia	< - 150 °C	> - 150°C	semestrale	16/05/2003	semestrale	10/12/2013	06/2014	
6	138047	Contenitore criogenico	Sala criobiologia	< - 190 °C	> - 190°C	Semestrale	28/01/2008	semestrale	10/12/2013	06/2014	
7	125791	Pipetta di precisione	Laboratorio	50 ÷ 200 µl		Annuale	16/05/2003	Annuale	10/12/2013	12/2014	

Figura 1. Elenco delle apparecchiature

4. Qualifica delle apparecchiature

Validazione (o **qualifica** nel caso di apparecchiature, sistemi o ambienti) significa la produzione di prove documentate, in grado di garantire con un elevato livello di certezza che determinati procedimenti, attrezzature o ambienti diano luogo a un prodotto conforme alle specifiche e alle caratteristiche qualitative prestabilite; un procedimento è convalidato al fine di valutare se un sistema funziona efficacemente in rapporto all'impiego.

In altre parole, la qualifica è l'evidenza documentale che i locali, sistemi e le apparecchiature siano adeguatamente installati e che funzionino correttamente fornendo i risultati attesi.

È necessario quindi realizzare il **piano di verifica funzionale/qualifica**, documento che descrive gli approcci e la metodologia per la qualifica e convalida di sistemi e apparecchiature che hanno o possono avere un impatto diretto sulla qualità, efficacia e sicurezza del prodotto finale (*apparecchiature critiche*).

In tale documento deve essere presente:

- parte introduttiva e descrittiva delle apparecchiature o sistemi da qualificare;
- riferimenti normativi;
- definizione delle modalità di qualifica e delle responsabilità connesse;
- criteri di accettazione dei risultati ottenuti;
- periodicità della qualifica/riqualifica;
- gestione delle deviazioni e delle modifiche;
- gestione della documentazione e delle registrazioni (work sheet, check list).

Quali sono le apparecchiature da convalidare

Tutti gli apparecchi/strumenti "*critici*" (critico è "*ciò che ha potenzialmente effetto sulla qualità e/o la sicurezza di cellule e tessuti o è a contatto con cellule e tessuti*") per il processo produttivo e per le analisi di controllo di qualità devono essere validati, quindi:

- attrezzature direttamente coinvolte nel processo produttivo: incubatore, cappa, microscopi, micromanipolatori, centrifughe;
- attrezzature indirettamente coinvolte nel processo produttivo: UTA,

frigoriferi/congelatori, criocontenitori;

- attrezzature per controllo qualità: sono gli strumenti che vengono utilizzati per l'esecuzione di controlli di processo/monitoraggio, di supporto alle attività di laboratorio (es. termometri, analizzatori di gas, pH-metri, anemometro).

Quando si esegue la qualifica

La qualifica di un apparecchio/strumento deve essere effettuata:

- al momento dell'acquisizione/installazione;
- ad ogni variazione sostanziale di utilizzo;
- una volta all'anno secondo un piano che deve essere preventivamente definito;
- se sottoposto a manutenzione programmata (semestrale o annuale), può essere riqualificato ogni due - tre anni, o a seconda dell'utilizzo, dell'usura, della criticità del sistema.

Le qualifiche vanno eseguite nei luoghi di installazione degli apparecchi/strumenti.

Report di qualifica

È il sommario finale di qualifica/convalida che riassume le informazioni raccolte durante l'esecuzione del protocollo di qualifica/convalida. Deve contenere:

- risultati delle verifiche eseguite;
- rispondenza ai requisiti del protocollo di verifica funzionale/qualifica;
- soddisfazione dei criteri di accettazione;
- eventuali rapporti di deviazione e azioni correttive intraprese;
- giudizio finale sull'apparecchio/strumento e sua idoneità all'utilizzo nel processo produttivo;
- eventuali suggerimenti per la riqualifica/riconvalida.

Chi esegue la qualifica

La qualifica di un apparecchio/strumento può essere eseguita da un operatore addestrato:

- servizio tecnico/ingegneria clinica;

- ditta fornitrice;
- consulente esterno esperto;
- aziende specializzate insieme ad operatori della Struttura.

L'Organizzazione deve tuttavia partecipare all'esecuzione ed approvare, ricevere, controllare, sottoscrivere, conservare tutta la documentazione della qualifica/convalida con i risultati delle prove eseguite.

5. 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. Sono inoltre forniti strumenti al fine di comprendere sempre le attività di qualifica eseguite dalle aziende specializzate così da poter monitorare i controlli effettuati.

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 non è tecnicamente possibile eseguire il procedimento richiesto in un ambiente di grado A (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 (provista 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 utilizzata durante tutte le fasi della lavorazione (trattamento del liquido seminale, trattamento del liquido follicolare, decumulazione ovocitaria, transfer embrionale).

Questo tipo di cappa assicura la protezione del campione ma non dell'operatore né dell'ambiente.

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 e dell'ambiente. 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 particelle aventi dimensione $\geq 0,5$ e ≥ 5 micron (GMP – Annex1). 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 possano 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 (vedi capitolo1).

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.

Questo tipo di cappa assicura la protezione solo del campione.

Attività per la Qualifica e il Monitoraggio della cappa a flusso laminare verticale

La cappa a flusso laminare deve essere qualificata e monitorata in conformità con le norme EN ISO 14644, EN 17141 e EU GMP Allegato 1 (EDQM Ed. 5 2022, punto 8.5).

La contaminazione nell'area sotto cappa a flusso laminare verticale (grado A GMP) deve essere pressoché nulla perché il danno che potrebbe causare sul processo o sul prodotto è molto grave e non può essere rimosso da attività successive.

Le attività di monitoraggio, quindi, devono essere frequenti e prevedere l'impiego di metodi quali:

- la verifica della concentrazione delle particelle aerotrasportate "at rest" e "in operation" entro i livelli predefiniti;
- il campionamento attivo dell'aria;
- piastre a sedimentazione, piastre a contatto per controllo delle superfici di lavoro allo scopo di garantire la sicurezza biologica per la protezione del prodotto e la tutela del lavoratore e dell'ambiente.

Tutte le prove, dei parametri fisici e di riqualifica delle cappe a flusso laminare, devono essere eseguite da professionisti qualificati.

DESCRIZIONE	FREQUENZA QUALIFICA	FREQUENZA MONITORAGGIO	LIMITI di ACCETTABILITÀ	
N. particelle aerotrasportate/m ³ di aria • campionamento = 0,690 litri di aria • n. punti = Tab. A.1 ISO 14644 - 1 : 2016 = 1 punto per Area ≤ 2 m ²	6 mesi at rest e in operation	ad ogni processo o almeno ogni 6 mesi	Ø ≥ 0,5 µm	3.520
			Ø ≥ 5 µm	29
Velocità media del flusso d'aria (m/sec)	12 mesi	6 mesi	0,36 ÷ 0,54	
Velocità media del flusso d'aria alla barriera frontale (m/sec)	12 mesi	6 mesi	≥ 0,40	
Verifica integrità filtri assoluti HEPA (H14)	24 mesi	12 mesi	concentrazione dell'aerosol a valle del filtro uguale allo 0,01% della concentrazione a monte del filtro	
Verifica unidirezionalità del flusso d'aria (smoke test)	24 mesi	12 mesi	In presenza di flusso laminare non devono formarsi zone turbolente	
Tempo di recupero $t_{0,01} = (t_n - t_{100})$	24 mesi	12 mesi	10 ÷ 15 minuti	

DESCRIZIONE		FREQUENZA QUALIFICA	FREQUENZA MONITORAGGIO	LIMITI di ACCETTABILITÀ
Prova dell'elettronica (<i>lampada UV, allarmi, ventilatore, pannello di controllo e indicatori</i>)		12 mesi	12 mesi	
Verifica della contaminazione dell'aria (<i>ricerca batteri aerobi e anaerobi e funghi</i>)	campionamento attivo dell'aria - SAS (volume di aria = 1 m ³) microrganismi aerei ISO 17141 : 2021 1 punto per A ≤ 8 m ² piastre Ø 55 mm	12 mesi	ogni giorno lavorativo o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita
	campionamento passivo dell'aria microrganismi per deposizione piastre Ø 90 mm	12 mesi	ogni giorno lavorativo o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita
Verifica contaminazione delle superfici (<i>ricerca batteri aerobi e anaerobi e funghi</i>)	ISO 17141 : 2021 3 punti per A ≤ 2 m ² piastre per contatto Ø 55 mm	12 mesi	al termine della lavorazione o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita
Verifica contaminazione del personale	Impronta delle 5 dita del guanto piastre per contatto Ø 90 mm	12 mesi	al termine della processazione o in base alla valutazione dei rischi	0 crescita

> Verifica della concentrazione delle particelle aerotrasportate sotto cappa a flusso laminare (grado A):

- il volume di aria raccolto per ogni singolo campionamento ($V_s = 20/C_{n,m} * 1000$) è pari a 690 litri;
- il numero minimo di punti di campionamento è ricavato dalla tabella tab. A.1 della ISO 14644 - 1 : 2015 in funzione della superficie della camera bianca espressa in metri quadrati (1 punto se la superficie è ≤ 2 m², 2 punti se è > 2 ≤ 4 m², ...). Se il valore della superficie cade tra due valori consecutivi della tabella, si deve selezionare il maggiore dei due;
- dove sono necessarie informazioni sulla stabilità della concentrazione delle macroparticelle, di dimensione ≥ 5 µm, fare tre o più misurazioni

in punti selezionati in intervalli di tempo concordati tra cliente e fornitore;

- la zona bianca ha raggiunto la classificazione specificata per la pulizia dell'aria se i valori medi delle concentrazioni delle particelle misurati in corrispondenza di ciascun punto di campionamento non superano i limiti di concentrazione predefiniti;
- Il test di conteggio delle particelle aerotrasportate sotto cappa a flusso laminare va eseguito nelle condizioni "at rest" e "in operation".

> **Verifica della biocontaminazione "in operation":**

- utilizzo di terreni di coltura semplici e/o arricchiti e/o selettivi per la conta microbiologica totale e per ricerche microbiche specifiche (es.: lieviti e muffe);
- il numero di punti per il **campionamento attivo dell'aria** è ricavato dalla tabella B.2 della norma ISO 17141 : 2015 (volume di aria campionato 1m³, 1 punto per cappa e per una zona con area ≤ 8 m²);
- le **piastre a deposizione** utilizzate in attività sotto cappa devono essere esposte per la durata della lavorazione, fino a 4 ore. Se questo tempo può portare a disidratazione del terreno si utilizzano due piastre in sequenza, ciascuna per 2 ore;
- il numero di punti per il **campionamento delle superfici (piastre a contatto)** è definito nella ISO 17141 : 2021 all'allegato B punto 4.3.1 in base all'area della zona pulita (3 punti per cappa con area ≤ 2 m²);
- 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 ambiente a temperatura controllata 2 ÷ 10°C per un tempo non superiore a 24 ore;
- la metodologia dell'Incubazione delle piastre con terreno non selettivo (TSA o PCA) prevede una prima incubazione a 20 - 25°C per 3 - 5 gg (per lieviti e muffe) seguita da un'ulteriore incubazione a 30 - 35°C per altri 2 - 3 gg (per batteri): questo metodo consente di rilevare la maggior parte di batteri e funghi;
- secondo la GMP le colonie trovate nelle zone di grado A e grado B devono essere identificate per il genere o la specie; l'identificazione delle colonie dovrebbe essere fatta anche qualora la contaminazione persista anche dopo sanificazione;

- i terreni di coltura delle piastre devono essere corredati dei certificati del test di promozione della crescita (identificazione delle proprietà dei terreni di coltura per un definito numero di microrganismi 'rappresentativi'), e di idoneità del metodo (metodo convalidato in presenza del materiale campione previsto, ad es. medium di trasporto, prodotto finale etc. e nelle stesse condizioni dei test di routine, ad es. condizioni di coltura, tipo di campione, quantità di campione);
- i risultati fuori specifica devono essere gestiti secondo una predefinita procedura.

Manutenzione ordinaria delle cappe a flusso laminare

Devono essere eseguite, con adeguata frequenza, anche attività di manutenzione ordinaria che prevedono:

- pulizia con appositi detergenti dei piani di lavoro e delle pareti interne della cappa ad ogni cambio, utilizzando panni monouso sterili antirilascio (es. TNT) e adeguati disinfettanti secondo un programma di rotazione (es. quindicinale) allo scopo di evitare l'insorgenza di forme di resistenza dei microrganismi (vedi capitolo 3);
- rimozione della polvere dal sistema di ventilazione;
- taratura della temperatura del piano riscaldato.

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.

Per concludere: 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 etc.) **devono essere corredati del relativo certificato di taratura valido.**

Campionamento di verifica biocontaminazione della cappa a flusso laminare.

Le variabili nella lavorazione asettica sono molte: pulizia dell'infrastruttura locale, indumenti, tipo di cellule, numero e competenze del personale, grado di qualificazione delle infrastrutture, delle attrezzature e dei materiali utilizzati, dei metodi di trattamento, dei processi di monitoraggio ambientale, e sono strettamente dipendenti dall'organizzazione del singolo Centro. Il monitoraggio ambientale durante il processo (dei processi asettici, del materiale in entrata, delle attrezzature e degli operatori) è una salvaguardia primaria contro la contaminazione microbica delle cellule durante la lavorazione.

Il monitoraggio ambientale, diventato un requisito ai sensi della direttiva su tessuti e sulle cellule dell'UE, comprende una serie di tecniche di misurazione:

1. campionamento attivo dell'aria;
2. sedimentazione microbica;
3. campioni di contatto microbico;
4. impronte digitali;
- 5. conteggio delle particelle aerotrasportate in process sull'ambiente di lavorazione diretto (cappa a flusso laminare grado A).**

Qualora non sia possibile attivare un piano di monitoraggio microbiologico che rispetti le norme riguardanti gli ambienti (norme GMP, EDQM, ISO 17141) la struttura deve definire un proprio piano e la frequenza dei campionamenti dopo aver valutato i rischi della lavorazione asettica sotto cappa a flusso laminare grado A. Per la valutazione dei rischi si richiama quanto descritto nel capitolo 1.

Microscopi

Vengono utilizzati microscopi ottici a contrasto di fase per la visualizzazione dei gameti maschili. Tali microscopi devono essere equipaggiati 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 (Fecondazione In Vitro convenzionale);
- Invertoscopio con un micromanipolatore per effettuare le tecniche di micromanipolazione (es. ICSI, biopsia embrionaria etc.), 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 soffiello;
- 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 spo-

stamento 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 per un laboratorio di PMA avere almeno 2 incubatori 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 so-

dio, 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 et al., 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. Come per le cappe, anche per gli incubatori 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 (allegato scheda apparecchiatura e manutenzione). Tutti gli strumenti utilizzati per effettuare le qualifiche/manutenzioni degli incubatori (es. termometro, misuratore CO₂, O₂, pH-metro etc.) 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 etc.) 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 (es. 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 CO₂ consentono di regolare il pH dei mezzi di coltura. È, dunque, preferibile impostare generalmente la concentrazione di questo gas intorno al 6 % o secondo quanto indicato dal produttore dei terreni. 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 di CO₂ e O₂, e sono dotati di due vie di accesso dei gas, una alimentata dalla CO₂, mentre l'altra alimentata dall'azoto (N₂). Solitamente si cerca di utilizzare una bassa concentrazione di O₂ secondo quanto riportato in letteratura (generalmente 2 - 8% ± 1) (Wale and Gardner, 2016).

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 predispongono alloggiamenti per le piastre di dimensioni molto ridotte, in modo da ottimizzare i tempi di recupero delle giuste condizioni di coltura dopo ogni apertura degli sportelli. Gli incubatori da banco di ultima generazione, invece, utilizzano gas mixer interni.

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.

Incubatori Time-Lapse

L'incubatore Time - Lapse è un incubatore multicamera con fotocamera e microscopio integrati in grado di acquisire immagini su diversi piani focali durante tutto lo sviluppo embrionale. Tale tecnologia consente di effettuare la valutazione degli embrioni garantendo un ambiente di coltura indisturbato, al contrario di ciò che si verifica in un tradizionale incubatore, dove le frequenti aperture, necessarie durante le valutazioni embrionali, rischiano di indurre variazioni di temperatura e di gas con potenziali effetti nocivi. Le camere sono indipendenti con regolazione della temperatura e del gas: l'apertura di qualsiasi camera non influisce sull'ambiente delle altre camere. Il recupero della temperatura dopo apertura del coperchio è rapido (~ 1 minuto) come il recupero del gas (< 3 minuti). La verifica periodica della temperatura e della concentrazione di CO₂ e O₂ sono eseguite tramite l'accesso facilitato con connettori PT100/1000 e una porta di campionamento gas. La qualità dell'aria è costantemente elevata grazie a filtri HEPA/VOC. L'incubatore Time – Lapse è uno strumento dotato di controllo in continuo dei parametri critici (temperatura, CO₂ e O₂) con relativi allarmi.

Manutenzione ordinaria degli incubatori

- Rilevare i parametri critici ed effettuare registrazione di temperatura e concentrazione dei gas;
- I parametri critici dell'incubatore, temperatura e concentrazione di CO₂ e O₂ devono essere registrati in continuo su un programma informatico adeguato. Solo così è possibile allarmare l'incubatore e controllarne la funzionalità 24 ore/24 ore dopo avere definito i limiti di accettabilità dei parametri critici. Ogni deviazione dei valori dai limiti di accettabilità predefiniti può essere risolta con l'intervento puntuale dell'operatore.

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;
- Per gli incubatori Time-Lapse, oltre al controllo dei parametri critici e dei sensori, si effettua anche un aggiornamento del software che gestisce l'acquisizione delle immagini e i parametri di incubazione.

Taratura e parametri critici 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 opportunamente tarati (termometro e misuratore di CO₂/O₂), con frequenza che dipende dalla quantità di lavoro e dalle caratteristiche dell'incubatore;
- Registrare i valori di incertezza massima accettabile nell'apposita scheda logbook (allegato logbook di strumento/apparecchiatura);
- L'incubatore (come ogni strumento di misura critica) deve essere controllato in continuo 24/24 ore con software adeguato a segnalare ogni deviazione dai valori di riferimento predefiniti.

I valori di esercizio sono generalmente (e a titolo esemplificativo) i seguenti:

- Temperatura: 37,0 ± 0,5 °C;
- CO₂: 6,0 ± 0,5 %;
- O₂: 5,0 ± 1,0 %.

L'intervallo di tolleranza della temperatura degli incubatori e della concentrazione della CO₂ e O₂ dipende dalle caratteristiche dell'attrezzatura ed è un parametro predefinito per la qualità del prodotto.

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 obbligo utilizzare un incubatore con specifiche di accuratezza e precisione elevate adeguate alla qualità del prodotto predefinita. L'incertez-

za 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). L'incertezza di taratura espressa dall'accuratezza e dalla precisione definisce l'intervallo intorno al risultato medio delle misurazioni che contiene il valore vero ad un determinato livello di confidenza. Lo strumento di riferimento adottato per effettuare una taratura deve avere un'incertezza di misura uguale o minore a quella dell'incubatore.

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 (es. 5-7%).

Si consiglia di programmare la taratura della temperatura degli incubatori almeno semestrale all'inizio dell'attività per poi passare eventualmente, con risultati stabili all'interno dei range di tolleranza, ad una verifica con periodicità più lunga, 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.

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.

Filtri HEPA e filtri HEPA/VOC

La possibile circolazione all'interno dell'incubatore di contaminanti e agenti patogeni può influire negativamente sullo sviluppo embrionale. È dunque fondamentale che l'incubatore abbia dei filtri installati sulla ventola, che distribuiscano uniformemente all'interno temperatura, gas ed umidità.

Ci sono due tipologie di filtri: uno che ferma i patogeni (filtro HEPA), l'altro che ferma i contaminanti chimici e fisici (filtro HEPA VOC). Entrambi i filtri assicurano in pochi secondi, all'interno della camera di incubazione, un sufficiente scambio di aria filtrata, in modo da eliminare definitivamente entrambe le fonti di possibile contaminazione.

Questi filtri, per loro caratteristiche fisiche di costruzione, hanno un tempo di vita determinato dipendente dall'utilizzo e quindi devono essere sostituiti tenendo conto del consiglio della casa produttrice.

Controllo della biocontaminazione degli incubatori

Il campionamento del controllo microbiologico deve essere eseguito sui ripiani dell'incubatore.

L'utilizzo di tamponi, pre-inumiditi mediante soluzione fisiologica sterile (0,9%) di NaCl o un terreno di risciacquo sterile, è da preferirsi alle piastre a contatto per evitare di lasciare residui di agar all'interno dei ripiani, che potrebbero 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 lavorare con le piastre per evitare possibili contaminazioni delle stesse.

La superficie di contatto col tampone deve essere di circa 25 cm², il risultato così ottenuto sarà espresso in UFC/piastra.

Anche in questo caso la metodologia dell'incubazione delle piastre prevede l'utilizzo di un terreno non selettivo (TSA o PCA), una prima incubazione a 20 – 25 °C per 3 giorni (per lieviti e muffe), seguita da una seconda incubazione a 30 – 35 °C per 2 – 3 giorni (per batteri): il risultato fin qui esprime la maggior parte dei batteri e funghi.

La frequenza della verifica potrebbe essere mensile ed eseguita dopo la pulizia dell'incubatore.

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, da mantenere così all'interno una temperatura uniforme in cui il valore sia all'interno del range predefinito.

Manutenzione dei 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 dei frigoriferi

Controllare i termometri permanenti installati su frigoriferi e congelatori confrontandoli con un termometro campione di riferimento tarato da un laboratorio di taratura accreditato secondo quanto segue:

- verificando la taratura della temperatura (eseguita sui diversi ripiani del frigorifero o del congelatore);
- effettuando la registrazione dei dati sull'apposito logbook.

Pipettatrici

Le pipettatrici possono essere manuali, elettroniche, monocanale o multi-canale. Quelle manuali sono le più utilizzate all'interno dei laboratori. Si consiglia di:

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

6. Strumenti di misura di riferimento

I campioni di riferimento “esprimono” un valore più o meno prossimo al “valore vero” di una determinata grandezza metrologica.

I termometri, i misuratori della concentrazione di CO₂/O₂ e il pH-metro (e altre apparecchiature come il manometro, l’anemometro, il contaparticelle etc.) utilizzati come strumenti di riferimento devono essere periodicamente tarati da un Istituto Metrologico Primario o da un Centro di Taratura accreditato da Accredia o da un organismo in mutuo riconoscimento (Cooperazione Europea per l’Accreditamento EA). Pertanto, solo questi saranno in possesso di certificato a marchio ACCREDIA (o di altro Ente membro dell’European Accreditation e facente parte degli Accordi di Mutuo Riconoscimento MLA).

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 campionatori dell’aria utilizzati al fine del monitoraggio della contaminazione negli ambienti di lavoro (es. SAS) è accettabile la taratura del costruttore, purché tale verifica venga rifatta ad intervalli regolari.

7. Verifica di taratura degli strumenti di misura

“Tutte le attrezzature che dispongono di una funzione di misurazione critica devono essere tarate su un determinato parametro di riferimento, se disponibile” (Conferenza Stato – Regioni, Rep. Atti n. 66/CSR dell’8 marzo 2018).

Lo scopo principale della verifica della taratura è garantire la riferibilità delle misure effettuate nei processi e l’uso di apparecchiature efficienti per assicurare che il grado d’incertezza sia noto e compatibile con il grado di precisione e accuratezza richiesti (ISO 30012).

Gli strumenti di misura devono essere:

- a. *tarati e/o verificati a intervalli specificati o prima dell'utilizzo, a fronte di campioni di misura riferibili a campioni di riferimento internazionali o nazionali: qualora tali campioni non esistano, la base utilizzata per la taratura o verifica deve essere conservata come informazione documentata;*
- b. *identificati affinché ne sia determinato lo stato;*
- c. *salvaguardati da regolazioni, danni o deterioramenti che potrebbero invalidare il loro stato di taratura e i conseguenti risultati di misura.*

Quando un'apparecchiatura di misura viene riscontrata non adatta all'utilizzo previsto, l'organizzazione deve determinare se la validità dei risultati di misura precedenti sia stata influenzata negativamente e intraprendere azioni appropriate, per quanto necessario (ISO 9001 : 2015, Punto 7.1.5.2 'Sistemi di gestione per la qualità: Requisiti').

Caratteristiche metrologiche dello strumento di misura

Le caratteristiche metrologiche di uno strumento di misura sono l'accuratezza o scostamento dal valore nominale, la precisione o ripetibilità della misura, e l'uniformità ossia l'attitudine dello strumento a dare risultati uguali. La durata della validità di una taratura dipende essenzialmente dall'uso e dall'importanza dello strumento, solo l'utilizzatore può quindi determinare efficacemente la periodicità della verifica della taratura, che inizialmente, dopo il collaudo, può essere più frequente e poi, documentata la stabilità dell'apparecchiatura, può essere effettuata a tempi più lunghi.

Gli stessi campioni e gli strumenti di riferimento riconosciuti utilizzati per la verifica di taratura devono essere tarati e confermati periodicamente (nelle ISO è indicato ogni anno), affinché i risultati ottenuti possano essere rappresentativi del comportamento dello strumento e non di variazioni del campione utilizzato per la verifica.

Si ricorda che **la verifica di taratura deve essere eseguita:**

- **all'installazione e messa in funzione dell'apparecchiatura;**
- **dopo una manutenzione correttiva dello strumento;**
- **ai tempi predefiniti per ogni specifica strumentazione.**

Per le apparecchiature esistenti nel laboratorio di un Centro PMA può essere utile iniziare con frequenza:

- semestrale per le apparecchiature del freddo e del caldo, termometri, incubatori, termoblock, piano di lavoro della cappa etc.;
- annuale per pH-metro, misuratore di concentrazione di CO₂ e O₂ etc.

Chi esegue la verifica di taratura

La verifica di taratura può essere eseguita da:

- un laboratorio esterno all'organizzazione accreditato Accredia o da organismi riconosciuti da Accredia, per mezzo di un contratto che specifichi lo scopo e la qualità del servizio;
- un laboratorio metrologico esterno mediante procedure documentate utilizzando campioni di riferimento di sua proprietà tarati da centri di taratura accreditati o da Istituti Metrologici Nazionali;
- un laboratorio interno all'organizzazione, utilizzando campioni di riferimento tarati da centri di taratura accreditati.

La validità dell'operazione di taratura è garantita se l'elemento di riferimento è riconducibile a un campione metrologico primario: strumento/campione certificato Accredia o EA (*riferibilità delle misure*). Pertanto, a tutti gli strumenti/standard/campioni utilizzati per la taratura è allegato sempre il certificato di taratura valido rilasciato da un centro accreditato Accredia o dall'equivalente europeo riconosciuti dall'European Cooperation for Accreditation (EA).

Rapporto di verifica di taratura

La relazione o rapporto di verifica di taratura è il documento che fornisce l'insieme delle informazioni relative alle caratteristiche metrologiche di un dispositivo e alle grandezze d'influenza che ne modificano il comportamento (*allegato report taratura*).

Le informazioni quantitative che caratterizzano in modo completo un misurando e che costituiscono il risultato della misurazione, sono:

- il valore stimato;
- l'unità di misura;
- l'intervallo di incertezza;
- il livello di confidenza (che caratterizza l'intervallo di incertezza fornito).

Nel rapporto di verifica taratura viene riportata:

- la tabella dei risultati del test, sia dei dati “prima” che quelli “dopo” l’eventuale taratura vera;
- lo scostamento dal valore nominale (accuratezza);
- la ripetibilità dello strumento con intervallo di confidenza (precisione);
- i valori di riferimento, con l’errore massimo ammissibile dello strumento in oggetto;
- l’identificazione e definizione del dispositivo/campione/materiale di riferimento;
- la riferibilità metrologica dei campioni nazionali o internazionali riconosciuti utilizzata corredata dal certificato di taratura Accredia o EA, possibilmente anche i valori delle bande di errore e di avvertimento programmati, per indicare all’operatore che lo strumento rientra ancora nelle specifiche richieste ma è molto vicino al limite di errore (questa funzione risulta interessante in quanto dà all’operatore un’ulteriore informazione per consentirgli di rivalutare la frequenza di taratura dello strumento stesso).

Cosa fare qualora l’esito della verifica fosse negativo

Qualora l’esito complessivo della verifica di taratura non fosse positivo e l’apparecchiatura non risultasse conforme, si può:

- procedere alla taratura vera e propria, con un “aggiustamento” volto a portare lo strumento per misurazione nelle condizioni di funzionamento e di accuratezza per la sua utilizzazione. Dopo l’aggiustamento si esegue nuovamente la verifica di taratura;
- utilizzare l’errore osservato come fattore di correzione (agendo sull’errore sistematico, cioè sul bias o scostamento che dir si voglia);
- segregare lo strumento e provvedere alla manutenzione. Dopo la manutenzione si procede nuovamente alla verifica di taratura;
- declassare la strumentazione.

8. Pianificazione delle attività

La corretta pianificazione delle manutenzioni, delle tarature e della sorveglianza degli strumenti costituisce un requisito fondamentale. È utile quindi disporre di un **piano di manutenzione e di verifica taratura annuale** per tutte le apparecchiature.

PIANO ANNUALE MANUTENZIONE PROGRAMMATA E VERIFICA TARATURA DELLE APPARECCHIATURE														
N. Progr.	DESCRIZIONE	M/T	G	F	M	A	M	G	L	A	S	O	N	D
1	INCUBATORI	M	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		T	x											
2	MICROSCOPI	M	x						x					
3	CAPPE A FLUSSO LAMINARE	M	x						x					
4	PIANI RISCALDATI	T	x											
5	MICRO-MANIPOLATORE	M	x						x					
6	FRIGORIFERI	M	x						x					
		T	x											
7	CENTRIFUGHE	M	x											
8	PIPETTATORI	T	x											
9	TERMOMETRI	T	x											
10	RILEVATORI CO ₂ /O ₂	T	x											
11	CONTENITORI CRIOGENICI	T	x											

9. Gestione degli allarmi

Le apparecchiature di misura critica (incubatori, frigoriferi, contenitori di azoto liquido, sensori di O₂) devono avere un sistema informatico di registrazione in continuo dei valori delle grandezze di misura critiche tale da permettere di allarmare le stesse apparecchiature. Nel caso in cui i valori rilevati non siano all'interno dei range di tolleranza prestabiliti, tali sistemi devono inviare un allarme acustico e/o visivo in modo da attivare l'immediata azione correttiva da parte degli operatori coinvolti.

Apparecchiature di misura critica con sistema di allarme:

- 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.

I sistemi di allarme devono essere collegati con la rete telefonica in modo da poter allertare il personale responsabile anche quando questo è assente ma in caso reperibile. Tali sistemi, oltre ad essere già presenti all'interno degli strumenti (es. 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) possono essere collegati a centraline che effettuano il controllo da remoto di tutti i parametri critici.

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

La **gestione efficace degli allarmi** è garantita da:

- descrizione del messaggio d'allarme (es: low level alarm, high level alarm, etc.);
- descrizione delle azioni da intraprendere per l'interpretazione e risoluzione dell'allarme;
- personale da allertare (Responsabile del Laboratorio, Biologi, Assistenza tecnica delle ditte, Servizio per l'emergenza) con relativi recapiti telefonici e nominativi;
- grado di priorità dell'allarme (allarmi a priorità alta con intervento immediato /allarmi a priorità intermedia con intervento entro 2 ore).

Al fine di garantire sempre il controllo totale su tutte le apparecchiature critiche è necessario, dunque, che siano presenti turni di reperibilità degli embriologi ben definiti, in modo da poter effettuare tempestivamente interventi per la messa in sicurezza di gameti ed embrioni.

10. 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, il range di tolleranza, la periodicità della manutenzione programmata, i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica, tutto questo deve essere documentato e annotato, ad esempio, sull' **"Elenco delle apparecchiature"**.

È bene che per ogni apparecchiatura, identificata dal numero di inventario, vi sia la **"Scheda apparecchiatura"** dove è predisposta una parte riguardante le attività della manutenzione preventiva/programmata, le modalità della manutenzione ordinaria, la registrazione della verifica della sicurezza elettrica. Si consiglia, inoltre, di prevedere un'altra parte riguardante le attività della eventuale verifica di taratura: riferimento alla procedura di taratura, valore dell'errore massimo di taratura accettabile e quindi i limiti di tolleranza dell'apparecchiatura, data di svolgimento della stessa e della futura verifica, riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per il controllo (di cui si allega fotocopia del certificato di taratura valido), rapporto di verifica di taratura e firma del tecnico.

L'operatore del Centro PMA addetto al controllo delle apparecchiature verifica che le operazioni siano eseguite in conformità delle norme e delle specifiche del Centro e valuta la conformità o meno dell'apparecchiatura mediante firma e data sulla "Scheda Apparecchiatura" e sui rapporti rilasciati dal Manutentore/Tecnico della Ditta designata alle operazioni di manutenzione /taratura.

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 (**procedura di declassamento**). 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 apparecchiatura.

11. Marchi e certificazioni

Gli strumenti e le apparecchiature presenti in un laboratorio di PMA rientrano nella categoria dei dispositivi medicali e devono possedere il marchio CE. I dispositivi medicali vengono considerati tali solo se intervengono direttamente o indirettamente sulla salute dell'uomo per migliorarla anche in fase di prevenzione. È necessario dunque assicurarsi che le strumentazioni abbiano tutte le certificazioni idonee così come indicato dal regolamento **(UE) 2017/745 e quindi devono essere sottoposti al processo di Marcatura CE e riportare il marchio CE.**

12. Sistemi di testimonianza elettronica

Gli eventi avversi che negli anni si sono verificati nei centri di PMA, come l'errata identificazione e lo scambio dei gameti e dei pazienti, hanno condotto all'introduzione obbligatoria della procedura del doppio check eseguita da un secondo operatore, per tutti i passaggi critici. Tuttavia, tale protocollo risulta spesso difficile da applicare a causa delle distrazioni che subiscono gli embriologi in seguito a continue richieste del doppio controllo, rendendo così le procedure spesso vulnerabili ad errori. A tale scopo sono stati sviluppati dei sistemi di testimonianza elettronica in grado di tracciare e registrare le varie fasi delle procedure rendendole più sicure, minimizzando il rischio di errore. I sistemi più comuni ad oggi in commercio utilizzano lettori barcode o radiofrequenze. Nonostante queste tecnologie aiutino a ridurre la possibilità di errore umano, tuttavia non è possibile azzerarlo completamente. Per tale motivo è necessario effettuare una valutazione dei rischi per validare i singoli processi durante l'implementazione di un sistema di testimonianza elettronica.

DEFINIZIONI

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. E' generalmente richiesta la ri-qualifica dello strumento dopo la riparazione del guasto.

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.

Taratura: 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 (es. materiale di riferimento, strumento etc.).

Referenze

1. Biggers JD. Thoughts on embryo culture conditions. *ReprodBioMed Online* 2001; 4 : 30 – 8.
2. Brinster RL. In vitro cultivation of mammalian ova. *AdvBiosci* 1969; 4 : 199 – 233.
3. Conferenza permanente per i rapporti tra lo stato e le Regioni autonome di terni e di Bolzano. Rep. Atti n 66/CSR seduta dell'8 marzo 2018 "Accordi, ai sensi dell'articolo 6, comma 1, del decreto 6 novembre 2007, n. 191, tra il Governo, le Regioni, le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento recante "Requisiti minimi organizzativi, strutturali e tecnologici degli istituti dei tessuti per la qualità e la sicurezza nella donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane"
4. Decreto Legislativo 6 Novembre 2007, n. 191 "Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
5. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 "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 distribuzione di tessuti e cellule umani"
6. Decreto Legislativo 30 maggio 2012 , n. 85 "Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16, recante 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 distribuzione di tessuti e cellule umani"
7. Direttiva Europea 2004/23/EC "Definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
8. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare EDQM 5th Edition 2022 "Guida alla qualità e sicurezza di tessuti e cellule per l'applicazione umana"
9. Gardner D K, 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
10. 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.

HumReprod2000; 15 : 2241 – 2246

11. GMP ANNEX 1 Rev 2022 “Fabbricazione di prodotti farmaceutici sterili” - Norma di riferimento (scopo, raccomandazioni, riferimenti attuativi, limiti di riferimento.)
12. 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
13. 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
14. Legge n. 40/2004 “Norme in materia di procreazione medicalmente assistita”. *Gazzette Ufficialen.* 45 del 24 febbraio 2004
15. 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.
16. 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
17. 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
18. Peelman LJ. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 2003; 59 : 158
19. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update.* 2016 Jan-Feb;22(1):2-22. doi: 10.1093/humupd/dmv034. Epub 2015 Jul
22. PMID: 26207016.
20. Pool TB. Optimizing pH in clinical embryology. *Clin. Embryol.* 2004; 7 : 1 – 17
21. Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *HumReprod Upda-te*2003; 9 : 557 – 82
22. UNI 10127 - 1 : 1992 “Guida per la definizione degli intervalli di taratura di strumenti per misurazione: Criteri generali”
23. UNI CEI EN ISO/IEC 17025 : 2018 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura”

24. UNI CEI ENV 13005 : 2000 "Guida all'espressione dell'incertezza di misura"
25. UNI EN 12469 : 2001 "Biotecnologie - Criteri di prestazione per le postazioni di sicurezza microbiologica"
26. UNI EN 30012 - 1 : 1993 "Requisiti di assicurazione della qualità relativi agli apparecchi per le misurazioni. Sistema di conferma metrologica di apparecchi per misurazioni"
27. UNI EN ISO 10012 - 2 : 2001 "Assicurazione della qualità relativa agli apparecchi per le misurazioni. Linee guida per il controllo dei processi di misurazione"
28. UNI EN ISO 14253 - 1 : 2017 "Parte 1: Regole decisionali per verificare la conformità o non conformità rispetto a specifiche"
29. UNI EN ISO 14644 - 1 : 2015 "Camere bianche ed ambienti controllati associati - Classificazione della pulizia dell'aria mediante concentrazione particellare"
30. UNI EN ISO 14644 - 2 : 2015 "Camere bianche ed ambienti controllati associati - Monitoraggio per fornire l'evidenza delle prestazioni della camera bianca relativamente alla pulizia dell'aria in termini di concentrazione particellare"
31. UNI EN ISO 14644 - 3 : 2020 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Metodi di prova"
32. UNI EN ISO 14644 - 4 : 2022 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Progettazione costruzione e avviamento"
33. UNI EN ISO 17141 : 2021 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 1: Principi generali e metodi"
34. UNI EN ISO 9001 : 2015 "Sistemi di gestione per la qualità: Requisiti"
35. WHO. Manuale di sicurezza nei laboratori. AIREPSA 2005.
36. Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A,

Capitolo 5.

Manipolare l'azoto liquido in sicurezza

1. Introduzione

L'azoto liquido è il fluido criogenico principalmente impiegato nel mantenimento del materiale biologico crioconservato in ambito riproduttivo. Il suo utilizzo richiede competenze tecniche avanzate e un rigoroso rispetto delle norme di sicurezza per garantire il benessere del personale e la qualità delle risorse biologiche coinvolte. In accordo con questo principio, il capitolo si prefigge di offrire indicazioni dettagliate sulla corretta gestione dell'azoto liquido, sull'uso dei dispositivi di stoccaggio, sulla movimentazione all'interno degli spazi designati, sulle norme comportamentali da seguire e sull'adeguato utilizzo dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI). **Per tutti gli aspetti relativi alle caratteristiche organizzative, strutturali e tecnologiche di una sala criobiologica si rimanda a quanto riportato nelle specifiche linee guida e normativa vigente.**

2. Dispositivi di stoccaggio

All'interno della sala criobiologica, l'azoto liquido è conservato in contenitori criogenici noti come Dewar. Questi sono progettati con caratteristiche tecniche atte a garantire la sicurezza dei campioni crioconservati e a prevenire eventuali perdite di azoto liquido nell'ambiente circostante. La presenza di aree sottovuoto che separano le pareti interne del contenitore da quelle esterne consente un efficace isolamento termico tra il contenuto e l'ambiente esterno. Quelli più comunemente utilizzati nei laboratori sono realizzati in alluminio, con possibilità di riempimento e rabbocco manuale; sono leggeri e compatti, caratterizzati da un basso tasso di evaporazione statica e, di conseguenza, da un consumo minimo di azoto liquido, garantendo contemporaneamente una medio-alta capacità di stoccaggio (*Fig. 1*).

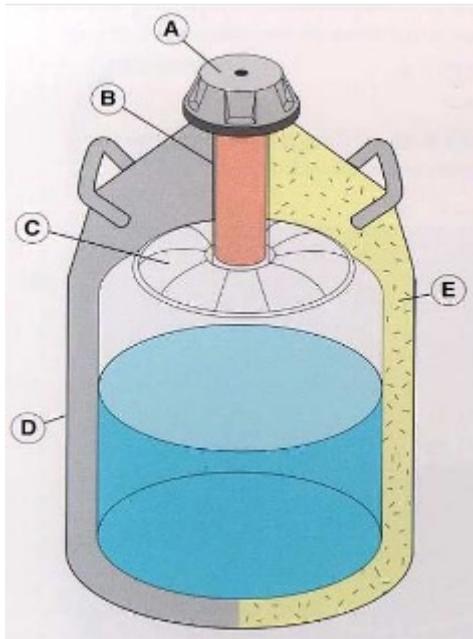


Fig.1 Rappresentazione schematica di un dewar:

- 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

La conservazione all'interno dei criocontenitori può altresì avvenire in vapori di azoto. Lo stoccaggio in criocontenitori a vapori di azoto è stato suggerito come strategia per eliminare il rischio di cross-contaminazione dei campioni, garantendo comunque sicurezza nel mantenimento dello stato criogenico. I criocontenitori possono essere a rifornimento automatico (Fig.2a) se il rifornimento di azoto avviene tramite sistema automatizzato o a riempimento e rabbocco manuale (Fig.2b) 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.2c). Le operazioni manuali di riempimento e rabbocco possono essere effettuate nella sala criogenica o comunque in locale attiguo con le stesse caratteristiche di sicurezza.



Fig. 2a Dewar a rifornimento automatico **Fig. 2b Dewar a rifornimento manuale**



Fig. 2c Criocontenitore pressurizzati specifici per il trasporto e la conservazione di azoto liquido

Esistono, inoltre, dispositivi per lo stoccaggio a breve termine in vapori di azoto (dry shipper) per movimentare campioni biologici, a breve e lungo raggio. Tali contenitori possono essere riutilizzabili o monouso, attenendosi alle istruzioni fornite dal produttore, in particolare quelle relative alle tempistiche di stazionamento del campione all'interno (Fig. 3a e 3b).



Fig. 3a Dry shipper



Fig. 3b Dry shipper monouso

È necessario avere delle Procedure Operative Standard relative alle modalità di approvvigionamento di azoto liquido, nonché di entrata/uscita e sanificazione dei criocontenitori dedicati al rabbocco.

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.

Ciascun criocontenitore dedicato allo stoccaggio deve essere **univocamente identificato con descrizione della tipologia del materiale biologico contenuto** e può essere etichettato con la denominazione del Centro di appartenenza; inoltre, è necessario che siano adeguatamente corredati di maniglie e/o carrello per consentirne, in caso di necessità, il rapido spostamento.

L'utilizzo di un codice colore sull'etichetta del dewar, per il quale è necessario riportare una legenda, potrebbe aiutare nell'identificazione del contenitore che richieda priorità di uscita in caso di evacuazione. Ad esempio

si potrebbe utilizzare il colore rosso per gli embrioni, giallo per ovociti o tessuto ovarico e verde per spermatozoi o tessuto testicolare. Tale strategia dev'essere chiaramente descritta nella procedura operativa dedicata alla gestione delle emergenze. Per far fronte ad eventuali eventi avversi, quali malfunzionamento o necessità di eseguire manutenzione e/o sanificazione dei criocontenitori, è opportuno avere a disposizione un criocontenitore libero e attrezzato per lo stoccaggio, sempre rifornito di azoto.

Sebbene sia consigliabile pianificare gli interventi di manutenzione e sanificazione in successione, la gestione di tali procedure e la programmazione delle scadenze dipendono da variabili come la tipologia e la capienza dei criocontenitori e la frequenza di apertura. Tali aspetti devono essere definiti nelle Procedure Operative Standard.

Per le modalità di pulizia e prove di evaporazione periodiche dei dewars si suggerisce di riferirsi al manuale di uso e manutenzione del fornitore.

3. Norme comportamentali

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

I principali rischi legati alla manipolazione dell'azoto sono:

- **ustioni da contatto** con azoto liquido (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 temperatura può compromettere la funzionalità polmonare.

Per ridurre il rischio da contatto nelle fasi di lavorazione è necessario indossare i seguenti DPI (*Fig. 4*) marcati CE:

- occhiali o visiere facciali (*Fig. 4, A*) per la protezione da spruzzi di liquido criogenico: conforme alla norma EN 166;
- guanti criogenici (*Fig. 4, B*) (DPI di II categoria conforme alle norme EN 511). È consentito l'utilizzo di guanti monouso (es. lattice, nitrile), con sottoguanti di cotone in filo continuo, per le operazioni in cui l'uso dei guanti criogenici metterebbe a rischio la manipolazione del campio-

ne in sicurezza (es. per manipolare le paillette durante l'estrazione dal contenitore di stoccaggio mediante l'uso di pinze);

- grembiule e pantaloni lunghi o tuta contro gli spruzzi alle gambe o altre parti del corpo (Fig. 4, C) (DPI di II categoria conforme alle norme EN 511);
- calzari a protezione dei piedi e del polpaccio; zoccoli senza buchi o ghette (Fig. 4, D).



Fig 4a Visiera



Fig. 4b Guanti criogenici



Fig. 4c Grembiule



Fig. 4d Ghette

In merito alle norme comportamentali specifiche di prevenzione, se ne riporta di seguito un elenco, non esaustivo:

- maneggiare sempre l'azoto liquido con la massima cautela;
- tenere il contenitore aperto per il tempo più breve possibile per evitare il pericolo di condensazione e saturazione dell'ambiente;
- 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;
- tenersi sempre ad una distanza di sicurezza dall'azoto che bolle o schizza e dal gas da esso emanato;
- 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 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 dell'azoto liquido;
- evitare di lavorare da soli durante le attività che comportino l'uso e/o la manipolazione dell'azoto liquido;
- 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;
- utilizzare solo materiale idoneo alla misurazione manuale del livello di azoto liquido (non utilizzare ad esempio tubi per evitare l'effetto camino).

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 percentuale di ossigeno nel locale (tenendo conto delle diverse situazioni operative possibili come la 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.

4. Movimentazione di azoto liquido tra gli ambienti di stoccaggio e il laboratorio

Particolare attenzione va prestata alla **movimentazione di azoto liquido tra gli ambienti di stoccaggio e il laboratorio**. All’interno della procedura operativa dedicata, è necessario descrivere le modalità con le quali avviene il percorso, in particolare qualora la sala criogenica non sia in prossimità del laboratorio; ad esempio, per dislivelli che richiedono l’utilizzo di ascensori o montacarichi, i contenitori con l’azoto liquido devono viaggiare separatamente rispetto agli operatori, con priorità e blocco di chiamate o in alternativa con un operatore per piano che faccia da blocca porte. Qualora la sala criobiologica ed il laboratorio siano in prossimità l’uno dell’altro si consiglia, in presenza di un secondo operatore, il trasporto su un carrello della vaschetta con azoto liquido, adeguatamente chiusa da coperchio non a tenuta.

Durante le operazioni di vitrificazione/devitrificazione potrebbe essere necessario rabboccare ulteriormente la vaschetta con azoto liquido; tale procedura andrebbe eseguita in sala criobiologica ma per motivi logistici è possibile effettuarla in laboratorio utilizzando un dewar con all’interno un volume ridotto di azoto liquido (non superiore a 1L).

La vaschetta per l’azoto liquido andrebbe posizionata preferibilmente sotto

cappa, in prossimità del microscopio, isolandola dal piano eventualmente riscaldato.

Qualora l'inserimento della vaschetta sotto cappa risulti di difficile applicazione, è possibile posizionarla su un carrello adiacente al piano della cappa.

In commercio sono disponibili diverse tipologie di vaschette per il mantenimento dell'azoto liquido durante le procedure di vitrificazione/devitrificazione. Alcune di queste si presentano costituite da un contenitore interno in acciaio, estraibile e sterilizzabile. Nel caso in cui si opti per questa tipologia si raccomanda una decontaminazione frequente. Esistono altri contenitori monouso che permettono, inoltre, di tenere traccia della fase di decontaminazione. Al fine di minimizzare ulteriormente il rischio di contaminazione ambientale e dei campioni biologici è possibile utilizzare azoto liquido pre-sterilizzato prima dell'uso.

Referenze

1. Decreto Legislativo 6 novembre 2007, n. 191 "attuazione della direttiva 2004/23/ce sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
2. Decreto legislativo n. 81, 9 aprile 2008 (gazzetta ufficiale n. 101 del 30.04.08, supplemento ordinario n. 108), art.20
3. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 "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 distribuzione di tessuti e cellule umani"
4. Decreto Legislativo 30 maggio 2012 , n. 85 "modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16, recante 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 distribuzione di tessuti e cellule umani"
5. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare EDQM 5th edition 2022 "guida alla qualità e sicurezza di tessuti e cellule per l'applicazione umana"
6. Legge n. 40/2004 "norme in materia di procreazione medicalmente assistita". Gazzette ufficiale n. 45 del 24 febbraio 2004
- 7 Linee guida per la sala criobiologica di un istituto dei tessuti - 2014

Capitolo 6.

Movimentazione e trasporto di gameti ed embrioni tra centri

1. Introduzione

La movimentazione di gameti ed embrioni tra Istituti dei Tessuti (tra cui centri Procreazione Medicalmente Assistita - PMA) deve avvenire nel rispetto delle condizioni previste dalle norme vigenti, in particolare dal Decreto legislativo N. 191/2007, dal Decreto legislativo N. 16/2010 e dal Decreto Legislativo del 10 ottobre 2012. Al fine di garantire una corretta movimentazione del materiale biologico, ogni Centro di PMA deve disporre di una specifica procedura operativa scritta che definisca le indicazioni da adottare per il mantenimento della qualità, della sicurezza e la tracciabilità del materiale biologico trasportato.

2. Avvio della procedura di movimentazione

La procedura di movimentazione si attiva nel momento in cui il Centro che riceverà il materiale crioconservato (**Centro Ricevente**), a nome del paziente (in caso di movimentazione di campione seminale crioconservato o di ovociti) o della coppia (in caso di movimentazione di embrioni), inoltra **una richiesta di trasferimento del materiale crioconservato** (*allegato Richiesta Movimentazione Materiale Biologico*) al Responsabile del Centro che conserva il materiale (Centro Inviante).

Il paziente/coppia che intraprende un percorso di PMA e necessita la movimentazione di materiale crioconservato presso altro Centro sottoscrive la richiesta ufficiale e rilascia l'autorizzazione del trattamento dei dati personali in base all'art. 13 del D. Lgs. 196/2003 e all'art. 13 GDPR 679/16, consentendo ai centri di PMA la condivisione di informazioni sensibili sul proprio stato di salute e sul materiale crioconservato.

Il Responsabile del Centro Inviante (o il personale da lui incaricato) valuta la richiesta e predispone tutta la documentazione necessaria, sia per quanto

riguarda la certificazione dell'idoneità clinica del paziente (esami, anamnesi ove prevista) che per gli aspetti di tipo tecnico/biologico (lavorazione, tracciabilità, test effettuati, ...). Una volta raccolta, la documentazione inerente al materiale da spedire può essere anticipata tra i due Centri, anche a mezzo e-mail, adottando specifiche misure di sicurezza per prevenire la perdita dei dati o accessi non autorizzati ai dati sensibili dei pazienti. Il personale incaricato della gestione del trasporto compila l'apposito modulo contenente tutte le informazioni necessarie (*allegato Scheda Trasferimento Materiale Biologico*).

Ai fini del successivo scongelamento, è importante che tale modulo riporti, oltre ai dati anagrafici dei pazienti, anche le seguenti informazioni biologiche:

- parametri basali pre-congelamento (per liquido seminale);
- numero e disposizione su ogni supporto criogenico (per ovociti /embrioni);
- stadio maturativo (per ovociti) e stadio di sviluppo e morfologia embrionale, giorno di coltura/ore da inseminazione (per embrioni);
- protocollo di crioconservazione, terreno di crioconservazione e tipologia di supporto criogenico utilizzato;
- lotti dei materiali utilizzati.

Nel caso della movimentazione di embrioni è raccomandabile che venga richiesto dai pazienti, tramite il Centro Ricevente, il trasferimento di tutto il materiale biologico crioconservato senza lasciarne parziale quantità nel Centro Inviante.

Il Centro Ricevente valuta la conformità della documentazione ricevuta e conferma al Centro Inviante di accettare il trasporto del materiale crioconservato (*allegato Accettazione Materiale Crioconservato*).

Il Centro Inviante definisce le modalità di organizzazione del trasporto e le relative tempistiche, che vengono concordate con il Centro Ricevente. Il Centro Inviante si adopera, dunque, per organizzare il trasporto del materiale crioconservato e individua la persona o la ditta incaricata del trasporto, cioè colui che sarà responsabile del materiale durante la movimentazione (**Trasportatore**). In caso di disponibilità, è possibile che sia il Centro Ricevente a prendersi carico dell'organizzazione del trasporto. Nonostante sia consentito affidare il trasporto agli stessi pazienti, è sempre raccomandabile utilizzare un **corriere qualificato** per garantire il mantenimento delle condizioni di qualità e sicurezza del materiale crioconservato durante la movimentazione.

Preparazione del criocontenitore e rilascio del materiale crioconservato

Prima del trasferimento, il personale incaricato dal Responsabile del Centro Inviante controlla **l'integrità del contenitore da trasporto e la conformità del livello di riempimento di azoto** (in caso di contenitore Dryshipper è opportuno effettuare un controllo del peso del contenitore).

La verifica effettuata va riportata sulla **documentazione di trasporto** che riporta tutte le informazioni necessarie a garantire il mantenimento della tracciabilità del trasporto (Centro Inviante, Centro Ricevente, tipo e quantità di materiali da movimentare, relativi codici identificativi, nome e cognome del trasportatore, data e ora di partenza, firma di presa in carico).

Nel caso in cui il trasporto non avvenga tramite corriere qualificato, è necessario predisporre **un'informativa per il Trasportatore** (*allegato Informativa per il Trasporto*) in cui siano riportate le indicazioni da seguire per garantire un trasporto in sicurezza, specificando quali condizioni devono essere mantenute per preservare la vitalità dei gameti ed embrioni e le generali precauzioni da prendere per la sicurezza dell'operatore durante il trasporto di sostanze pericolose, come l'azoto liquido. Questa informativa viene spiegata e consegnata al Trasportatore dal personale incaricato della preparazione e del rilascio del materiale crioconservato.

3. Caratteristiche del criocontenitore da trasporto

I contenitori predisposti ai trasporti di gameti ed embrioni possono essere di diverse tipologie, a seconda che contengano azoto liquido o vapori di azoto. La scelta della tipologia del dewar da adottare durante il trasporto dipende da diversi fattori: autonomia di mantenimento delle condizioni di temperatura all'interno del dewar, durata dello spostamento e tipologia del mezzo di trasporto utilizzato. I "Dry shipper" sono contenitori che non contengono azoto liquido, ma un materiale spugnoso assorbente che rilascia all'interno vapori di azoto; questa tipologia di contenitore è richiesta per i trasporti aerei in quanto non è subordinato ad alcun vincolo previsto per i trasporti pericolosi.

I contenitori con azoto liquido sono invece contenitori utilizzati per il trasporto via terra e non possono essere trasportati via aerea in quanto la presenza di azoto liquido all'interno rende il trasporto "pericoloso". Questa tipologia di contenitori può essere trasportata solo all'interno di un altro contenitore che viene "piombato".

Il criocontenitore da trasporto si compone di tre componenti (figura 1):

- (a) contenitore primario: dispositivo che contiene il materiale biologico
- (b) contenitore secondario: contenitore da trasporto
- (c) contenitore terziario rigido: contenitore esterno

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 contenitore secondario. Quest'ultimo deve essere chiuso con una fascia dall'operatore responsabile dell'invio ed inserito nel contenitore terziario dotato di una imbottitura appropriata.

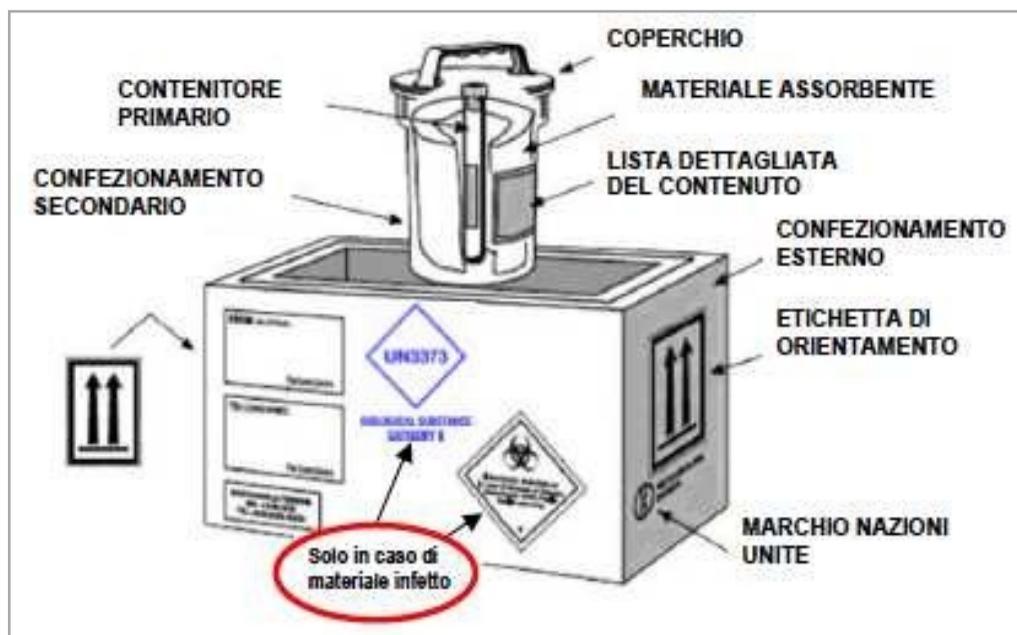


Figura 1. Struttura del contenitore da trasporto

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*

Il trasporto deve avvenire in modo che siano assicurate sia l'integrità del contenitore, sia il mantenimento di una temperatura adeguata fino al ricevimento. È sempre consigliabile che i contenitori da trasporto siano dotati di sonde per la temperatura collegate a datalogger che consentano un monitoraggio continuo delle condizioni di trasporto.

4. Etichetta del contenitore da trasporto

Le informazioni necessarie per la tracciabilità del trasporto devono essere riportate anche sul contenitore usato per il trasporto, oltre che nella documentazione condivisa con il Centro Ricevente. L'etichetta (*allegato etichetta di trasporto*) da apporre al contenitore deve recare le seguenti indicazioni:

- a) le diciture "CELLULE" UN3 373 e "MANIPOLARE CON CAUTELA";
- b) l'identificazione del Centro Inviante (indirizzo, numero di telefono e persona di riferimento);
- c) l'identificazione del Centro Ricevente (indirizzo, numero di telefono e persona da contattare in caso di problemi);
- d) la data e l'ora di inizio del trasporto;
- e) la descrizione delle condizioni di trasporto con riguardo alla qualità e alla sicurezza e delle cellule;
- f) la dicitura "NON IRRADIARE";
- g) ove un prodotto risulti positivo a un marcatore di una malattia infettiva, la dicitura "RISCHIO BIOLOGICO".

5. Ricevimento del materiale crioconservato

Al momento del ricevimento del contenitore, il personale incaricato dell'accettazione da parte del Responsabile del Centro Ricevente trascrive la data e l'ora della consegna ed effettua una verifica delle condizioni di trasporto, dell'imballaggio, dell'etichettatura e della presenza della necessaria documentazione di accompagnamento. Per dare evidenza della verifica effettuata, le annotazioni di controllo vengono riportate nell'apposito modulo (*Allegato scheda trasferimento materiale biologico, sessione 6*).

La ricezione del materiale crioconservato deve essere confermata inviando questa sezione del modulo di trasferimento, firmata dal Responsabile del Centro o suo delegato, al Centro Inviante. In questo modo si conclude la

procedura di trasporto e i Centri procedono ad archiviare la rispettiva documentazione.

Il Centro Ricevente può rifiutare di accettare il materiale biologico al momento dell'arrivo (o accettarlo con riserva) qualora venisse rilevata una non conformità, per es. documentazione non fosse completa o campioni non correttamente e/o chiaramente identificati (es: non identificati i singoli dispositivi oppure identificati solamente tramite un codice a barre). In questi casi, il referente dell'accettazione contatta il Centro di provenienza e sarà possibile accettare il materiale solo se le informazioni mancanti saranno integrate. Nel caso in cui vengano rilevati dei problemi di natura tecnica che possano incidere sulla qualità dei materiali, come nel caso di materiale biologico non mantenuto a temperatura criogenica e giunto a destinazione scongelato per cause varie (es. durata del trasporto più lunga della dichiarata capacità di tenuta del contenitore criobiologico, caduta accidentale del contenitore, temperatura ambientale eccessiva durante il trasporto, etc.), il Centro Ricevente contatta il Centro di provenienza e informa i pazienti che il materiale potrebbe essere stato danneggiato a causa di una non idonea condizione di trasporto. In questo caso, è inoltre necessario aprire una non conformità e riportarla su apposito registro **(Non Conformità Interna)**; in caso di evento avverso grave, la non conformità deve essere notificata all'autorità competente, con le modalità e le tempistiche indicate nelle direttive di riferimento.

In caso di materiali non conformi o con risultati delle analisi incompleti, il Centro deve predisporre procedure adeguate per una gestione della crioconservazione separata dei gameti/embrioni, che devono essere tenuti in quarantena fino a quando la non conformità sarà risolta e sarà dichiarata l'idoneità all'impiego clinico.

Referenze

1. Accordo relativo al trasporto internazionale su strada delle merci pericolose (ADR 2021)
2. Circolare Ministeriale 03/2003: modalità di trasporto di prodotti biologici (confezionamento con triplo involucri)
3. Decreto Legislativo 6 Novembre 2007, n. 191 "Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
4. Decreto legislativo n. 81, 9 aprile 2008 (gazzetta ufficiale n. 101 del 30.04.08, supplemento ordinario n. 108)
5. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 "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 distribuzione di tessuti e cellule umani"
6. Decreto Legislativo 27 gennaio 2010, n. 35. Attuazione della direttiva 2008/68/CE, relativa al trasporto internazionale di merci pericolose.
7. Decreto 10 ottobre 2012 - Modalità per l'esportazione o l'importazione di tessuti, cellule e cellule riproduttive umani destinati ad applicazioni sull'uomo.
8. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare EDQM 5th Edition 2022 "Guida alla qualità e sicurezza di tessuti e cellule per l'applicazione umana"
9. Legge n. 40/2004 "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita". Gazzette Ufficiale n. 45 del 24 febbraio 2004
10. W.H.O. Guidance on regulation for the Transport of infectious Substances 2007-2008

Capitolo 7.

La gestione di gameti da donazione eterologa

1. Introduzione

Le tecniche di Procreazione Medicalmente Assisita (PMA) con donazione di gameti prevedono l'utilizzo di ovociti o spermatozoi (o entrambi) da parte di un donatore/donatrice esterno alla coppia.

La possibilità di utilizzare gameti esterni alla coppia (PMA eterologa) è stata prevista dalla sentenza della Corte Costituzionale n.162 del 2014 che ha consentito l'accesso ai trattamenti con donazione di gameti anche alle coppie per le quali **sia stata accertata e certificata una patologia che sia causa irreversibile di sterilità o infertilità irreversibile**. Per poter accedere alle tecniche di PMA eterologa è necessario, dunque, che il Medico Responsabile del trattamento indichi chiaramente l'indicazione clinica per la quale consiglia il trattamento.

Per il reperimento di gameti, il Centro di PMA può fare ricorso a donatori e donatrici nazionali o, in caso di non disponibilità, a gameti importati da Banche e/o da Centri esteri.

2. Donazioni nazionali

In accordo con la legislazione italiana, la donazione di gameti è un atto anonimo, volontario e gratuito.

Attualmente non esistono in Italia banche specificatamente indicate per raccogliere in modo centralizzato i gameti donati; ogni Centro, se ne ha la possibilità, può accogliere un donatore o una donatrice e valutarne l'idoneità alla donazione, secondo i criteri e i requisiti previsti all'Allegato III del D. lgs. 16/2010. In caso di donazioni effettuate in Italia, è responsabilità del Centro/Banca definire le procedure operative per la selezione del donatore/donatrice, nel rispetto delle indicazioni fornite dalle normative vigenti.

Criteri generali di selezione dei donatori (direttive italiane)

La selezione dei donatori di gameti esterni alle coppie è un processo

cruciale per garantire la sicurezza del ricevente e della progenie. In caso di donatori nazionali, è necessario seguire quanto previsto dalla normativa vigente, in particolare il D. Lgs. 16/2010 ed eventuali normative regionali di riferimento.

Esami di laboratorio:

Concordemente all'allegato II, punto 1.1 del Dlgs 16/2010, il donatore di gameti viene sottoposto a specifici test di laboratorio, compreso lo screening per malattie infettive, utilizzando metodiche appropriate e al fine di determinare l'ammissibilità dei donatori/donatrici. Le tempistiche entro le quali effettuare gli esami di laboratorio sono descritte negli Allegati II e III del D.Lgs. 16/2010 e successive modifiche come riportate nel DPR 23 agosto 2019, n. 131. I risultati negativi devono essere documentati prima dell'utilizzo dei gameti donati.

Dati relativi ai donatori/donatrici:

Il Centro PMA deve fornirsi di un archivio dedicato (cartaceo e/o elettronico) dove conservare le cartelle cliniche dei donatori e accessibile solo da personale sanitario autorizzato.

Come per tutti i documenti relativi ai pazienti di PMA, i record relativi a ciascun donatore (di screening e i risultati dei test) devono essere mantenuti per almeno 30 anni.

I dati sui donatori (e sulle relative donazioni di gameti effettuate in Italia) devono essere comunicati al Registro Nazionale dei donatori di cellule riproduttive (RND-PMA), secondo le indicazioni fornite dal Centro Nazionale Trapianti (CNT). Allo stesso Registro vanno comunicati anche gli esiti relativi all'utilizzo dei gameti donati, e le informazioni relative follow-up del trattamento (dati sul nascituro ed eventuali eventi e reazioni avverse gravi che dovessero manifestarsi).

Le cellule riproduttive di un medesimo donatore non potranno determinare più di dieci nascite secondo la normativa italiana. È, quindi, compito del Centro di PMA registrare le gravidanze ottenute con gameti del donatore in modo che non superino il numero consentito. Tale limite può essere derogato esclusivamente nei casi in cui una coppia, che abbia già avuto un figlio tramite Procreazione Medicalmente Assistita di tipo eterologo, intenda sottoporsi nuovamente a tale pratica

utilizzando le cellule riproduttive della medesima donatrice/donatore. La donazione è anonima e non deve essere possibile per la coppia ricevente risalire al donatore/donatrice e viceversa. I dati dei donatori potranno essere resi noti al personale sanitario solo in casi straordinari, dietro specifica richiesta e con procedure istituzionalizzate, per eventuali problemi clinici della prole. L'accessibilità a tali dati viene gestita con il controllo di tracciabilità. I donatori/donatrici non hanno diritto di conoscere l'identità del soggetto nato per mezzo di queste tecniche e il nato non potrà conoscere l'identità del donatore/donatrice.

La distribuzione di gameti donati può essere autorizzata solo dopo una dichiarazione di idoneità del donatore, opportunamente compilata e firmata dal medico responsabile della selezione del donatore. Tale dichiarazione di idoneità deve accompagnare i gameti donati (o gli embrioni derivanti da donazione) ed essere conservata assieme a tutti gli altri report relativi al donatore. Tra i report del fascicolo del donatore è particolarmente importante che ci sia la dichiarazione del medico responsabile della selezione, che accerti l'avvenuta acquisizione da parte della banca del consenso alla donazione. In caso di distribuzione dei gameti, la copia degli esami effettuati per la selezione del donatore deve essere trasmessa al Centro ricevente; in alternativa, un report che attesti le date di effettuazione degli esami clinici richiesti, con relativo risultato, certificato e firmato dal medico responsabile del reclutamento è sufficiente ad attestare la validità degli esami del donatore.

Egg/sperm sharing

Per il reperimento di gameti possono essere altresì utilizzati gameti maschili e femminili residui a procedimenti di PMA o a trattamenti di preservazione della fertilità pregressi; l'utilizzo di tali gameti richiede l'accertamento della esistenza di specifici requisiti clinici e psicologici dei pazienti, oltre che l'ottenimento da parte degli stessi di una espressa autorizzazione alla donazione.

In caso di indisponibilità di alcune indagini (genetiche, psicologiche, infettivologiche) necessarie per valutare l'idoneità dei pazienti alla donazione, sarà possibile effettuare i test richiesti dalla normativa vigente anche in un momento successivo alla crioconservazione dei gameti da donare, ma l'iter di donazione potrà avere seguito solo se il risultato delle indagini permetterà di assicurare gli standard di sicurezza e qualità previsti dalla normativa.

3. Importazioni di gameti ed embrioni da Banca estera

In caso di non disponibilità di gameti donati in Italia, è possibile erogare le prestazioni di PMA con donazione anche attraverso l'importazione di gameti da una banca situata nell'ambito dell'Unione Europea o extra-Europea, che seleziona i donatori e distribuisce al Centro ricevente la donazione specificamente per le coppie riceventi.

Al momento della stesura di questo manuale, questa è la modalità più rappresentata in Italia ed ha quasi del tutto sostituito le pratiche di egg-sharing e sperm-sharing.

Le modalità per importare gameti sono quelle indicate nel DM 10.10.2012 e smi, capo II. In primis, va verificato che entrambi i Centri (inviante e ricevente) siano stati verificati per la **conformità ai requisiti di qualità e sicurezza delle Direttive Europee (DE)**, attestato dalla presenza dei Centri nel compendio europeo degli istituti dei tessuti e che siano autorizzati per le attività da svolgere e i prodotti da trattare (<https://webgate.ec.europa.eu/eucoding/reports/telindex.xhtml>).

Pur non essendo obbligatorio, è raccomandato che il Centro ricevente stipuli **un accordo di collaborazione** con le banche estere fornitrici di cellule riproduttive, per garantire una gestione efficace e sicura del processo di import-export di gameti.

La stipula di accordi di collaborazione contribuisce a garantire la tutela della salute e della sicurezza sia del donatore che del ricevente, nonché l'integrità del processo di donazione e utilizzo dei gameti, tutelando gli interessi e la sicurezza sia dei centri coinvolti che delle coppie, riducendo anche i rischi associati a malattie infettive o genetiche.

Di seguito sono elencati gli elementi chiave che dovrebbero essere inclusi in tali contratti:

Autorizzazioni: L'accordo deve prevedere che il Centro esportatore fornisca la documentazione comprovante che possiede tutte le autorizzazioni necessarie per operare come banca di cellule riproduttive (con esplicito riferimento al Codice europeo TE) e che rispetta gli standard di qualità e sicurezza stabiliti dalle normative di riferimento. È necessario verificare che entrambe le parti coinvolte abbiano le autorizzazioni ne-

cessarie per importare ed esportare cellule riproduttive, conformemente alle leggi e ai regolamenti vigenti nel paese di origine e di destinazione.

Responsabilità delle parti: Devono essere chiarite le responsabilità e gli obblighi di ciascuna parte coinvolta nel processo. Questo include la responsabilità per il mantenimento della qualità e l'integrità dei campioni durante il trasporto, nonché l'obbligo di aderire alle normative di sicurezza riguardanti la donazione, in particolare nell'ottenimento del consenso.

Movimentazione delle cellule riproduttive: Devono essere definite le modalità di movimentazione dei campioni di gameti, inclusi i requisiti di confezionamento, le procedure di trasporto, la gestione delle temperature e le tempistiche di consegna. È importante specificare che saranno adottate le misure appropriate per preservare la qualità dei gameti durante il trasporto.

Procedure di selezione dei donatori e prelievo dei gameti: L'accordo deve prevedere che il Centro fornitore segua procedure rigorose per la selezione dei donatori, garantendo la conformità ai criteri di selezione e agli standard di qualità richiesti dalla normativa.

Procedure di crioconservazione dei gameti: Devono essere condivise le procedure relative alla crioconservazione dei gameti.

Identificazione e tracciabilità dei campioni: L'accordo deve specificare le procedure specifiche per l'identificazione univoca dei donatori, dei gameti o embrioni derivanti da donazione, come l'utilizzo di codici di tracciabilità o etichette.

In conclusione, la stipula di accordi di collaborazione con le banche estere fornitrici di cellule riproduttive rappresenta un elemento fondamentale per un'efficace gestione del processo di selezione dei gameti e di import-export, garantendo il rispetto delle normative e delle procedure necessarie per una donazione sicura ed eticamente corretta.

Per quanto riguarda l'importazione da **Centri situati in Paesi terzi (cioè Paesi extra UE)**, è contemplata la possibilità di effettuare importazioni

“una tantum”, senza accordo di collaborazione con uno specifico Istituto, ma le procedure di movimentazione e importazione devono garantire ugualmente i requisiti prescritti dalla normativa vigente.

È dunque necessario che il Centro che richiede i gameti si assicuri che il Centro inviante risponda ai requisiti di qualità e sicurezza previsti nelle DE, e, in caso di importazione non occasionale, ottenga il nulla osta ministeriale e stipuli un accordo di convenzione, così come previsto dal DM 15 novembre 2016. I campioni biologici potranno essere accettati solo se conformi alla normativa nazionale vigente.

Per questo motivo, qualora si dovesse procedere all’importazione o all’esportazione da/verso Paese terzo è necessario chiedere:

- copia dell’autorizzazione a Istituto dei Tessuti rilasciata dalla autorità competente dello stato di appartenenza;
- verifica che i criteri di selezione e di qualità e sicurezza applicati al donatore/donatrice siano equivalenti a quelli previsti dalla normativa europea
- procedura di tracciabilità;
- esiti degli esami eseguiti al momento della donazione.

Richiesta di gameti alla Banca estera

Certificata l’indicazione ad un trattamento con gameti esterni alla coppia, il medico Responsabile del trattamento compila il modulo (*allegato Raccolta Dati Coppia*) per la richiesta dei gameti alla Banca estera, specificando le seguenti informazioni relative ai Pazienti Riceventi:

- Codice alfanumerico identificativo dei pazienti (ID);
- Data della richiesta;
- Tipo di campione richiesto (ovociti/spermatozoi);
- Numero di paillettes/materiale richiesto;
- Caratteristiche fenotipiche della paziente, emogruppo e fattore Rh;
- Caratteristiche fenotipiche del partner, emogruppo e fattore Rh.

I dati vengono inviati alla Banca estera di Riferimento secondo le modalità concordate nell’accordo, tramite e-mail o nel portale dedicato.

La Banca estera seleziona il donatore in base alle caratteristiche presenti sul modulo di Richiesta e invierà la Proposta al Centro PMA. Non è possibile per i pazienti scegliere particolari caratteristiche fenotipiche del donatore, al fine di evitare illegittime selezioni eugenetiche.

Per ogni donatore/donatrice verranno indicati:

- Età (solo anno di nascita);
- Caratteristiche fenotipiche (etnia, colore degli occhi, colore della pelle, colore dei capelli e tipologia, tipo corporatura);
- Gruppo sanguigno e fattore Rh;
- Data donazione gameti;
- Copia degli esami eseguiti prima della donazione o report certificato con sintesi degli esami. È necessario che il Medico Responsabile del Centro Inviante o delegato attesti con firma sulla documentazione/esami del donatore/donatrice o sul Report Certificato l'esito degli esami eseguiti e la valutazione di idoneità clinica del donatore;
- Quantità di dispositivi crioconservati e dettagli del congelamento;
- Attestazione di idoneità dei gameti all'utilizzo clinico (firmata dal responsabile medico o biologo del Centro inviante).

Il Centro PMA Ricevente controlla tutta la documentazione ricevuta dalla Banca estera, comunica alla stessa l'accettazione della proposta e effettua la richiesta di movimentazione dei gameti in accordo a quanto riportato in procedura.

Distribuzione di embrioni derivanti da donazione con Export del liquido seminale crioconservato del partner alla Banca estera (UE), fecondazione in vitro con ovociti di donatrice a fresco e successiva movimentazione degli embrioni congelati al Centro PMA di riferimento.

Talvolta alcuni Centri preferiscono non acquisire gli ovociti congelati, ma inviare il seme del partner maschile per effettuare nel Centro estero la fecondazione con ovociti donati a fresco, per poi congelare e reimportare gli embrioni nel Centro italiano per eseguire il trasferimento.

Se il Centro italiano decide di organizzarsi secondo questa modalità, è necessario che il processo sia chiaramente descritto nell'accordo stipulato tra i

due Centri e che anche il consenso informato firmato dalla coppia nel Centro italiano, riporti in modo esplicito le modalità di gestione del processo. Inoltre, qualora si ricorresse a questa tipologia organizzativa per effettuare un trattamento di PMA con ovociti donati, è importante ricordare che la coppia è gestita dal Centro italiano e che il responsabile del Centro italiano è il medico responsabile del trattamento.

Le importazioni e esportazioni possono avvenire solo tra Centri (o Banche), autorizzati e certificati per la conformità alle normative italiane ed europee. Tutta la responsabilità della gestione delle attività di export/import e la relativa documentazione deve quindi essere gestita esclusivamente come rapporto tra Centri.

Come nel caso di acquisizione di gameti, viene inviata dal Centro italiano richiesta di selezione della donatrice alla Banca estera di riferimento, a fronte di indicazione al trattamento PMA con gameti eterologhi certificato dal medico che ha in carico la coppia nel Centro italiano e avvio al trattamento. Il consenso informato dovrà essere rilasciato al centro italiano. La richiesta deve includere la scheda della coppia per il matching Donatrice/Ricevente con indicazione del codice di riferimento della coppia ricevente.

La Banca estera propone la donatrice selezionata al Medico Responsabile del Centro ricevente, con relativa documentazione:

Scheda donatrice

- Età, e caratteristiche fenotipiche;
- Gruppo sanguigno e fattore Rh;
- N. e tipologia di ovociti proposti;
- Dichiarazione di donazioni inferiori a 6 per la donatrice selezionata (per un massimo di 10 nascite).

È responsabilità della Banca estera selezionare la donatrice secondo i requisiti di legge. Se la proposta di donatrice viene accettata, il centro ricevente controlla la presenza della modulistica necessaria e certificato di idoneità alla donazione firmato dal Medico Responsabile.

I due Centri concordano la data in cui è possibile procedere alla raccolta del liquido seminale e all'invio al Centro estero. Si procede, dunque, alla

raccolta e crioconservazione del liquido seminale del partner maschile dopo l'esecuzione degli esami infettivologici come da normativa vigente.

Il Centro di PMA invia alla Banca estera i dati relativi alla crioconservazione del Liquido seminale:

- Dettagli sul metodo di congelamento, crioprotettori utilizzati (ditta, lotto di produzione e data di scadenza), numero e tipologia di dispositivi utilizzati (ditta, lotto di produzione e data di scadenza);
- Esami infettivologici in base alla normativa vigente (anche in copia).

La Banca estera comunica la disponibilità a ricevere i gameti maschili, concorda la data di spedizione; i centri procedono alla movimentazione secondo quanto indicato nelle procedure operative (per l'organizzazione del trasporto fare riferimento alle regole generali nel capitolo 6 di questo manuale).

Nella documentazione del Centro italiano dovrà esserci evidenza dell'invio dei gameti del partner maschile al Centro estero.

Al termine del ciclo di fecondazione in vitro nella Banca estera, gli embrioni formati verranno crioconservati e sarà cura della Banca estera aggiornare e inviare il Report del ciclo terminato al Centro di PMA ricevente aggiungendo, alla scheda della donatrice, i dati relativi al ciclo:

- Data prelievo ovocitario/ donazione;
- Data ed esito degli esami richiesti dalle normative per la donazione;
- Indicazioni sul materiale crioconservato (tipologia di materiale, quantità, stadio di sviluppo);
- Dettagli sul metodo di congelamento, crioprotettori utilizzati (ditta, lotto di produzione e data di scadenza), numero e tipologia di dispositivi utilizzati (ditta, lotto di produzione e data di scadenza);
- Se necessario, indicazioni utili per il successivo scongelamento.

I due Centri concorderanno quindi una data per la spedizione e le modalità di invio degli embrioni formati.

Trattamenti di PMA con doppia donazione di gameti

Il ricorso alla donazione di gameti è possibile anche per entrambi i membri

di una coppia con comprovata situazione medica o iatrogena di sterilità certificata dal medico del Centro su apposito certificato di accesso alle tecniche. Quindi può essere acconsentita sia in forma di singola donazione, che doppia donazione (liquido seminale e ovociti) nello stesso ciclo di trattamento, avvalendosi di una tracciabilità completa per quanto riguarda l'approvvigionamento e il trattamento futuro.

La richiesta di gameti alla Banca estera, per lo stesso ciclo di trattamento, dovrà avvenire contestualmente.

Potrà essere impostato il ciclo di trattamento con 2 tipi di strategie:

→ ***Richiesta di gameti alla Banca estera, secondo le modalità precedentemente descritte, fecondazione in vitro con ovociti di donatrice a fresco e liquido seminale di donatore presso la Banca estera, successiva movimentazione degli embrioni congelati al centro PMA di riferimento***

- Invio, da parte della Banca estera, della proposta dei donatori al medico del Centro PMA di riferimento;
- Accettazione, o richiesta di modifica dei donatori, da parte del Centro PMA di riferimento;
- Conferma da parte della Banca estera a procedere con la fecondazione in vitro utilizzando i gameti dei donatori selezionati;
- Invio Report del ciclo di trattamento da parte della Banca estera al Centro di PMA di riferimento;
- Successiva movimentazione degli embrioni crioconservati al Centro PMA di riferimento tramite procedura regolarizzata.

→ ***Richiesta di gameti di donatori alla Banca estera, secondo le modalità precedentemente descritte, Import / Acquisizione/ movimentazione di gameti donati crioconservati da Banca estera (UE) per utilizzo diretto nel Centro di PMA di riferimento***

- Invio, da parte della Banca estera, della proposta dei donatori al medico del Centro PMA di riferimento;
- Accettazione, o richiesta di modifica dei donatori, da parte del Centro PMA di riferimento;

- Conferma della Banca estera a procedere con la movimentazione del materiale biologico crioconservato;
- Movimentazione dei gameti crioconservati al Centro PMA di riferimento, tramite procedura standard, per successivo utilizzo/ciclo di trattamento di doppia donazione.

I centri di PMA sono responsabili del controllo di qualità e della tracciabilità di gameti ed embrioni, per tale ragione devono garantire che il materiale biologico crioconservato venga identificato in modo univoco, etichettato e registrato in modo accurato in tutti i documenti relativi alla procedura.

Nello specifico, il Centro importatore garantisce la tracciabilità dei campioni biologici in ogni fase del percorso della movimentazione, in conformità a quanto previsto dall'articolo 8 del decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 191, e dall'articolo 14 del decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16, assicurandone la conformità alle norme di qualità e sicurezza previste dalle normative vigenti, europee e nazionali, e dalle linee guida specifiche del settore.

4. Modalità di importazione ed esportazione

Il Centro Importatore e il Centro Esportatore effettuano le opportune verifiche prima di iniziare la movimentazione:

il Centro Importatore:

- a) verifica la provenienza dei gameti e degli embrioni e, in particolare, che il materiale provenga da una Banca estera autorizzata e certificata dalla rispettiva autorità competente nazionale;
- b) verifica la presenza di documentazione e dati relativi al donatore, comprensivi dell'attestazione firmata dell'idoneità del donatore e dell'acquisizione del relativo consenso alla donazione, rilasciato ai sensi dell'articolo 13 del decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 191; la presenza della documentazione e dei dati relativi ai gameti e agli embrioni, inclusi i rispettivi codici identificativi, in conformità a quanto previsto dai decreti legislativi 6 novembre 2007, n. 191 e 25 gennaio 2010, n. 16;

- c) verifica la presenza della documentazione del Centro estero comprovante la provenienza e la conformità dei gameti e degli embrioni ai requisiti di qualità e sicurezza previsti dalla normativa europea;
- d) in caso di utilizzo di vettore aereo, comunica i dati relativi all'importazione o all'esportazione, in tempo utile, all'USMAF territorialmente competente ai fini del rilascio del nulla osta.

Il Centro Esportatore:

- a) verifica che i gameti e gli embrioni siano destinati ad uno specifico Centro estero per una specifica coppia ricevente;
- b) fornisce al Centro utilizzatore la documentazione di accompagnamento del materiale crioconservato, prevista dalla normativa vigente, attestante l'idoneità del donatore e del tessuto o delle cellule inviati garantendo il mantenimento della tracciabilità; predispone la documentazione recante i dati relativi ai gameti e agli embrioni, inclusi i rispettivi codici identificativi, in conformità a quanto richiesto dalle medesime direttive europee.

Ai fini della tracciabilità, la banca che riceve il materiale biologico crioconservato mantiene l'etichetta originale dei tessuti importati e applica la propria in aggiunta, senza cancellare quella originale.

La relativa documentazione dovrà essere conservata, secondo quanto specificato dalla normativa vigente e dalle Linee guida di settore fornite dal CNT.

Una volta effettuata un'importazione o esportazione, il Centro italiano caricherà entro 48 ore nel portale IEGE la comunicazione dell'avvenuta movimentazione al CNT e al Registro ISS (<https://www.registronazionalepma.it/CentroNazionaleTrapianti/IEGE>)

Ricezione e controllo dei gameti/embrioni nel Centro ricevente (documentazione e aspetti clinici).

Le procedure di accettazione del materiale biologico crioconservato possono essere effettuate soltanto dal Responsabile del Laboratorio di Embriologia o

da altro personale del laboratorio stesso da lui autorizzato. Il personale autorizzato deve effettuare una verifica all'arrivo del materiale inviato riguardante le condizioni di trasporto, imballaggio, etichettatura dei campioni, documentandone la conformità secondo quanto previsto in procedura. L'importazione del materiale biologico va annotata nei propri registri. Per concludere la movimentazione dovrà essere compilato e inviato, al Centro Esportatore, un documento che confermi la ricezione del materiale biologico trasportato (*allegato Accettazione gameti eterologa*).

Riassegnazione dei gameti già assegnati e parzialmente utilizzati (o non utilizzati) dalla coppia ricevente.

È possibile che i gameti selezionati ed inviati per una specifica coppia non vengano utilizzati o che ne venga utilizzata soltanto una parte e ne restino alcuni.

Un ciclo di trattamento interrotto, dopo l'acquisizione dei gameti da parte del Centro PMA, implica necessariamente una riassegnazione delle cellule già importate dal Centro PMA. In questo caso, il Centro PMA dovrà contattare la Banca estera (Centro Inviante) che si occuperà della riassegnazione delle cellule ad un'altra coppia inserita nel programma di ovodonazione del Centro PMA. La Banca comunicherà la modifica del nuovo codice coppia assegnato alla donatrice/donatore e invierà la documentazione aggiornata al Centro Ricevente. In caso di assenza di coppie riceventi compatibili, le cellule non utilizzate saranno rinviate alla Banca estera.

Il Centro Ricevente deve avere una procedura operativa per la gestione della documentazione delle cellule riassegnate in modo da avere tracciabilità del percorso dei gameti dal Centro di provenienza al destino finale con le opportune modifiche.

La stessa procedura dovrà essere applicata in caso di utilizzo parziale delle cellule importate per riassegnazione.

Documento di tracciabilità dei gameti (con codifica SEC o altra codifica se extra-UE).

È necessario predisporre un documento nel proprio sistema di Gestione Qualità per registrare l'arrivo presso il proprio Istituto dei gameti donati (o

degli embrioni derivanti da donazione), da allegare alla cartella biologica della coppia ricevente. Deve inoltre essere registrato ogni scongelamento ed utilizzo del materiale biologico e, in particolare, il numero di gameti o embrioni rimasti a disposizione della coppia ricevente dopo ogni scongelamento. Inoltre, è necessario predisporre una procedura operativa standard che stabilisca precisamente come avviene il processo di registrazione dell'avvenuta ricezione del materiale documentale e le fasi di scongelamento e utilizzo per la coppia ricevente.

Single European Code (SEC): istruzioni e gestione

Il Codice Unico Europeo (SEC) è un codice alfanumerico standard a lunghezza fissa comprendente informazioni relative alla donazione (Sequenza di identificazione della donazione) e il prodotto tissutale o cellulare (sequenza di identificazione del prodotto). Il SEC è utilizzato per la distribuzione dei tessuti e dei gameti nel territorio dell'Unione Europea e riguarda unicamente le donazioni e le attività connesse ed è rivolto a garantire la tracciabilità e rintracciabilità della donazione, a risalire all'Istituto dei tessuti che ha originato la donazione (non è quindi obbligatorio il suo uso per i gameti autologhi o per gli embrioni all'interno della coppia, anche se movimentati al di fuori del Centro).

Il formato della SEC è stato stabilito nella normativa. La struttura è composta da due elementi, il primo contenente informazioni specifiche sulla donazione (SEC DI un codice dell'istituto dei tessuti, composto del codice ISO del paese e un codice identificativo dell'istituto dei tessuti, e un numero univoco di donazione) e il secondo contenente informazioni specifiche del prodotto (SEC PI sistema di codifica, prodotto codice, numero split e data di scadenza).

Di seguito viene riportato un esempio della struttura del codice SEC

Donation Identification Sequence (SEC DI)

TE Code		
ISO Country Code	TE number	Unique Donation Number
2 characters (alphabetic)	6 characters (alpha/numeric)	13 characters (alpha/numeric)

Product Identification Sequence (SEC PI)

Product Coding System Identifier	Product Number	Split Number	Expiry Date
1 character (alphabetic)	7 characters (alpha/numeric)	3 characters (alpha/numeric)	8 characters (numeric, YYYYMMDD)

L'utilizzo di questo codice favorisce la tracciabilità univoca dell'origine del materiale biologico donato, e quindi, la sua rintracciabilità.

La piattaforma della Commissione europea per la ricerca e la tracciabilità del materiale biologico donato è conosciuta come Reference Compendia for the Application of a Single European Coding System for Tissues and Cells <https://webgate.ec.europa.eu/eucoding/>, dove sono inseriti tutti gli istituti dei tessuti europei che rispondono ai requisiti di qualità e sicurezza previsti dalle Direttive.

In questa sessione è possibile inserire il codice SEC per rintracciare l'origine e le movimentazioni che ha subito nell'ambito degli Stati membri (<https://webgate.ec.europa.eu/eucoding/lookup/compendium/secdipi.xhtml>).

Il SEC dovrebbe essere applicato al più tardi al momento della distribuzione per utilizzo dei gameti/embrioni, per i prodotti di tipo eterologo (donati). Il SEC va generato, quindi, al momento della distribuzione dei gameti donati **(o dell'embrione derivante dalla donazione di gameti)**.

Questo avviene quando i gameti donati vengono spediti dal Centro inviante nel quale è stata effettuata la donazione, presso il Centro ricevente dove saranno utilizzati per la tecnica di PMA.

È importante sottolineare che il codice SEC deve essere attribuito una volta sola, e non deve essere cambiato nel corso dei trasporti che i gameti donati possono subire in diversi passaggi da un Centro all'altro. È necessario che il Centro del paese estero attribuisca il codice SEC ogni qualvolta i gameti o gli embrioni derivanti da donazione saranno distribuiti in Italia. Qualora nel paese di origine ci fossero modalità di codificazione differenti dal codice SEC, la problematica andrebbe segnalata alla propria autorità competente.

5. Tracciabilità e vigilanza

Qualsiasi evento o reazione avversa sul donatore/donatrice o sul nato deve essere segnalato alle autorità competenti, comprese eventuali malattie geneticamente trasmissibili identificate alla nascita. Nel caso in cui una malattia ereditaria precedentemente non identificata si diagnostichi in un bambino nato da donazione, il donatore e il ricevente devono essere testati e deve essere avviata un'indagine volta ad accertare lo stato di salute del donatore/donatrice, e a bloccare eventuali altri lotti di gameti donati.

Referenze

1. Attuazione della direttiva 2015/566/UE della Commissione dell'8 aprile 2015, che attua la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le procedure volte a verificare il rispetto delle norme di qualità e di sicurezza equivalenti dei tessuti e delle cellule importati.
2. Conferenza Stato-Regioni del 15 marzo 2012
3. D.A. 2277/2014 – “Recepimento degli indirizzi operativi per le Regioni e le Province autonome, concordati ed approvati dalla Conferenza delle Regioni e delle Province autonome in data 4 settembre 2014, di cui al “Documento sulle problematiche relative alla fecondazione eterologa a seguito della sentenza della Corte Costituzionale n.162/2014”
4. Decreto 10 ottobre 2012-Modalita' per l'esportazione o l'importazione di tessuti, cellule e cellule riproduttive umani destinati ad applicazioni sull'uomo.
5. Decreto 16 dicembre 2004, GURI 42 del 21 febbraio 2005
6. Decreto 4 agosto 2004, numero 200 GURI 26 agosto 2004
7. Decreto del Presidente della Repubblica 23 agosto 2019, n. 131 Regolamento di attuazione della direttiva 2012/39/UE della commissione, del 26 novembre 2012, che modifica la direttiva 2006/17/CE per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche relative agli esami effettuati su tessuti e cellule umani.
8. Decreto Legislativo 191 del 6 novembre 2007 – Norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule Umani
9. Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 “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 distribuzione di tessuti e cellule umani”
10. Documento della Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome del 04/09/2014
11. Legge 40/2004 – Norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita
12. Linee Guida Ministero della Salute del 11.04.2008
13. Nota Tecnica CNT del 24/04/2017
14. Sentenza Corte Costituzionale n. 151 GURI 19 del 13 maggio 2009
15. Sentenza Corte Costituzionale n.162 GURI del 18 giugno 2014

Allegati

	TRAINING OPERATORE DI LABORATORIO	
--	--	--

TRAINING OPERATORE LABORATORIO _____

ANNO _____

TRAINING

OPERATORE LABORATORIO

Da compilarsi a completamento del programma di training

Training revisionato da: _____

Qualifica: _____

Firma: _____

Data: _____

	TRAINING OPERATORE DI LABORATORIO	
--	--	--

Valutazione e recupero spermatozoi da biopsia testicolare ed aspirazione epididimale

Indicatore di valutazione: Effettuare almeno 3 procedure con supervisione di un Biologo Senior.

Data	ID paziente	Sigla Supervisore

IDONEO SI NO

Firma Supervisore _____

Trattamento e crioconservazione della corticale ovarica

Indicatore di valutazione: Effettuare almeno 3 procedure con supervisione di un Biologo Senior.

Data	ID paziente	Sigla Supervisore

IDONEO SI NO

Firma Supervisore _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	--------------------------------------	--

LOG BOOK OPERATORE LABORATORIO _____

ANNO _____

LOG BOOK

OPERATORE LABORATORIO

Da compilarsi a completamento del logbook

Training revisionato da: _____

Qualifica: _____

Firma: _____

Data: _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	-------------------------------	--

Esame e Trattamento del Liquido Seminale

Indicatore di valutazione: 5 procedure con conferma secondo operatore. (Min 20/anno)

Data	ID paziente	Secondo Operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

Oocyte Pick Up (OPU)

Indicatore di valutazione: 5 procedure con supervisione di un secondo operatore recuperando tutti gli ovociti. (Min 30 paz/anno)

Data	ID coppia	Ovociti residui	Secondo operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	-------------------------------	--

Decumulazione							
Indicatore di valutazione: 10 procedure con Max 5min/4 ovociti. Lisi ovociti < 2,5% con controllo secondo operatore. (Min 30 paz/anno)							
Data	ID paziente	Tempo / Lisi	Secondo operatore	Data	ID paziente	Tempo / Lisi	Secondo operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

ICSI									
Indicatore di valutazione: 10 procedure con fecondazione ≥ 70%; Lisi < 2,5 %; Max 2 min/ovo con controllo secondo operatore. (Min 30 pazienti/anno)									
Data	ID paziente	Tempo/lisi	Fert	Secondo operatore	Data	ID paziente	Tempo/lisi	Fert	Secondo operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	-------------------------------	--

Embryo Transfer (ET)							
Indicatore di valutazione: 10 procedure con max 1 min tempo di caricamento del catetere e ≤ 30 µl volume caricato con controllo secondo operatore. (Min 30/anno)							
Data	ID paziente	Tempo/ Volume	Secondo operatore	Data	ID paziente	Tempo/ Volume	Secondo operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

Vitrificazione (ovociti/embrioni)			
Indicatore di valutazione: 5 procedure con tempo di caricamento su supporto e plug in azoto liquido ≤ 1 min con controllo secondo operatore. (Min 20 pazienti/anno)			
Data	ID paziente	Tempo	Secondo Operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	-------------------------------	--

Scongelamento (ovociti/embrioni)			
Indicatore di valutazione: 5 procedure con tempo di ritrovamento di ovociti/embrioni \leq 1min con controllo secondo operatore (Min 20 procedure/anno)			
Data	ID paziente	Tempo	Secondo Operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

Congelamento e Scongelamento liquido seminale		
Indicatore di valutazione: 2 procedure con conferma secondo operatore. (Min 10/anno)		
Data Cong/Scong	ID paziente	Secondo operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	-------------------------------	--

Biopsia del Trofoectoderma di blastocisti

Indicatore di valutazione: 5 procedure con degenerazione embrionaria 0% e tempo di biopsia per embrione ≤ 5 min con controllo secondo operatore. (Min 10 pazienti/anno)

Data	ID paziente	% Deg/Tempo	Secondo Operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

Valutazione e recupero spermatozoi da biopsia testicolare ed aspirazione epididimale

Indicatore di valutazione: 3 procedure con conferma secondo operatore. (Min 6 pazienti/anno)

Data	ID paziente	Secondo Operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____ Firma operatore _____ Firma Supervisore _____

	MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE	
--	-------------------------------	--

Trattamento e crioconservazione della corticale ovarica		
Indicatore di valutazione: 3 procedure con conferma secondo operatore. (Min 5 pazienti/anno)		
Data	ID paziente	Secondo Operatore

IDONEO SI NO

Totale anno _____

Firma operatore _____

Firma Supervisore _____

	MONITORAGGIO DEGLI INDICATORI DI PERFORMANCE (KPIs)	
--	--	--

CENTRO:
MESE:

Laboratorio PMA					
Key Performance Indicator (KPI)		Popolazione di riferimento	Valore registrato	Valore di competenza	Valore di Benchmark
Normale fecondazione ICSI (%)	n° ovociti 2PN e 2PB/ n° ovociti MII iniettati	Tutti i pazienti (eccetto per IVM, SMF AOA, e ovociti scongelati)		≥65%	≥80%
Sviluppo embrionale in day 3* (%)	n° embrioni ≥ 8-cell in day3/ n° ovociti 2PN e 2PB	Tutti i pazienti		≥45%	≥70%
Sviluppo a blastocisti (%)	n° blastocisti ottenute/ n° ovociti 2PN e 2PB	Pazienti ≤ 34-39 anni di età		≥45%	≥65%
		Pazienti ≥ 40 anni di età		≥35%	≥55%
Gravidanza clinica (%)	n° gravidanze (diagnosticate mediante visualizzazione ecografica di uno o più sacchi gestazionali con battito cardiaco fetale o segni clinici definitivi di gravidanza)/ n° di primi trasferimenti di embrioni	Pazienti ≤ 34 anni di età		≥30%	≥40%
		Pazienti 35-39 anni di età		≥20%	≥30%
		Pazienti ≥ 40 anni di età		≥10%	≥20%
		Tutti i pazienti PGT-A		≥45%	≥60%

	MONITORAGGIO DEGLI INDICATORI DI PERFORMANCE (KPIs)	
--	--	--

Laboratorio PMA					
Performance Indicator (PI)		Popolazione di riferimento	Valore registrato	Valore di competenza	Valore di Benchmark
Normale fecondazione FIV convenzionale (%)	n° ovociti 2PN e 2PB/ n° complessi cumulo ooforo ovocita inseminati	Tutti i pazienti (eccetto SMF)		≥60%	≥75%
Sopravvivenza ovocitaria allo scongelamento (%)	n° di ovociti morfologicamente intatti/ n° di ovociti scongelati	Tutti i pazienti		≥70%	≥85%
Sopravvivenza embrioni scongelati (day 3)* (%)	n° di embrioni con tutti i blastomeri intatti in day3/ n° di embrioni scongelati in day3	Tutti i pazienti		≥70%	≥85%
Sopravvivenza blastocisti scongelate (%)	n° blastocisti sopravvissute/ n° di blastocisti scongelate	Tutti i pazienti		≥90%	≥99%
Biopsia effettuata con successo (%)	n° biopsie con DNA rilevato/ n° di biopsie effettuate	Tutti i pazienti		≥95%	≥97%

IVM: in vitro maturation; **SMF:** fattore maschile severo; **AOA:** attivazione ovocitaria artificiale; **PGT-A:** preimplantation genetic testing; **FIV:** fecondazione in vitro.

* misurato a 68 ± 1 ore post inseminazione.

Reference: Vaiarelli A, Zacà C, Spadoni V, Cimadomo D, Conforti A, Alviggi C, Palermo R, Bulletti C, De Santis L, Pisaturo V, Vigliano V, Scaravelli G, Ubaldi FM, Borini A. Clinical and laboratory key performance indicators in IVF: A consensus between the Italian Society of Fertility and Sterility and Reproductive Medicine (SIFES-MR) and the Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR). *J Assist Reprod Genet.* 2023 Jun;40(6):1479-1494.

	RAPPORTO DI AUDIT	
--	--------------------------	--

DATA DELLA VERIFICA:

PROCESSO VERIFICATO:

GRUPPO DI VERIFICA:

RESPONSABILE DELLA VERIFICA:

SCOPO DELLA VERIFICA ISPETTIVA:

EVIDENZE EMERSE NEL CORSO DELLA VERIFICA:

APERTURA AC/AP/AM

SI

NO

N°

Responsabile della verifica

Responsabile del laboratorio

Data di compilazione

RAPPORTO DI NON CONFORMITA'

Dove è stata rilevata:

A chi è imputabile:

Descrizione :

Riferimenti a norme e procedure:

Chi ha rilevato la NC:

Ente/U.O. che ha rilevato la NC:

Data:

Firma:
.....

Analisi della NC e individuazione delle cause:

Proposta di correzione / rimozione della non conformità:

Chi ha analizzato e trattato la NC:

Ente/U.O. che ha analizzato e trattato la NC:

Data:

Firma:
.....

Verifica efficacia della risoluzione:

 soddisfacente/accettata insoddisfacente/non accettata altro specificare

Chi ha verificato l'efficacia della risoluzione:

Ente/U.O. che ha verificato l'efficacia della risoluzione:

Data:

Firma:
.....

Necessaria una azione correttiva/preventiva?

 NO SI se si azione preventiva n° ____ azione correttiva n° ____

Responsabile gruppo di lavoro:

Ente responsabile:

Data:

Firma:
.....

RGQ:

Data:

Firma:
.....

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 fecondazioni		
Piastre transfer		
Piastre controllo in D3		
Piastre FIV		
TERRENI PER IL GIORNO: _____		
	DATA/ORA	Sigla operatore e firma
ELENCO TERRENI		
PREPARAZIONE HYALURONIDASE		
PREPARAZIONE GRADIENTI PER TRATTAMENTO LIQUIDO SEMINALE		

CHECKLIST PROCEDURA CRIOPRESERVAZIONE GAMETI/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	

	INTERVENTI DI PULIZIA - LABORATORIO	
--	--	--

Anno _____ Mese _____

Descrizione attività: **A**-Vuotatura cestini, **B**-Spolveratura arredi (esclusi banchi di laboratorio) e sedie/sgabelli (comprese rotelle), **C**-Pulizia pavimento, **D**-Pulizia delle superfici verticali **E**-Spolveratura ad umido in quota superfici verticali e orizzontali, **F**- Pulizia dei vetri accessibili interni ed esterni

Giorno	Orario intervento	Attività di pulizia quotidiana			Firma Operatore	Orario intervento	Attività di pulizia periodica			Firma Operatore	Note
		A	B	C			D	E	F		
1		A	B	C			D	E	F		
2		A	B	C			D	E	F		
3		A	B	C			D	E	F		
4		A	B	C			D	E	F		
5		A	B	C			D	E	F		
6		A	B	C			D	E	F		
7		A	B	C			D	E	F		
8		A	B	C			D	E	F		
9		A	B	C			D	E	F		
10		A	B	C			D	E	F		
11		A	B	C			D	E	F		
12		A	B	C			D	E	F		
13		A	B	C			D	E	F		
14		A	B	C			D	E	F		
15		A	B	C			D	E	F		
16		A	B	C			D	E	F		
17		A	B	C			D	E	F		
18		A	B	C			D	E	F		
19		A	B	C			D	E	F		
20		A	B	C			D	E	F		
21		A	B	C			D	E	F		
22		A	B	C			D	E	F		
23		A	B	C			D	E	F		
24		A	B	C			D	E	F		
25		A	B	C			D	E	F		
26		A	B	C			D	E	F		
27		A	B	C			D	E	F		
28		A	B	C			D	E	F		
29		A	B	C			D	E	F		
30		A	B	C			D	E	F		
31		A	B	C			D	E	F		

	SCHEDA APPARECCHIATURA E MANUTENZIONE	
--	--	--

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 _____

	RICHIESTA MOVIMENTAZIONE MATERIALE BIOLOGICO	
--	---	--

Luogo e Data.....

Il/la/i sottoscritto/a/i.....

RICHIEDE/RICHIEDONO

Il trasferimento del proprio materiale crioconservato:

- Spermatozoi
- Ovociti
- Embrioni
- Tessuto testicolare

dal centro di PMA

al centro di PMA.....

Preso atto dell'informativa ricevuta ai sensi dell'art.13 del Regolamento UE 679/2016 "relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali, nonché alla libera circolazione di tali dati e che abroga la direttiva 95/46/CE (regolamento generale sulla protezione dei dati)",

ACCONSENTE/ACCONSENTONO

al trattamento dei propri dati personali per finalità di procreazione medicalmente assistita ed in particolare alla loro comunicazione tra i due suddetti centri. Dichiarano di essere stati adeguatamente informati, sulle modalità di trasporto e sugli eventuali rischi, dal personale del centro e sollevano pertanto il Centro da qualsiasi responsabilità relativa al trasporto;

RICHIEDE/RICHIEDONO

al centro inviante di inviare la seguente documentazione via mail, all'indirizzoperché il Centro Ricevente possa verificare l'idoneità del materiale da accettare:

- Screening virologico effettuato in preparazione al trattamento (HBsAg, HBcAb, HCV, HIV, TPHA, VDRL)
- Consenso informato alla PMA e alla crioconservazione
- Descrizione dettagliata del materiale biologico crioconservato (Inclusi i rispettivi codici identificativi, protocollo congelamento etc.)

Firma (Sig).....Firma (Sig.ra).....

	ACCETTAZIONE MOVIMENTAZIONE MATERIALE BIOLOGICO	
--	--	--

Spett.le Centro

.....

In merito alla movimentazione del materiale crioconservato per conto del Signor/Signora/dei Signori:

.....

il nostro Centro:

Denominazione:..... Sito a

in Via.....

Responsabile Lab:.....Contatti:.....Mail:.....

Ha esaminato la documentazione preliminare ricevuta e pertanto:

- ACCETTA
- NON ACCETTA

(motivo.....)

la movimentazione del materiale crioconservato presso il Vs Centro.

Il centro inviante garantisce il controllo della corrispondenza tra la documentazione e il materiale, la correttezza del caricamento del contenitore, la produzione dell'etichetta di trasporto e la sigillatura del contenitore per evitare manomissione.

Il trasporto avverrà mediante:

- Paziente/pazienti
- Vettore _____delegato al trasferimento del materiale biologico

Rimaniamo in attesa di concordare la data del trasferimento.

Data.....

Il Referente del Trasporto.....

Il Responsabile del Centro di PMA.....

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

SESSIONE 1: IDENTIFICAZIONE DEL CENTRO DI PMA CHE ACCETTA IL MATERIALE:

Nome Centro:		Nr. ISS:	TE Code
Indirizzo:	N°	Città	
Telefono:	E-mail:		
Responsabile del Centro di PMA:			
Responsabile di Laboratorio:			
Responsabile del trasporto			

IDENTIFICAZIONE DEL CENTRO DI PMA CHE INVIA IL MATERIALE:

Nome Centro:		Nr. ISS:	TE Code
Indirizzo:	N°	Città	
Telefono:	E-mail:		
Responsabile del Centro di PMA:			
Responsabile di Laboratorio:			
Responsabile del trasporto			

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

SESSIONE 2: IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI

Dati Partner Maschile: (compilare nel caso di trasporto di **spermatozoi, embrioni e blastocisti**)

Nome:	Cognome:	ID.
Data di nascita:	Luogo di nascita	Prov.:
Città di residenza	CAP	Prov.:
Cellulare:	Telefono fisso:	
e-mail:		
Documento Identità: Allegato	Firma: _____	

Dati Partner Femminile: (compilare nel caso di trasporto di **ovociti, embrioni e blastocisti**)

Nome:	Cognome:	ID.
Data di nascita:	Luogo di nascita	Prov.:
Città di residenza	CAP	Prov.:
Cellulare:	Telefono fisso:	
e-mail:		
Documento Identità: Allegato	Firma: _____	

Il/la/i sottoscritto/a/i: _____

Preso atto dell'informativa ricevuta ai sensi dell'art.13 del Regolamento UE 679/2016 "relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali, nonché alla libera circolazione di tali dati e che abroga la direttiva 95/46/CE (regolamento generale sulla protezione dei dati)",

ACCONSENTE/ACCONSENTONO

Ai sensi dell'art.76 comma 1 b) del D.Lgs 196/2002, al trattamento dei propri dati personali per finalità di Procreazione Medicalmente Assistita, ed in particolare alla loro comunicazione:

dal centro PMA _____ al Centro _____

Data _____

Firma _____ Firma _____

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

SESSIONE 3: INFETTIVOLOGIA PAZIENTE:

(Allegare i referti delle indagini effettuate nelle date previste dalla legge vigente)

Esame	Partner femminile		Partner maschile	
	Data	Esito	Data	Esito
HIV1-2				
HCV				
HBsAg				
HbcAb IgG IgM				
Altro				
TPHA / VDRL				

 Vedi Referti allegati

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

SESSIONE 4: IDENTIFICAZIONE DEL MATERIALE CRIOCONSERVATO

Materiale Criocconservato:

<input type="checkbox"/> SPERMATOZOI	<input type="checkbox"/> OVOCITI	<input type="checkbox"/> EMBRIONI
--------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------

Liquido Seminale:

Dati Identificazione supporti criogenici		Nr. dispositivi	
Data procedura crioconservazione		<input type="checkbox"/> Eiaculato <input type="checkbox"/> Biopsia testicolare	
Campione siero discordante <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tipo di carica virale abbattuta (Allegare Esito)	<input type="checkbox"/> HBV <input type="checkbox"/> HCV <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> CMV	
Kit congelamento		N° lotto	Scad.
Dispositivo di Congelamento	<input type="checkbox"/> Paillette	<input type="checkbox"/> Standard <input type="checkbox"/> High security	N° Lotto
	<input type="checkbox"/> Vials		Scad.
N° dispositivi di congelamento rimasti nel Centro di PMA d'origine			

Ovociti:

Dati Identificazione supporti criogenici		Nr. dispositivi	
Data procedura crioconservazione		Metodo di congelamento	<input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Vitrificazione
Kit congelamento		N° lotto	Scad.
Dispositivo di Congelamento	Tipo	<input type="checkbox"/> Standard <input type="checkbox"/> High security	N° Lotto
N° dispositivi di congelamento rimasti nel Centro di PMA d'origine			

Embrioni:

Dati Identificazione supporti criogenici		Nr. dispositivi	
Data procedura crioconservazione		Metodo di congelamento	<input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Vitrificazione
Kit congelamento		N° lotto	Scad.
Dispositivo di Congelamento	Tipo	<input type="checkbox"/> Standard <input type="checkbox"/> High security	N° Lotto
N° dispositivi di congelamento rimasti nel Centro di PMA d'origine			

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

SESSIONE 5: INFORMAZIONI SUL TRASPORTO

Il Centro di PMA

DICHIARA

Che il materiale biologico è stato controllato e trasferito nell'apposito contenitore predisposto al trasporto da:

Referente Trasporto _____ Firma _____

Testimone _____ Firma _____

CONTENITORE UTILIZZATO PER IL TRASPORTO:

- Contenitore di spedizione a vapori Monouso tipo Dry Shipper
- Contenitore fornito e adeguatamente preparato dalla ditta esterna _____

Controlli in preparazione spedizione:

DESCRIZIONE	Esito		Note:
Contenitore da trasporto	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	Per dry shipper kg _____
Livello azoto	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
Temperatura	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
Documentazione d'accompagnamento (Vedi elenco allegati)	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
Etichetta primaria	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
Etichetta secondaria	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
Imballaggio	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	

ALLEGATI:

- Consenso informato al congelamento firmato dai pazienti
- Fotocopia documento di identità paziente/i
- Esami infettivi presenti alla crioconservazione

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

In caso di utilizzo di società di trasporti:

- allegare fotocopia del documento di identità della persona incaricata al trasporto.

Io/Noi sottoscritto/i _____ e _____

Identificato/i presso il vs Centro con ID _____ chiedo/no di voler trasportare il mio/nostro materiale biologico crioconservato presso altro Istituto dei tessuti:

Affidandoci alla Società di trasporti _____

Data _____ Firma (Sig.ra) _____ Firma (Sig.) _____

Data consegna _____ ora _____

Operatore del rilascio _____ Firma _____

Responsabile del Trasporto _____ Firma _____

Timbro e/o Ragione sociale del Centro

Firma del Responsabile del centro di PMA inviante

	SCHEDA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	--	--

SESSIONE 6: INFORMAZIONI SUL RICEVIMENTO MATERIALE

Questa sezione deve essere compilata al momento del ricevimento del materiale e inviata ai recapiti del centro inviante.

Accettazione materiale crioconservato:		OPERATORE	
DATA	ORA	NOME E COGNOME	FIRMA

Verifica condizioni di trasporto:

DESCRIZIONE	Esito		Note:	
	<input type="checkbox"/>	CONFORME		<input type="checkbox"/>
Imballaggio	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Etichetta secondaria	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Livello azoto	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Temperatura	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Documentazione d'accompagnamento Vedi elenco allegati	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Etichetta primaria	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Nr. Dispositivi ricevuti	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME
Verifica identificazione dispositivi	<input type="checkbox"/>	CONFORME	<input type="checkbox"/>	NON CONFORME

Timbro e/o Ragione Sociale del Centro	
Data	Firma Responsabile Centro PMA ricevente

	INFORMATIVA PER IL TRASPORTO DI MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO	
--	---	--

Il contenitore da trasporto che viene consegnato contiene materiale biologico umano UN3 373 crioconservato immerso in azoto liquido.

L'azoto liquido è molto pericoloso ai sensi della normativa vigente, può provocare ustioni criogeniche da contatto ed evapora velocemente se mantenuto a temperatura ambiente. Il vapore è più pesante dell'aria quindi può accumularsi a livello del suolo e in spazi chiusi provocare asfissia se la percentuale di ossigeno scende sotto il 18%.

È **necessario** pertanto che il contenitore:

- Sia convalidato come idoneo allo scopo ed anche il suo imballaggio
- Venga mantenuto in posizione verticale
- Venga posto in luogo fresco e ventilato protetto da urti
- Non venga aperto, il sigillo posto dal personale del centro inviante non dovrà essere rimosso per nessun motivo se non dal personale del centro ricevente
- Venga consegnato con le modalità di trasporto ed i tempi di consegna che saranno indicati a seconda delle caratteristiche del criocontenitore utilizzato per il trasporto.

DOCUMENTAZIONE:

- La documentazione di trasporto deve rimanere unita al contenitore
- L'etichetta deve rimanere integra

Il Sig. _____ (di cui si allega fotocopia documento di riconoscimento) incaricato dal/dai paziente/i del trasporto, dichiara di aver letto tutte le condizioni sopra riportate e sottoscrive il presente accordo impegnandosi a rispettare termini e condizioni ivi descritti.

La presa in carico del materiale biologico mediante consegna al vettore incaricato, solleva il Centro inviante da qualsiasi responsabilità inerente al trasporto o da eventuali danni provocati da tale procedura.

Data

Firma incaricato del trasporto

	ETICHETTA SECONDARIA PER CONTENITORE DA TRASPORTO	
--	--	--

Denominazione del centro <i>inviante</i>					
Città		Indirizzo		N°	
Cap		Provincia		Telefono	
Tel.Lab		Fax Lab	-	Fax	
E-mail		Sito web			
Il Centro di PMA è autorizzato e accreditato: <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> in attesa					
Resp. Del Centro di PMA di origine			Nome e Cognome		
Personale referente					

DICHIARA

Che il contenitore contiene tessuti e cellule di origine UMANA (UN3373)
SPECIFICATAMENTE _____

TRATTARE CON CAUTELE

Si richiede pertanto che non venga sottoposto a controllo radiogeno.

NON IRRADIARE

Data Partenza _____ ora _____

In Fede, il direttore del Centro di PMA d'origine	
Firma	

Denominazione del centro <i>ricevente</i>					
Città		Indirizzo		N°	
Cap		Provincia	RM	Tel. Lab	
Cellulare		Fax		E-mail	
Respo. Del Centro di PMA ricevente					
Personale referente					

MANTENERE IL CONTENITORE DA TRASPORTO IN POSIZIONE VERTICALE

NON ESPORRE A FONTI DI CALORE NON IRRADIARE	 Proteggere dal calore e dalle radiazioni
NON DEVE SUBIRE URTI NON CAPOVOLGERE MANEGGIARE CON CURA	
NON APRIRE SE NON IN PRESENZA DI PERSONALE QUALIFICATO DAI CENTRI SOPRA INDICATI	

	RACCOLTA DATI COPPIA RICEVENTE	
--	---------------------------------------	--

Codice Coppia:
Centro:
Richiesto da:
Data:

CARATTERISTICHE DELLA COPPIA RICEVENTE		
DONNA	CARATTERISTICHE	UOMO
	Età	
	Fenotipo	
	Gruppo, Rh	
	Altezza	
	Peso	
	Colore dei capelli	
	Tipo Capelli	
	Colore degli occhi	
	Carnagione	
RICHIESTA OVOCITI <input type="checkbox"/>		
N° OVOCITI:		N° SUPPORTI:
RICHIESTA SEME DONATORE <input type="checkbox"/>		
N° PAILLETES:		<input type="checkbox"/> RAW <input type="checkbox"/> READY TO USE

	ACCETTAZIONE GAMETI ETEROLOGA	
--	-------------------------------	--

Accettazione materiale crioconservato:

DATA	ORA INIZIO	ORA FINE	OPERATORE LABORATORIO: Firma: _____
BANCA DI PROVENIENZA		DITTA	TESTIMONE LABORATORIO: Firma: _____
NOME COGNOME TRAPORTATORE: Firma: _____			

Verifica condizioni di trasporto:

DESCRIZIONE	STATO		AZIONE CORRETTIVA
IMBALLAGGIO SECONDARIO ESTERNO	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
CONTENITORE DA TRASPORTO	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
PRESENZA / INTEGRITA' FASCETTA	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
LIVELLO AZOTO	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
TEMPERATURA : (da -198°C a -170°C)	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	
ETICHETTA SECONDARIA	<input type="checkbox"/> CONFORME	<input type="checkbox"/> NON CONFORME	

Verifica etichette primarie e documentazione d'accompagnamento:

PRESENZA DOCUMENTO D'INVIO E ACCETTAZIONE MATERIALE BIOLOGICO	PRESENZA/ INTEGRITA' ETICHETTA PRIMARIA	CONGRUENZA DOCUMENTO D'ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONI/ ETICHETTA PRIMARIA	EVENTUALI ANOMALIE

In base alle verifiche effettuate il materiale consegnato:

- è stato accettato
- non è stato accettato

NON CONFORMITA':	AZIONE CORRETTIVA:
------------------	--------------------

Firma operatore laboratorio

Firma testimone laboratorio

Guide to the quality
and safety of
TISSUES AND CELLS
for human application



European Committee
(Partial Agreement)
on Organ Transplantation
(CD-P-TO)

EDQM
5th Edition
2022

Capitolo 29. Procreazione medicalmente assistita

29.1. Introduzione

Questo capitolo tratta le procedure mediche utilizzate per ottenere gravidanze e nati vivi che coinvolgono l'identificazione, l'approvvigionamento (raccolta), la processazione e/o lo stoccaggio, nonché la distribuzione di almeno una delle seguenti cellule e tessuti riproduttivi: ovociti, sperma, zigoti, embrioni, tessuto ovarico e testicolare. Queste procedure possono essere effettuate utilizzando gameti, zigoti o embrioni appena raccolti e/o crioconservati, che provengono dalla coppia in trattamento (donazione da partner) o da donatori di gameti o embrioni (donazione da terzi o non partner). Per l'approvvigionamento, la processazione e/o lo stoccaggio di tessuto ovarico e testicolare, ci riferiamo al Capitolo 30 - Preservazione della fertilità. Questi contesti vengono affrontati separatamente in ragione dei rischi diversi che essi comportano. La stimolazione ovarica o qualsiasi altra procedura clinica che non implica la raccolta di gameti non viene trattata in questo capitolo.

La Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) viene anche indicata come Tecniche di Riproduzione Assistita (ART). Tuttavia, il termine PMA è più ampio e include le ART, oltre che la stimolazione ovarica e l'inseminazione intra-uterina di sperma, mentre il termine ART si riferisce solo alle procedure che includono la manipolazione *in vitro* e la coltura di gameti o embrioni.

La PMA viene effettuata presso centri specializzati nel trattamento dei pazienti con problemi di fertilità. Questi centri di solito consistono in un'istituto

dei tessuti (TE) e un'organizzazione responsabile per l'applicazione umana, che riunisce un team di laboratorio e un team clinico in un'unità multidisciplinare.

L'approvvigionamento, processazione e/o stoccaggio, nonché il rilascio e la distribuzione delle cellule riproduttive, possono essere eseguite anche da banche per la conservazione dei gameti che non fanno parte di una clinica per la fertilità. Le raccomandazioni di questo capitolo riguardano tutte le strutture in cui vengono gestite le cellule riproduttive.

La PMA comprende diverse procedure, tra cui le seguenti:

- Processazione dello sperma per l'inseminazione intrauterina. Lo sperma viene processato e trasferito nell'utero intorno al momento stimato dell'ovulazione [1].
- Fecondazione *in vitro* (FIV), sia convenzionale, in cui sperma e ovociti raccolti e preparati vengono incubati insieme (cosiddetta FIV routinaria o standard), sia iniezione intracitoplasmatica dello sperma (ICSI), in cui un singolo spermatozoo viene iniettato in un'ovocita maturo. La FIV implica la raccolta e la processazione dei gameti, la fecondazione, la coltura degli embrioni e il trasferimento degli embrioni nell'utero.
- La maturazione *in vitro* (MIV) si riferisce alla maturazione degli ovociti recuperati da follicoli non pre-ovulatori che sono stati o meno stimolati con gonadotropine esogene.
- Crioconservazione e conservazione di gameti, zigoti, embrioni e/o tessuto gonadico.

- Test genetico pre-impianto (PGT), che utilizza metodi di identificazione genetica per diagnosticare o selezionare *in vitro* gli ovociti o gli embrioni al fine di accertare la presenza di eventuali malattie ereditarie conosciute o ri-arrangiamenti cromosomici incompatibili con la nascita di un bambino sano.

Questo approccio prevede diverse forme di test, come PGT-M per difetti genici/monogenici e malattie mitocondriali, PGT-SR per riarrangiamenti strutturali cromosomici e PGT-A per il test di aneuploidia.

La criopreservazione di gameti o tessuto gonadico può essere utilizzata nei pazienti affetti da determinate patologie (ad esempio, il cancro e alcune malattie croniche) il cui trattamento potrebbe essere potenzialmente dannoso per la loro fertilità. In questi casi, a pazienti bambini, adolescenti o adulti, può essere proposta la conservazione a lungo termine di cellule riproduttive e tessuti criopreservati. Questo approccio, chiamato "preservazione della fertilità" (trattato nel Capitolo 30), rappresenta anche un'opzione di trattamento per casi non medici, il cosiddetto "congelamento a scopo sociale". I trattamenti di PMA possono essere proposti anche a partner affetti da gravi malattie trasmissibili, come il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o i virus dell'epatite B e C (HBV e HCV), che rischiano di trasmettere la patologia l'uno all'altra (trasmissione orizzontale) e/o al loro futuro figlio (trasmissione verticale). Queste pratiche vengono effettuate solo dopo una valutazione del rischio di trasmissione della malattia verticale e orizzontale e tenendo conto delle condizioni di salute degli individui [2]. In alcuni Paesi, la PMA può essere offerta a donne single o coppie di donne omosessuali. In alcuni Paesi europei, a rigorose condizioni, è consentita la maternità surrogata per donne senza utero o con un utero non funzionale o per coppie omosessuali maschili. Attraverso l'inseminazione o il trasferimento di embrioni, il soggetto gestante (precedentemente indicato come "madre surrogata") [1] porta in grembo e partorisce un bambino per i genitori d'intenzione.

La PMA viene eseguita nella maggior parte dei Paesi europei. Ogni anno, la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) pubblica un rapporto sull'attività di PMA nei Paesi europei, basato su dichiarazioni volontarie. I dati ESHRE più recenti (del 2017) includono dati provenienti da 1.382 cliniche in 39 Paesi e riportano 940.503 cicli di trattamento, tra cui 165.379 di FIV/ICSI, 271.476 cicli da embrioni crioconservati (FER), 37.303 con test genetico pre-impianto, 69.378 con donazione di ovociti (ED),

378 di maturazione *in vitro* (IVM) di ovociti e 5.210 cicli con ovociti crioconservati (FOR). I dati europei sull'inseminazione intrauterina utilizzando il seme del marito/partner (IUI-H) e il seme del donatore (IUI-D) sono stati riportati da 1.352 istituti in 25 Paesi e 21 Paesi, rispettivamente. Sono stati inclusi un totale di 139.050 cicli di IUI-H e 49.001 cicli di IUI-D. Tredici Paesi hanno segnalato 18.888 interventi per la preservazione della fertilità, incluso lo stoccaggio di ovociti, tessuto ovarico, seme e tessuto testicolare e pazienti pre- e post-puberi [3]. Questo capitolo ha lo scopo di fornire linee guida che possano contribuire ad un concepimento singolo, che porti alla nascita di un bambino vivo e sano, che è l'obiettivo finale della PMA. Dal punto di vista etico, le attività mediche pertinenti, possono essere considerate sensibili in molti Paesi. Le procedure qui descritte sono intese a raggiungere l'efficienza clinica in termini di numero di parti ben riusciti e a garantire la sicurezza dei pazienti, dei donatori e dei bambini nati.

Inoltre, i seguenti capitoli generici (Parte A) di questa Guida si applicano alla PMA e devono essere letti insieme a questo capitolo:

- Capitolo 1. Introduzione
- Capitolo 2. Gestione della qualità e validazione
- Capitolo 3. Gestione del rischio
- Capitolo 4. Reclutamento, identificazione e consenso dei potenziali donatori
- Capitolo 5. Valutazione del donatore
- Capitolo 6. Esame del donatore - marker per le malattie infettive
- Capitolo 7. Approvvigionamento
- Capitolo 8. Premesse
- Capitolo 9. Processazione
- Capitolo 10. Stoccaggio
- Capitolo 11. Principi dei test microbiologici
- Capitolo 12. Rilascio, distribuzione e import/export
- Capitolo 13. Interazione tra istituti dei tessuti e organizzazioni responsabili dell'applicazione umana
- Capitolo 14. Sistemi computerizzati
- Capitolo 15. Codifica, imballaggio ed etichettatura
- Capitolo 16. Tracciabilità
- Capitolo 17. Biovigilanza
- Capitolo 18. Introduzione dei nuovi processi e applicazioni cliniche

Questo capitolo definisce ulteriori requisiti per la PMA. Le procedure possono variare di Paese in Paese come da normativa nazionale.

29.2. Gestione della qualità, gestione del rischio e validazione

L'implementazione di un sistema di gestione della qualità è obbligatoria e contribuisce alla conformità e al successo di un programma di PMA. Questa sezione dovrebbe essere letta insieme al Capitolo 2 e al Capitolo 3; tuttavia, alcune questioni specifiche di gestione della qualità relative alla PMA sono affrontate di seguito.

29.2.1. Analisi della valutazione del rischio per le attività di laboratorio

La gestione del rischio contribuirà nella valutazione e prioritizzazione dei possibili rischi esistenti al fine di monitorarli e controllarli, in modo da mantenere al minimo la probabilità che si verifichi un evento avverso. I metodi più comunemente

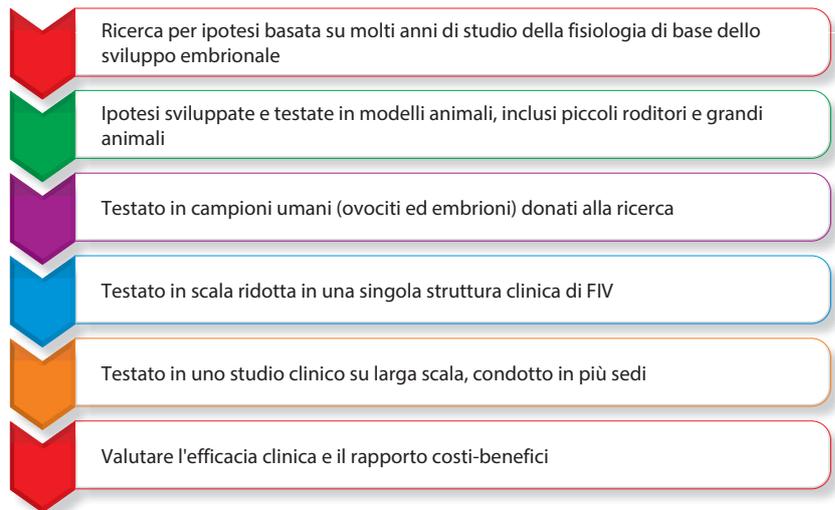
utilizzati per la valutazione del rischio sono: l'analisi dei modi e degli effetti degli errori (FMEA) [4], l'analisi dei modi, degli effetti e della criticità degli errori (FMECA) e il sistema di analisi dei rischi e del punto di controllo critico (HACCP). Il processo di valutazione del rischio è descritto nel Capitolo 3 al paragrafo 3.1.

29.2.2. Validazione

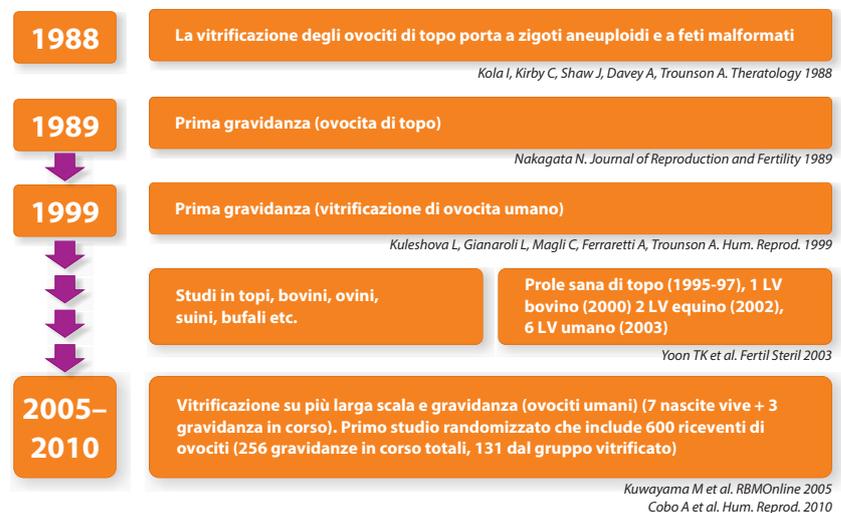
Per le procedure di PMA, attualmente non esiste un sistema di test con la necessaria sensibilità biologica, a parte la valutazione dell'efficacia clinica. I nuovi dispositivi dovrebbero essere qualificati e i metodi dovrebbero essere validati prima di essere utilizzati in ambito clinico. Tale validazione dovrebbe includere l'installazione, la qualifica operativa (tecnica) e la qualifica delle prestazioni, mediante confronto con indicatori chiave di prestazione di laboratorio (KPI) per tipi di attrezzature o metodi simili già

Figura 29.1. Validazione delle nuove tecniche nella procreazione medicalmente assistita

1. Passi teorici da seguire quando si introduce una nuova tecnica nell'uso clinico in procreazione medicalmente assistita



2. Esempio di un processo di validazione nella procreazione medicalmente assistita



Fonte: Adattato da Harper J et al. When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum Reprod* 2012;27(2):303-13.

esistenti in laboratorio. Il Gruppo di Interesse Speciale di Embriologia dell'ESHRE, in collaborazione con gli *Alpha Scientistis in Reproductive Medicine*, ha stabilito livelli di prestazione minimi (competenza) e auspicabili (*benchmark*) per il laboratorio di FIV. Sulla base delle informazioni presentate, ogni laboratorio dovrebbe selezionare il proprio set di KPI basato sull'organizzazione e sui processi di laboratorio o su dati disponibili e utili forniti dai registri nazionali [5]. Di recente, sono stati pubblicati indicatori di prestazione per la pratica clinica nella PMA [6].

Allo stesso modo, è auspicabile garantire che sia stata condotta la necessaria ricerca e sviluppo prima di introdurre nuove tecniche nella pratica clinica, preferibilmente mediante studi controllati randomizzati ben progettati con un follow-up di tutti i bambini nati dalla procedura. I passi necessari per validare una nuova tecnologia prima della sua introduzione nella pratica clinica sono stati descritti (vedi Figura 29.1) [7, 8]. In alcuni Paesi, è richiesta un'autorizzazione formale dalle Autorità Sanitarie prima di introdurre una nuova tecnica nella pratica clinica.

29.2.3. Materiali, consumabili e reagenti

I materiali di consumo critici e i mezzi di coltura dovrebbero essere sottoposti a controllo di qualità, adatti allo scopo previsto, specifici per la coltura degli embrioni e, se disponibili per l'uso previsto e in grado di fornire risultati almeno equivalenti rispetto alle alternative qualificate, essere marcati CE.

Sono necessari specifici mezzi di coltura per gameti ed embrioni che soddisfino questi requisiti durante tutte le attività di processazione in PMA, ad esempio la fecondazione, la coltura e la criopreservazione.

Il siero del paziente o del donatore o il liquido follicolare non dovrebbero essere utilizzati come integrazione proteica. I fornitori commerciali di albumina sierica umana o di mezzi contenenti una fonte proteica derivata dal siero dovrebbero fornire evidenza di screening per malattie virali trasmissibili in conformità alle normative europee e/o nazionali.

29.3. Selezione, identificazione e consenso dei potenziali donatori

29.3.1. Selezione del donatore - Donazione non partner

Come per qualsiasi tessuto e cellula, la donazione di cellule riproduttive deve seguire i principi

della donazione volontaria e non retribuita, come descritto nel Capitolo 4 (vedi §4.2.1.3, che si riferisce specificamente alla PMA). Tuttavia, le spese legate alla donazione possono essere rimborsate e la perdita di guadagno può essere compensata.

Le normative nazionali dovranno dedicare particolare attenzione all'esistenza di pubblicità e promozioni false o fuorvianti. Inoltre, le attività degli enti di prelievo legate alla donazione devono avere carattere non a scopo di lucro, il che significa che dovrebbero essere addebitati solo i costi effettivi dei servizi aggiuntivi (quelli necessari per consentire la donazione).

29.3.2. Consenso del donatore - Partner e non partner

I trattamenti di PMA possono essere effettuati con gameti del partner o con gameti donati da persone esterne alla coppia (cosiddetta "donazione da partner" o "donazione da non partner"). Il Capitolo 4 descrive le procedure di consenso per la donazione da parte di donatori viventi, e ciò si applica anche ai donatori di gameti ed embrioni nel caso della donazione da non partner. Il consenso informato scritto è obbligatorio anche per i gameti donati dal partner. In questa sezione vengono descritti ulteriori aspetti dei moduli di consenso specifici che devono essere presi in considerazione. Nella PMA, i moduli di consenso devono essere separati per i pazienti di sesso femminile e maschile, anche se per determinati trattamenti - e soprattutto nella donazione da partner - possono essere combinati in un unico documento. È importante sottolineare che i documenti combinati per la donazione da partner, devono essere firmati da entrambi i partner.

La coppia (o l'individuo) sottoposto a trattamento di PMA dovrebbe ricevere informazioni scritte e orali (durante il consulto medico o con il personale paramedico, attraverso sessioni informative, depliant, siti web, ecc.) su quanto segue [9]:

- a. legislazione nazionale che regola la PMA e le sue implicazioni per coloro che hanno accesso a tale trattamento;
- b. nei casi di donazione da non partner e donazione di embrioni, le implicazioni della legislazione nazionale attuale per l'eventuale anonimato del donatore e per il possibile diritto del figlio di conoscere le proprie origini biologiche;
- c. possibilità di revoca del consenso al trattamento;
- d. possibilità di successo basate sulla propria storia medica, il grado di invasività e i pos-

- sibili rischi associati alla PMA (compresa la gravidanza multipla). Nei trattamenti che prevedono l'assunzione di ormoni, si deve fare particolare riferimento alla sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) e ai rischi legati al prelievo degli ovociti (ad esempio, sanguinamento, infezione o perforazione della vescica o dell'intestino);
- e. test per malattie genetiche e infettive, inclusi i controlli pertinenti effettuati sui donatori di gameti nella donazione da non partner;
 - f. descrizione completa del trattamento in ogni fase della sua attuazione;
 - g. opzione di criopreservare e conservare gameti e embrioni supernumerari per utilizzi futuri in conformità con la legislazione nazionale;
 - h. costo totale di un ciclo di trattamento e politiche di rimborso esistenti, se applicabili;
 - i. possibilità che il medico non effettui l'intero trattamento (o parti di esso) per ragioni mediche o deontologiche;
 - j. Possibili questioni etiche relative alla PMA;
 - k. Possibili effetti psicologici indesiderati causati dal trattamento di PMA;
 - l. Possibili rischi per la prole causati dal trattamento di PMA (in particolare, nelle gravidanze multiple) e la disponibilità limitata di dati di follow-up sulla salute a lungo termine dei bambini;
 - m. Se applicabile, la consapevolezza che i propri dati personali, saranno inclusi in un registro nazionale.

Inoltre, dovrebbe essere offerta consulenza psicologica alla coppia/paziente.

I trattamenti di PMA comprendono, normalmente, una serie di trattamenti separati. Pertanto, i moduli di consenso dovrebbero essere firmati per ogni trattamento o essere validi per più trattamenti consecutivi fino alla buona riuscita del trattamento, fino a una data predefinita o fino a quando le circostanze rilevanti non cambino.

Se il trattamento viene effettuato con gameti criopreservati, il consenso per lo scongelamento deve essere dato per ogni trattamento. Nel caso di embrioni criopreservati derivanti da donazione del partner, entrambi i partner devono dare il consenso prima di ogni trattamento. Questa politica impedirebbe l'inizio di un trattamento da parte di uno dei partner senza che ne sia a conoscenza o abbia dato il proprio consenso.

Nel modulo di consenso, la coppia dovrebbe decidere se autorizzare o meno la crioconservazione

degli embrioni o dei gameti. A seconda delle opzioni possibili, la coppia dovrebbe ricevere informazioni sulle diverse percentuali di riuscita e sulle implicazioni della legislazione nazionale riguardo al destino finale dei gameti o degli embrioni criopreservati. Il destino dei gameti o degli embrioni criopreservati potrebbe essere: conservarli per i propri fini riproduttivi, donarli a un'altra coppia, donarli alla ricerca scientifica, donarli per la validazione in laboratorio se consentito (a seconda della normativa locale) o distruggerli. Il modulo di consenso potrebbe anche includere aspetti sulla durata dello stoccaggio.

Dovrebbe esserci un consenso specifico ogni volta che vengono utilizzati metodi aggiuntivi alla FIV, ICSI e criopreservazione. In alcuni Paesi, un caso molto specifico nella PMA è l'opzione di dare il consenso all'uso di gameti o embrioni criopreservati rimasti da trattamenti precedenti, dopo la morte di uno dei partner ("donazione postuma"). Questo deve essere chiaramente specificato nel modulo di consenso.

Una donna che si sottopone ad ART potrebbe decidere di non utilizzare tutti i suoi ovociti per il proprio trattamento, ma di donarne alcuni ad altre coppie/individui a scopo riproduttivo. Questa procedura è chiamata "egg sharing" e implica che questa donna debba essere considerata sia una paziente che una donatrice non partner. Pertanto, lo screening dovrebbe essere condotto come descritto nel Capitolo 5 e nel Capitolo 6, e in particolare per le ART come nelle sezioni 29.5.1 e 29.5.2 qui di seguito.

29.4. Valutazione del donatore

29.4.1. Valutazione dei donatori partner

29.4.1.1. Colloquio

Le coppie che non riescono a concepire spontaneamente dovrebbero essere valutate insieme poiché l'infertilità costituisce una condizione medica condivisa da entrambi i partner. Il counselling prima, durante e dopo il trattamento è ampiamente praticato e raccomandato poiché l'infertilità, la sua indagine e il trattamento possono causare stress psicologico [10].

29.4.1.2. Anamnesi ed esame fisico

Ad entrambi i partner, è richiesta una completa anamnesi, inclusa la storia chirurgica, sessuale, contraccettiva, genetica, familiare e di gravidanza, nonché la storia di viaggi per valutare determinate malattie virali. Entrambi i partner dovrebbero inoltre sottoporsi a un esame fisico.

29.4.1.3. Screening della donna

Lo screening della donna dovrebbe comprendere:

- a. Valutazione dell'ovulazione, con una completa storia mestruale.
- b. Valutazione della riserva ovarica, inclusi test biochimici e/o ecografia delle ovaie.
- c. Valutazione della pervietà delle tube di Falloppio.
- d. Valutazione delle anomalie uterine, come fibromi sottomucosi, polipi, aderenze o malformazioni mulleriane (setti, utero bicorni).
- e. Prima del trattamento, dovrebbe essere effettuato il test per l'immunità alla rosolia; alle donne sieronegative dovrebbe essere offerta la vaccinazione prima di iniziare qualsiasi trattamento di procreazione assistita (PMA).

29.4.1.4. Screening dell'uomo

- a. Prima di iniziare il trattamento, dovrebbe essere effettuata almeno un'analisi del liquido seminale per fini diagnostici. Se i parametri seminali sono alterati, è possibile ripetere una seconda valutazione del liquido seminale dopo 2-3 mesi; le procedure e i valori di riferimento sono descritti nel manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e l'elaborazione del liquido seminale umano [11];
- b. Gli uomini con azoospermia o severa oligozoospermia dovrebbero essere sottoposti a screening per anomalie genetiche (ad esempio, la sindrome di Klinefelter o delezioni del cromosoma Y) e, se viene rilevata un'anomalia cromosomica, dovrebbe essere offerta un'adeguata consulenza genetica. In presenza di azoospermia ostruttiva, si dovrebbe fare uno screening per fibrosi cistica o anomalie del tratto renale. Oltre ai test genetici, si dovrebbe effettuare una valutazione ormonale e un'ecografia dell'scroto al fine di formulare una diagnosi di insufficienza testicolare.

29.4.1.5. Criteri di inclusione/esclusione al trattamento

Una valutazione medica completa contribuirà a determinare se una coppia è idonea al trattamento di procreazione medicalmente assistita (PMA). L'analisi del rischio-beneficio dovrebbe essere valutata caso per caso.

Il numero di cicli ripetuti dovrebbe essere valutato sulla probabilità stimata individualmente di una nascita viva. Indipendentemente da tale valutazione, i pazienti hanno il diritto all'autodeterminazione.

29.4.2. Valutazione dei donatori non partner

Lo scopo della valutazione dei donatori è quello di garantire che i donatori i cui gameti potrebbero mettere a rischio la salute del ricevente o della prole (ad esempio, trasmettendo malattie infettive o malattie genetiche) vengano esclusi [10]. Inoltre, è altrettanto importante garantire che il processo di donazione non arrechi danni alla salute del donatore. I test di valutazione e i criteri di esclusione possono dipendere dalla legislazione nazionale.

Per poter donare il proprio sperma/ovociti, il potenziale donatore deve sottoporsi a:

- a. Consultazione e consulenza con un professionista sanitario;
- b. Compilazione di un questionario di anamnesi familiare/medica/del donatore;
- c. Valutazione psicologica;
- d. Esame medico: esame ginecologico e ecografia per donatrici femmine, e esame genitale per donatori maschi;
- e. Test di laboratorio (compresi screening per malattie infettive);
- f. Tipizzazione del gruppo sanguigno;
- g. Test genetici come indicato dall'anamnesi familiare e dalla prevalenza dello stato di portatore in specifiche popolazioni; il test del cariotipo è fortemente raccomandato; sono ora disponibili estesi screening genetici per comuni mutazioni genetiche recessive - come il test del portatore per fibrosi cistica e atrofia muscolare spinale (SMA) - e dovrebbero essere presi in considerazione al fine di ridurre il rischio di trasmissione di malattie genetiche al futuro bambino. I test genetici saranno eseguiti in base alla prevalenza delle malattie nell'origine del donatore;
- h. Analisi del liquido seminale per donatori di sperma; il test di congelamento-scongelo può anche essere raccomandato per valutare la qualità dello sperma dopo il congelamento e lo scongelamento;
- i. Valutazione dell'ovulazione e della riserva ovarica (compreso l'esame endocrino) per donatrici di ovociti;
- j. Consenso informato prima di qualsiasi procedura.

29.4.2.1. Criteri di esclusione delle donatrici di ovociti:

- a. età < 18 anni o > 36 anni;
- b. riserva ovarica ridotta;
- c. risultati positivi ai test per malattie genetiche dominanti e/o malattie infettive;
- d. qualsiasi fattore di rischio per la salute della donatrice;

- e. inadeguatezza alla donazione emersa dal colloquio.

29.4.2.2. Criteri di esclusione dei donatori di sperma

- a. età < 18 anni e > 45 anni;
- b. risultati positivi ai test per malattie genetiche dominanti e/o malattie infettive;
- c. scarso livello di qualità dello sperma;
- d. scarso tasso di sopravvivenza dopo lo scongelamento;
- e. inadeguatezza alla donazione emersa dal colloquio.

In caso di donazione degli embrioni, anche i partner dei donatori da cui provengono i gameti devono essere considerati come donatori non partner e devono rispettare i criteri generali per la donazione non partner, elencati in questa sezione e nei capitoli 4 e 5.

29.4.2.3. Valutazione psicologica dei donatori non partner

Nella PMA è altamente consigliata una valutazione psicologica dei donatori non partner che dovrebbe focalizzarsi su un'anamnesi psicologica che includa, ma non sia limitata a, la motivazione del donatore, il suo pattern di stabilità personale, una discussione sulle implicazioni psicologiche future dell'essere un donatore di gameti e fornire supporto psicologico durante la preparazione alla donazione dei gameti. Potrebbero anche essere presi in considerazione test di personalità e/o diagnostici psicologici [10].

29.4.2.4. Benessere dei donatori di gameti non partner

Garantire il benessere dei donatori di gameti è molto importante. Sebbene il limite di età minima sia di 18 anni, sarebbe consigliabile, secondo buone pratiche cliniche, non includere donatori di gameti molto giovani in un programma di donazione, ma reclutare un gruppo di donatori più anziani, possibilmente con fertilità comprovata o desiderio di avere figli realizzato. Ad esempio, le donatrici di ovociti dovrebbero preferibilmente essere accettate dopo aver portato a termine una gravidanza di successo con i propri ovociti. È importante informare i donatori di gameti di sesso maschile e femminile che il loro DNA sarà trasmesso a eventuali figli futuri. Pertanto, donare gameti potrebbe avere un impatto sul donatore, sul suo partner e sulla sua famiglia, inclusi i loro futuri figli e discendenti. Sebbene il donatore possa

essere sconosciuto al ricevente, in alcuni Paesi è possibile che, su richiesta, l'identità del donatore venga rivelata al bambino. Pertanto, è anche importante, se applicabile, affrontare la possibilità di contatto tra i futuri figli nati dalla donazione e i loro donatori di gameti e assicurarsi che le normative esistenti sul futuro contatto siano chiaramente descritte nel consenso alla donazione.

Per quanto riguarda le donatrici femminili, il rischio di OHSS (sindrome da iperstimolazione ovarica), sanguinamento, infezione e torsione ovarica dovrebbe essere ridotto al minimo, come dovrebbe esserlo per tutte le donne sottoposte a PMA. Per quanto riguarda il numero di donazioni effettuabili da ognuno dei donatori, sia di sesso maschile che femminile, questo può essere determinato da diversi fattori, come il numero di figli e/o famiglie ottenute con i gameti del donatore, i rischi medici e psicologici per il donatore e la legislazione pertinente nel Paese della donazione. Preferibilmente, qualsiasi donazione di gameti da parte di donatori non partner dovrebbe essere limitata a un unico istituto dei tessuti; tale restrizione consente di controllare il numero di donazioni e il numero di riceventi (a volte determinato dalla legislazione nazionale). Dovrebbe essere incoraggiata l'implementazione di registri nazionali per donatori di gameti/embrioni e anche per i riceventi.

29.5. Valutazione del donatore

Lo scopo dei test sui donatori di gameti è quello di prevenire la trasmissione di gravi malattie infettive e genetiche dal donatore al ricevente e alla loro prole, e di proteggere il personale durante la manipolazione e dei gameti.

Le modalità di test sui donatori di gameti sono discusse separatamente, per ogni tipo di donazione:

- a. Donazione da partner
- b. Donazione da non partner.

In caso di donazione di cellule riproduttive fra partner che condividono una relazione fisica intima (come la donazione fra partner), è giustificata una minore rigidità dei test biologici.

29.5.1. Test nella donazione fra partner

I seguenti test devono essere effettuati:

- a. anti-HIV-1 e anti-HIV-2;
- b. HBsAg (antigene di HBV di superficie) e anti-HBc (antigene "core" dell'HBV);
- c. anti-HC.

Oltre a questi test, gli istituti dei tessuti dovrebbero effettuare, in base all'analisi dei rischi o a legislazioni nazionali o raccomandazioni più rigide, anche ulteriori test:

- a. sifilide (può essere utilizzato un test specifico per i treponemi o un test non specifico per i treponemi);
- b. test per il virus linfotropico delle cellule T umane (HTLV-1) per i donatori che vivono o provengono da aree ad alta prevalenza o che hanno partner sessuali originari di tali aree, o se i genitori del donatore provengono da tali aree;
- c. in determinate circostanze, potrebbero essere richiesti ulteriori test in base alla storia di viaggi/esposizione del donatore e alle caratteristiche del tessuto o delle cellule donate, ad esempio RhD (antigene D), test diagnostici per malaria, virus Zika, citomegalovirus, clamidia e *Trypanosoma cruzi* (agente infettivo della malattia di Chagas). Allo stesso modo, potrebbero essere eseguiti test specifici se il prelievo avviene in periodi in cui l'incidenza/prevalenza di determinate malattie infettive è elevata.

Il prelievo di campioni di sangue per i test sierologici deve avvenire prima della prima donazione. Nei Paesi membri dell'Unione Europea (UE), ciò deve essere fatto ≤ 3 mesi prima della prima donazione. Per ulteriori donazioni da parte del partner, devono essere ottenuti ulteriori campioni di sangue secondo la legislazione nazionale, ma ≤ 24 mesi dal campionamento precedente.

I risultati positivi dei test sierologici non escludono la donazione tra partner. Tuttavia, è necessario implementare procedure solide per prevenire il rischio di contaminazione al partner o al personale, nonché la contaminazione incrociata. Se i risultati dei test per HIV-1 e -2, HBV o HCV sono positivi o se il donatore è noto come fonte di rischio di infezione, è necessario attuare un sistema di gestione e stoccaggio separato. In caso di test sierologici positivi, la donazione tra partner dovrebbe essere effettuata dopo una consulenza con uno specialista in infezioni virali.

Se il TE può dimostrare che il rischio di contaminazione incrociata e l'esposizione al personale sono stati affrontati attraverso processi validati, potrebbe non essere necessario effettuare test biologici nel caso di sperma processato per l'TUI (inseminazione intrauterina) e non destinato alla conservazione.

29.5.2. Test nella donazione non partner

I seguenti test sierologici devono essere effettuati per una singola donazione:

- a. anti-HIV-1 e anti-HIV-2;
- b. HBsAg e anti-HBc;
- c. anti-HCV;
- d. sifilide (può essere utilizzato un test specifico per i treponemi o un test non specifico per i treponemi);
- e. i donatori di sperma devono anche essere testati negativi per la *Chlamydia trachomatis*. Nell'UE, ciò deve essere fatto tramite un campione di urina mediante un test di acido nucleico (NAT).

In alcuni casi, potrebbero essere richiesti ulteriori test:

- f. se richiesto, come dalle legislazioni nazionali più rigorose (di alcuni Paesi), è obbligatorio il test per HTLV-1/2;
- g. il test per gli anticorpi anti-HTLV-1 deve essere effettuato nei donatori che vivono o provengono da aree ad alta prevalenza o che hanno partner sessuali originari di tali aree, o se i genitori del donatore provengono da tali aree;
- h. potrebbero essere richiesti ulteriori test in determinate circostanze, in base alla storia di viaggi/esposizione del donatore e alle caratteristiche del tessuto o delle cellule donate, ad esempio RhD - antigene D, test diagnostici per malaria, anticorpi per il citomegalovirus, anticorpi per *Trypanosoma cruzi*, infezione da virus Zika. Le ultime informazioni epidemiologiche possono essere trovate presso il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (www.ecdc.europa.eu/en).

Tutti i campioni sierologici devono essere ottenuti al momento della donazione. Le donazioni di sperma devono essere messe in quarantena per ≥ 180 giorni dall'ultima raccolta, dopo di che è necessario ripetere i test. Se, ad ogni donazione, i test sierologici vengono combinati con il NAT per HIV, HBV e HCV, la quarantena non è necessaria a meno che non siano richiesti ulteriori test come menzionato nei punti f, g, h sopra.

Poiché la donazione di sperma può avvenire anche regolarmente ogni settimana o più volte a settimana per un periodo coerente più lungo, sono stati proposti protocolli alternativi di screening periodico [12] e descritti nel rapporto tecnico dell'ECDC sui test di laboratorio dei donatori di sperma non partner [13]. Come in ogni procedura di screening, è necessario trovare un equilibrio tra i potenziali benefici e i danni

di un determinato algoritmo di screening per il donatore, tenendo conto anche del costo dello screening.

Per le donatrici di ovociti, devono essere effettuati gli stessi test sierologici. Per la donazione di ovociti, il momento della donazione potrebbe essere considerato come la data di inizio della stimolazione. Per l'uso sicuro di ovociti freschi, è necessario effettuare ulteriori test NAT al momento della donazione. È auspicabile avere i risultati prima dell'inseminazione.

29.6. Approvvigionamento

Minimizzare i rischi di contaminazione durante le attività di approvvigionamento (vedi Capitolo 7) e di processazione (vedi Capitolo 9) è cruciale per garantire la sicurezza di gameti ed embrioni. I rischi sono spesso multifattoriali e, per contribuire a quantificarli e mapparli, è stato sviluppato un capitolo dedicato (Capitolo 3) oltre al *Microbiological Risk of Contamination Assessment* (MiRCA), uno strumento appositamente elaborato dall'EDQM. Utilizzando questo strumento, gli istituti dei tessuti possono comprendere meglio il rischio complessivo dei loro protocolli e come i fattori di rischio si distribuiscono lungo le fasi di approvvigionamento dei tessuti/cellule, dalla raccolta alla distribuzione, e attuare le misure di mitigazione/riduzione del rischio più efficienti, se necessario.

29.6.1. Sperma

29.6.1.1. Raccolta mediante masturbazione

Il seme viene solitamente ottenuto attraverso la stimolazione manuale o la stimolazione vibratoria del pene, oppure in casi rari attraverso il rapporto sessuale utilizzando un preservativo appositamente progettato privo di sostanze spermicide. Ai pazienti dovrebbero essere fornite chiare istruzioni riguardo alla raccolta del campione di sperma (igiene, astinenza sessuale, tempistica, ecc.).

Dopo un'accurata pulizia delle mani e dell'area genitale, il seme viene raccolto in un contenitore sterile. Le circostanze in cui viene raccolto un campione di seme e consegnato in laboratorio possono influenzare i risultati delle analisi del seme. Poiché il tempo in cui gli spermatozoi rimangono a contatto con il plasma seminale può influenzare la loro sopravvivenza, motilità e capacità fecondante, l'inizio degli interventi diagnostici/terapeutici deve essere standardizzato. Se il campione può essere raccolto in una stanza apposita adiacente al laboratorio, il rischio di ritardi durante il trasporto e il raffreddamento del campione viene praticamente eliminato. Questa

situazione richiede un'appropriata progettazione e attrezzatura del laboratorio e della stanza per la raccolta del seme. Tuttavia, per quanto riguarda la contaminazione durante la raccolta del seme, considerando la breve durata di esposizione all'ambiente e la riduzione del carico microbico con metodi convalidati durante la processazione, il rischio di contaminazione è molto basso e quindi non sono richieste rigide misure ambientali. Se necessario, il campione di seme può essere raccolto anche a casa, a condizione che il paziente sia ben informato su come trasportare il campione in laboratorio. In generale, si chiede ai pazienti di raccogliere un campione di seme dopo 2-7 giorni di astinenza dall'eiaculazione [11].

Sia un periodo di astinenza troppo lungo che troppo breve possono influenzare la qualità del campione.

I campioni di seme devono essere raccolti in contenitori sterili di plastica precedentemente sottoposti a test per valutarne la tossicità per gli spermatozoi. Si deve evitare l'uso di preservativi, creme o lubrificanti spermicidi. Il contenitore deve essere chiaramente etichettato e la corretta identificazione deve essere confermata dal paziente. Dopo la raccolta, il campione deve essere consegnato in laboratorio il prima possibile, evitando temperature estreme (< 20 °C e > 37 °C). L'analisi deve iniziare entro un'ora dalla raccolta.

Per garantire la tracciabilità dei campioni destinati al trattamento, i dati relativi al tipo di contenitore utilizzato, all'orario di raccolta e all'intervallo di tempo tra la raccolta e l'analisi/preparazione devono essere conservati. Inoltre, deve essere documentato l'uso di farmaci, la presenza di febbre nei mesi precedenti e il completamento della raccolta dell'eiaculato.

29.6.1.2. Sperma raccolto chirurgicamente

Nei pazienti diagnosticati con azoospermia non ostruttiva o ostruttiva, lo sperma può essere recuperato mediante intervento chirurgico dal testicolo o dall'epididimo in sala operatoria. Il metodo utilizzato dipende dalla natura della causa. Questo metodo può essere utilizzato anche per i pazienti che non possono produrre un'eiaculazione mediante masturbazione.

29.6.1.2.1. Raccolta dello sperma dall'epididimo

L'aspirazione percutanea di spermatozoi dall'epididimo (PESA) è un metodo per la raccolta di spermatozoi nel caso in cui i vasi deferenti siano ostruiti. Coinvolge l'utilizzo di un ago sterile per aspirare gli spermatozoi dall'epididimo senza un'incisione chirurgica. Gli spermatozoi possono

anche essere prelevati dall'epididimo mediante aspirazione microchirurgica degli spermatozoi.

29.6.1.2.2. Raccolta dello sperma dai testicoli

Un'alternativa alla raccolta dello sperma dall'epididimo è la raccolta dello sperma dal testicolo. Questa può essere effettuata tramite estrazione testicolare (TESE o micro TESE), e eventualmente mediante rimozione di tessuto (biopsia testicolare), e potrebbe essere accompagnata da uno studio istopatologico per la diagnosi. La TESE può essere effettuata anche tramite un approccio percutaneo - aspirazione testicolare (TESA) - utilizzando un ago fine sterile o un ago da biopsia. Si tratta di una procedura meno invasiva ma che, di solito, produce meno materiale rispetto alla TESE.

29.6.1.3. Eiaculazione retrograda

Nei casi di eiaculazione retrograda, lo sperma finisce nella vescica urinaria dopo l'eiaculazione. In questi casi, lo sperma può essere raccolto dalle urine dopo la minzione, dove il pH delle urine è stato aumentato mediante l'assunzione orale di bicarbonati alcalini o tramite cateterizzazione urinaria. Se questo metodo produce spermatozoi di qualità molto bassa, le biopsie epididimali o testicolari potrebbero essere una migliore opzione per questi pazienti.

29.6.1.4. Raccolta mediante elettro eiaculazione

In alcuni pazienti (ad esempio, in caso di lesioni al midollo spinale, interventi chirurgici pelvici, sclerosi multipla, diabete mellito con coinvolgimento nervoso, aneiaculazione inesplicabile), l'eiaculazione mediante masturbazione non è possibile. In questi casi, l'eiaculazione può essere stimolata utilizzando una sonda rettale con elettrodi. Questa stimolazione a bassa tensione è di solito sufficiente per produrre un'eiaculazione di liquido seminale. Tuttavia, la qualità del liquido seminale spesso non è buona come quella ottenuta mediante masturbazione. Anche in questo caso, le biopsie epididimali o testicolari potrebbero rappresentare una migliore opzione.

29.6.2. Ovociti

Prima della raccolta degli ovociti dalle ovaie, nota anche come prelievo degli ovociti, alla paziente verrà somministrato un trattamento ormonale per stimolare la crescita e la maturazione dei follicoli ovarici e degli ovociti associati (noto come iperstimolazione ovarica controllata o COH). Durante il trattamento, la paziente viene monitorata attentamente per seguire la risposta al trattamento ormonale e valutare

il rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS).

Gli ovociti vengono prelevati attraverso la puntura ovarica guidata da ecografia transvaginale e l'aspirazione del liquido follicolare. La procedura può essere eseguita sotto anestesia locale (blocco paracervicale), sedazione o anestesia generale [14].

29.7. Processazione

La seguente sezione si basa principalmente sulle *Revised guidelines for good practice in IVF laboratories* dell'ESHRE [15]. Queste linee guida sono state redatte dal Gruppo di Interesse Speciale (SIG) di Embriologia e costituiscono i requisiti minimi per qualsiasi laboratorio che esegue procedure di procreazione medicalmente assistita (PMA).

Nella selezione di una specifica di qualità dell'aria appropriata per il trattamento di gameti ed embrioni, in conformità alle loro caratteristiche speciali, devono essere presi in considerazione i criteri e gli strumenti identificati nel Capitolo 3 (come lo strumento MiRCA), nel Capitolo 7 e nel Capitolo 9.

Secondo la Direttiva UE sui tessuti e le cellule, la processazione dei tessuti e delle cellule deve essere effettuata in un ambiente di lavorazione conforme alle buone pratiche di lavorazione (GMP) di grado A, con un background di almeno grado D di GMP. Tuttavia, se è dannoso o non fattibile eseguire una specifica procedura in un ambiente di grado A, o se viene applicato un processo di inattivazione microbica convalidato, un ambiente meno rigoroso potrebbe essere accettabile. In tal caso, un ambiente specifico deve essere selezionato ed è necessario dimostrare e documentare che l'ambiente scelto raggiunga la qualità e la sicurezza richieste.

29.7.1. Premesse per la processazione di gameti ed embrioni

29.7.1.1. Progettazione del laboratorio

Al laboratorio per la manipolazione di gameti ed embrioni deve essere dedicata una quantità di spazio adeguata. Inoltre, dovrebbe essere collocato il più vicino possibile alla sala operatoria in cui vengono eseguite le procedure cliniche. La costruzione del laboratorio deve garantire una manipolazione asettica e ottimale di gameti ed embrioni durante tutte le fasi del trattamento. Per raggiungere questo obiettivo, si dovrebbe considerare l'utilizzo di filtri ad alta efficienza per le particelle e i composti organici volatili presenti nell'aria fornita al laboratorio ai locali in cui vengono effettuate le procedure cliniche [16]. Inoltre, è necessario adottare una serie di misure di pro-

tezione per ridurre al minimo il rischio di contaminazione, come indicato nel Capitolo 3 e nel Capitolo 9.

29.7.1.2. *Attrezzatura del laboratorio*

Tutte le apparecchiature critiche devono essere qualificate come idonee al loro scopo e, se applicabile, le loro prestazioni devono essere verificate tramite strumenti calibrati. Se l'apparecchiatura è destinata ad essere utilizzata, da sola o in combinazione, per uno scopo specificato nella definizione di "dispositivo medico", nell'UE deve soddisfare il regolamento sui dispositivi medici (UE 2017/745) e/o le normative nazionali.

Il laboratorio deve essere dotato di tutte le apparecchiature essenziali/critiche necessarie per la FIV, chiaramente identificate e in numero appropriato al carico di lavoro. Gli incubatori in cui vengono coltivati gameti ed embrioni devono essere organizzati in modo da agevolarne l'identificazione. Il numero di incubatori è fondamentale e dovrebbe essere basato sul numero di cicli e sulla durata della coltura degli embrioni. Gameti ed embrioni devono essere distribuiti in modo adeguato tra gli incubatori per ridurre al minimo le aperture delle porte e mantenere condizioni di coltura stabili.

I dispositivi per il mantenimento di una temperatura costante durante la manipolazione di gameti ed embrioni al di fuori degli incubatori devono essere disponibili (ad esempio, piastre riscaldanti, blocchi riscaldanti). Devono essere effettuati controlli regolari o monitoraggio continuo dei parametri critici come temperatura, pH correlato ai livelli di CO₂ e O₂.

Dovrebbe essere disponibile un numero sufficiente di unità di criopreservazione, che vengono monitorate continuamente e dotate di sistemi di allarme che rilevano eventuali variazioni di temperatura fuori range e/o livelli di azoto liquido (LN₂) fuori range.

29.7.2. **Processazione di gameti ed embrioni**

Come indicato nel Capitolo 2, dovrebbero essere sviluppate e mantenute POS approvate per tutte le attività che influenzano la qualità o la sicurezza di tessuti e cellule, comprese le POS per la processazione di gameti ed embrioni.

La processazione di materiale biologico deve essere eseguita in cappe a flusso laminare (ambiente di Classe A, se possibile) e queste dovrebbero essere dotate di piastre riscaldanti e blocchi riscaldanti preriscaldati, utilizzando tecniche a sette in ogni momento. Alcuni processi, come ICSI e la biopsia embrionale, possono essere eseguiti al di fuori della

cappe a flusso laminare in quanto richiedono l'uso di un microscopio invertito. Le cappe di Classe II dovrebbero essere utilizzate per campioni documentati come contaminati (ad esempio, HIV, HCV) poiché forniscono protezione all'operatore.

Devono essere adottate misure per garantire che ovociti ed embrioni siano sempre mantenuti alla temperatura, pH e osmolarità appropriati durante la coltura e la manipolazione. L'esposizione a sostanze volatili o tossiche o a radiazioni nocive dovrebbe essere ridotta al minimo.

I dispositivi di pipettaggio devono essere utilizzati solo per un tipo di procedura e non devono mai essere utilizzati per più di un paziente. Se possibile, si preferiscono pipette monouso sterili in unità di dosaggio. Ogni campione deve essere manipolato singolarmente e il suo trattamento deve essere completato prima di passare al campione successivo al fine di prevenire la contaminazione incrociata o il mix-up dei campioni (vedi §29.13 sulla biovigilanza).

29.7.2.1. *Processazione degli ovociti*

Il prelievo degli ovociti è una procedura particolarmente delicata durante la quale deve essere prestata particolare attenzione alla temperatura, al pH e alla manipolazione efficiente e rapida [15]. È obbligatorio effettuare un controllo dell'identità della paziente prima del prelievo degli ovociti. Il tempo tra il prelievo degli ovociti e la coltura dovrebbe essere minimo. Si dovrebbe evitare una prolungata esposizione degli ovociti al liquido follicolare. Devono essere disponibili apparecchiature adeguate per mantenere gli ovociti ad una temperatura il più vicino possibile a 37 °C. Il mezzo di lavaggio, i tubi di raccolta e le piastre dovrebbero essere preriscaldati. Gli aspirati follicolari dovrebbero essere esaminati per verificare la presenza di ovociti utilizzando uno stereomicroscopio dotato di una piattaforma riscaldata, di solito con ingrandimenti di 8-60x. Si dovrebbe ridurre al minimo l'esposizione degli ovociti a luce ad alta energia. Il momento del prelievo, il numero di ovociti prelevati e l'identità dell'operatore dovrebbero essere documentati.

29.7.2.2. *Processazione dello sperma*

Un test di preparazione pre-clinica dello sperma potrebbe essere consigliabile al fine di proporre la tecnica di inseminazione più adatta; dovrebbe essere richiesto un campione di riserva congelato se si prevede difficoltà nella raccolta dello sperma il giorno del recupero degli ovociti. Prima di avviare il processo di manipolazione dello sperma, è obbligatoria una verifica dell'identità del paziente. In

caso di sperma eiaculato, la preparazione del campione mira a:

- eliminare il plasma seminale, i detriti e i contaminanti;
- concentrare gli spermatozoi progressivamente mobili;
- selezionare, evitando gli spermatozoi morfologicamente anomali e immobili.

Il giorno del recupero degli ovociti, dovrebbe essere scelta un'appropriata tecnica di preparazione dello sperma, in base alle caratteristiche e all'origine dei campioni individuali. La tecnica dello *swim-up* e la centrifugazione a gradiente di densità discontinuo sono le più utilizzate e ampiamente accettate.

Nel caso di azoospermia il giorno del recupero degli ovociti, dovrebbe essere richiesto un secondo campione di sperma prima di valutare procedure alternative di recupero dello sperma o la crio-preservation degli ovociti.

Per lo sperma recuperato chirurgicamente, sono disponibili diverse tecniche per massimizzare il recupero dello sperma e selezionare gli spermatozoi vitali tra le cellule testicolari immobili [17]. In caso di recupero epididimale, il liquido aspirato viene generalmente processato tramite *swim-up* o la centrifugazione a gradiente di densità discontinuo, a seconda del numero di spermatozoi. Per lo sperma testicolare, possono essere utilizzate procedure meccaniche per estrarre lo sperma dal tessuto che possono essere combinate con un trattamento enzimatico (ad esempio, con collagene) al fine di favorire il rilascio dello sperma dal tessuto e aumentare i tassi di recupero [11].

29.7.2.2.1. Trattamenti specifici

Sebbene meno frequentemente utilizzati, gli inibitori della fosfodiesterasi (pentoxifillina, teofillina) o il test di gonfiore ipo-osmotico vengono talvolta utilizzati in assenza di spermatozoi mobili.

29.7.3. Inseminazione degli ovociti

Gli ovociti possono essere inseminati tramite la fecondazione *in vitro* convenzionale o tramite ICSI. Il momento dell'inseminazione/iniezione dovrebbe essere deciso in base al numero di ore trascorse dall'induzione dell'ovulazione e/o dal recupero degli ovociti, tenendo presente che la fecondazione dovrà essere verificata 16-18 ore dopo.

29.7.3.1. Fecondazione *in vitro* convenzionale (FIV)

Il numero di spermatozoi progressivamente mobili utilizzati per l'inseminazione deve essere sufficiente per ottimizzare la possibilità di una fecondazione normale. Tipicamente, si utilizza una concentrazione di spermatozoi progressivamente mobili nel piatto di fecondazione compresa tra 0,1 e $0,5 \times 10^6/\text{mL}$ per ovocita.

La sospensione finale dello sperma dovrebbe essere preparata nel volume più piccolo possibile utilizzando un mezzo compatibile con la coltura degli ovociti.

La co-incubazione dei complessi cumulo-ovociti e dello sperma di solito viene effettuata durante la notte, anche se un periodo più breve potrebbe essere sufficiente.

29.7.3.2. Procedura di iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)

29.7.3.2.1. Preparazione dell'ovocita per l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo

Nel rimuovere le cellule del cumulo dagli ovociti, la concentrazione e l'esposizione dell'ialuronidasi dovrebbero essere ridotte al minimo. Al fine di prevenire danni agli ovociti, dovrebbero essere utilizzate pipette con un adeguato diametro del lume e si dovrebbe evitare di pipettare vigorosamente. Dopo la denudazione, gli ovociti dovrebbero essere accuratamente lavati per rimuovere eventuali tracce di ialuronidasi. Lo stadio di maturazione degli ovociti dovrebbe essere registrato.

Figura 29.2. Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo

Fonte: Immagine fornita da Thomas Ebner (Austria).



29.7.3.2.2. Procedura di iniezione

Vedere Figura 29.2. Si consiglia di registrare l'orario dell'iniezione (inizio e fine della procedura) e l'operatore che la esegue. La durata dell'identificazione dello spermatozoo e dell'immobilizzazione seguita dall'iniezione dovrebbe essere ridotta al minimo. Al fine di ridurre al minimo il tempo fuori dall'incubatore, il numero di ovociti trasferiti nel piatto di iniezione dovrebbe essere correlato alle competenze dell'operatore e alla qualità dello sperma. Durante l'iniezione, è necessario mantenere una temperatura e un pH adeguati. Sostanze viscosi come la polivinilpirrolidone (PVP) o alternative a base di acido ialuronico possono essere utilizzate per facilitare la manipolazione dello sperma. Nel caso in cui siano presenti solo spermatozoi immobili, può essere utilizzato un test di vitalità non invasivo per selezionare gli spermatozoi vitali da iniettare. Dovrebbero essere iniettati solo ovociti maturi in metafase II.

29.7.4. Valutazione di fecondazione

Tutti gli ovociti inseminati o iniettati dovrebbero essere esaminati per la presenza di pronuclei (PN) e corpi polari a 16-18 ore dopo l'inseminazione. Un ovocita fecondato normalmente (zigote) contiene 2 PN e 2 corpi polari (Figura 29.3). Per la fecondazione *in vitro* convenzionale, le cellule del cumulo devono essere rimosse e gli ovociti con 2 PN trasferiti in nuovi piatti contenenti un mezzo di coltura pre-equilibrato.

La valutazione della fecondazione dovrebbe essere eseguita con un elevato ingrandimento (almeno 200x), utilizzando un microscopio invertito dotato di ottiche di tipo Hoffman o equivalenti per consentire la verifica del numero e della morfologia dei pronuclei.

29.7.5. Coltura e trasferimento degli embrioni

Al fine di ottimizzare lo sviluppo degli embrioni, le fluttuazioni delle condizioni di coltura dovrebbero essere ridotte al minimo. Devono essere prese precauzioni per mantenere condizioni adeguate di pH, temperatura e osmolalità al fine di proteggere l'omeostasi degli embrioni durante la coltura e la manipolazione.

La valutazione degli embrioni dovrebbe essere eseguita con un elevato ingrandimento (almeno 200x, preferibilmente 400x) utilizzando un microscopio invertito con ottiche di tipo Hoffman o equivalenti. La valutazione degli embrioni nello stadio di divisione cellulare dovrebbe includere il numero di cellule, la dimensione relativa e la simmetria, la percentuale di

frammentazione, la granulazione, i vacuoli e lo stato nucleare (ad esempio, multinucleazione). La valutazione del blastocisto dovrebbe includere il grado di espansione (associato alla dimensione della cavità blastocistica) e la morfologia delle due linee cellulari, la massa cellulare interna e il trophoctoderma. La valutazione dovrebbe essere eseguita in tempi standardizzati dopo l'inseminazione. Lo sviluppo degli embrioni può anche essere valutato utilizzando l'imaging a intervallo di tempo, consentendo una valutazione dinamica del timing degli eventi consecutivi durante la coltura degli embrioni. Questi sistemi consentono anche condizioni di coltura più stabili che possono essere vantaggiose. Per una panoramica sulla valutazione morfologica degli embrioni e l'annotazione della morfocinetica, si veda [18, 19]. I registri di valutazione della qualità degli embrioni dovrebbero includere l'operatore/i, la data e l'ora della valutazione e le caratteristiche morfologiche degli embrioni, che dovrebbero essere annotate con lo stadio di sviluppo (vedi Figura 29.4 e seguenti).

La selezione degli embrioni per il trasferimento si basa principalmente sullo stadio di sviluppo e gli aspetti morfologici. Altri criteri di esclusione come la morfocinetica anomala e le divisioni irregolari possono essere presi in considerazione [19, 20].

Il trasferimento di un singolo embrione è consigliato per evitare gravidanze multiple. La decisione sul numero di embrioni da trasferire dovrebbe basarsi sulla qualità degli embrioni e lo stadio di sviluppo, l'età della donna, la risposta ovarica e il protocollo di trattamento, oppure il numero può essere determinato dalle normative nazionali. È buona pratica limitare il numero massimo di embrioni nello stadio di divisione cellulare trasferiti a 2 e il numero di embrioni nello stadio di blastocisti trasferiti a 1 in tutte le procedure di trasferimento degli embrioni per limitare il numero di gravidanze multiple.

Gli embrioni supernumerari possono essere crioconservati, donati per la ricerca o al laboratorio per la validazione, o eliminati, in base alla loro qualità, al consenso informato del paziente e alla legislazione nazionale.

Se il laboratorio si trova a una certa distanza dalla sala di trasferimento degli embrioni, devono essere predisposte misure atte a mantenere la temperatura e il pH durante il trasporto degli embrioni.

Prima del trasferimento, è obbligatoria una doppia verifica dell'identità del paziente, dei documenti del paziente e delle piastre di coltura.

29.7.6. Test genetico pre-impianto

Gli ovociti e gli embrioni pre-impianto possono essere sottoposti a biopsia e il materiale genetico ottenuto può essere testato per determinate malattie monogeniche o anomalie cromosomiche. La procedura di biopsia può essere applicata a [21]:

- il primo e il secondo corpo polare;
- i blastomeri degli embrioni al terzo giorno di sviluppo (Figura 29.7);
- il trofoblasto nello stadio di blastocisti (Figura 29.8).

Le cellule destinate all'analisi genetica vengono biopsiate nel laboratorio di FIV utilizzando microstrumenti di vetro su un set di micro-manipolazione. Il laboratorio di embriologia ha la responsabilità di fornire un'identificazione univoca tra i corpi polari, i blastomeri o le cellule del trofoblasto biopsiate e gli ovociti, gli embrioni o le blastocisti corrispondenti, rispettivamente. Tutte le cellule e gli embrioni utilizzati per l'indagine genetica devono essere trattati singolarmente, evitando la contaminazione del DNA da altre cellule, dai campioni o dall'operatore. Devono essere identificati e etichettati con cura e tracciabili durante l'intera procedura. Durante queste fasi, devono essere adottati doppi controlli di identità. Il campione di biopsia dovrebbe essere sottoposto a pro-

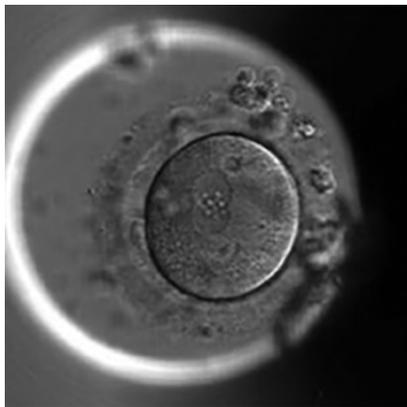
cedure analitiche in un laboratorio accreditato per la genetica medica. La tracciabilità per l'identificazione degli embrioni deve essere garantita anche durante l'analisi nel laboratorio genetico di riferimento.

Lo scopo del PGT-M (per malattie genetiche monogeniche/singolo gene o disturbi mitocondriali) e del PGT-SR (per riarrangiamenti strutturali cromosomici) è identificare gli embrioni generati *in vitro* che portano determinate malattie genetiche ereditarie o anomalie cromosomiche e escludere tali embrioni dal trasferimento [22-23].

Il counseling genetico deve essere a disposizione di tutte le coppie portatrici di una malattia genetica (grave). Il ricevente deve essere informato che a causa del mosaicismo embrionale o delle limitazioni del test, i test genetici sugli embrioni non sostituiscono l'analisi prenatale, come l'amniocentesi.

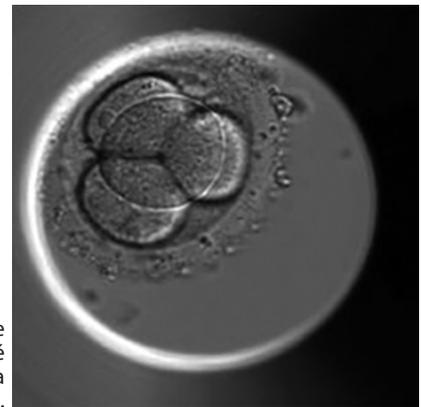
Il PGT-A (test pre-impianto per l'aneuploidia) viene utilizzato per valutare se una biopsia cellulare da un embrione, e per estensione, dall'intero embrione, ha il numero corretto di cromosomi. Tale screening viene utilizzato soprattutto per le donne in età riproduttiva avanzata e per le donne che hanno avuto aborti spontanei ricorrenti o subito fallimenti di impianto. È considerato come un complemento alla selezione morfologica standard degli embrioni per il trasferimento. Per le donne in età riproduttiva

Figura 29.3. Zigote con 2 pronuclei e 2 corpi polari



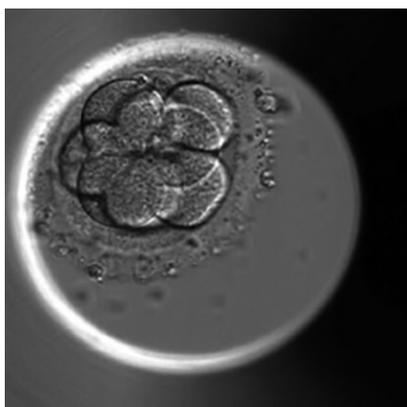
Fonte: Immagine fornita da Maria José De los Santos Molina (Spagna).

Figura 29.4. Embrione a 4-cellule



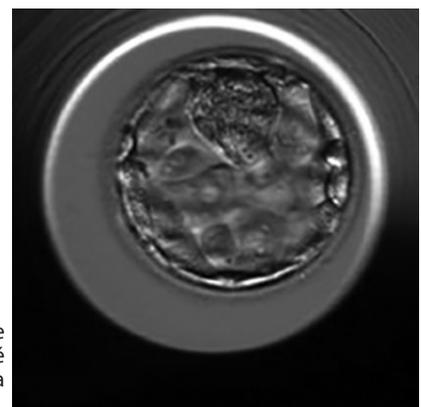
Fonte: Immagine fornita da Maria José De los Santos Molina (Spagna).

Figura 29.5. Embrione a 8-cellule



Fonte: Immagine fornita da Maria José De los Santos Molina (Spagna).

Figura 29.6. Embrione a blastocisti



Fonte: Immagine fornita da Maria José De los Santos Molina (Spagna).

avanzata, la selezione degli embrioni mediante PGT-A può ridurre il numero di trasferimenti embrionali necessari per ottenere una gravidanza, riducendo così il tempo per la gravidanza. Tuttavia, i risultati cumulativi sono simili a quando non viene utilizzato il PGT-A; vedi ad esempio [24]. Tenendo presente la scarsità di dati provenienti da studi clinici prospettici e meta-analisi, il PGT-A dovrebbe essere offerto con cautela e ai pazienti dovrebbero essere fornite informazioni complete sul suo valore attuale [25].

Un altro possibile utilizzo del PGT potrebbe essere ridurre il rischio transgenerazionale di trasmissione di patologie del DNA mitocondriale. Altre applicazioni minori, come la generazione di fratelli istocompatibili per la donazione di cellule/tessuti, possono essere prese in considerazione caso per caso.

In alcuni Paesi, il PGT potrebbe non essere consentito o consentito solo in circostanze specifiche in base alla legislazione nazionale.

29.7.7. Maturazione *in vitro*

La maturazione *in vitro* si riferisce alla maturazione in coltura, in appositi mezzi di coltura, di ovociti immaturi aspirati da follicoli che potrebbero o meno essere stati esposti a gonadotropine esogene prima del recupero degli ovociti [26]. Durante la maturazione *in vitro*, tali ovociti progrediscono dalla fase di profase I (cioè dallo stadio del nucleo germinale - GV) per raggiungere la metafase II (MII). Tuttavia, il raggiungimento del criterio morfologico per MII (rilascio del primo corpo polare) non implica necessariamente che l'ovocita sia capace di uno sviluppo normale.

Tenendo presente la mancanza di dati sufficienti provenienti da studi clinici prospettici e meta-analisi, la maturazione *in vitro* dovrebbe essere considerata una procedura emergente e ai pazienti dovrebbero essere fornite informazioni complete sul suo valore attuale e sulla mancanza di dati a lungo termine sugli esiti.

29.7.8. Processazione dei campioni prelevati a donatori sieropositivi nelle donazioni fra partner

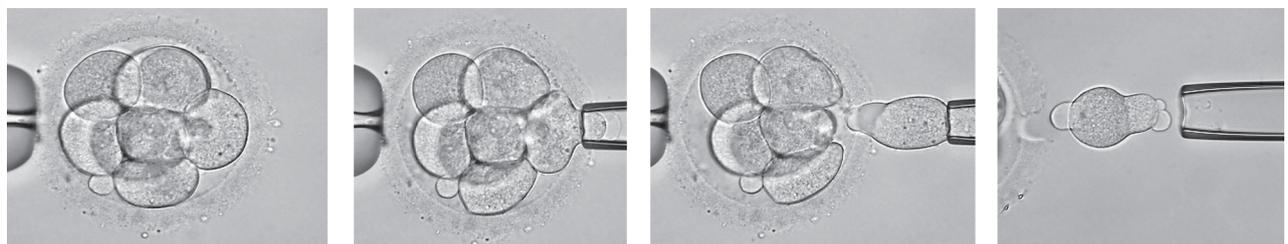
Nei casi di coppie in cui uno o entrambi i partner sono sieropositivi, la procreazione assistita (PMA) può essere comunque effettuata, tenendo conto dei rischi di trasmissione dell'infezione in modo orizzontale o verticale, previa adeguata consulenza e con il consenso informato dei pazienti.

Per le coppie con uomini sieropositivi, il processo comprende la separazione del campione di sperma mediante gradiente di densità e, opzionalmente, il metodo dello "swim-up".

Lelaborazione dei campioni provenienti da donatori sieropositivi deve essere gestita secondo procedure operative standard specifiche per proteggere il personale e evitare la contaminazione incrociata. Ai pazienti sieronegativi per l'epatite B ma con partner sieropositivi dovrebbero venire offerta la vaccinazione prima di sottoporsi al trattamento di procreazione assistita [27].

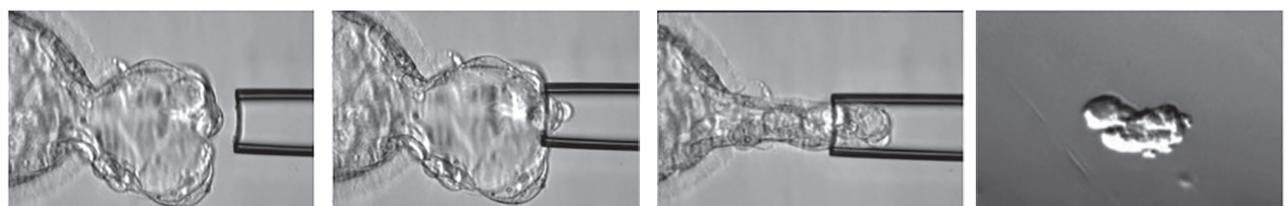
Le pratiche di laboratorio per la qualità e la sicurezza dei trattamenti di procreazione medicalmente assistita per le coppie sierodiscordanti devono essere attuate e dovrebbero includere la protezione

Figura 29.7. Biopsia di un blastomero di un embrione allo stadio a 8 cellule



Fonte: Immagine fornita da María José De los Santos Molina (Spagna).

Figura 29.8. Biopsia del trofoblasto di una blastocisti



Fonte: Immagine fornita da Cristina Magli (Italia).

personale dei pazienti e del personale, protocolli per la riduzione dei rischi di contaminazione incrociata e una corretta decontaminazione dell'area di lavoro [2, 28].

29.8. Criopreservazione

29.8.1. Metodi di criopreservazione di gameti ed embrioni umani

Spermatozoi, ovociti e embrioni possono essere criopreservati per un utilizzo futuro nei trattamenti di PMA (ovociti o embrioni supernumerari, preservazione della fertilità, gameti di donatori non partner per la banca del materiale genetico). Attualmente, i due metodi più utilizzati per la criopreservazione di gameti ed embrioni sono il lento congelamento e la vitrificazione (vedi Capitolo 9).

Il congelamento lento è un metodo basato su un graduale decremento programmato della temperatura della soluzione in cui il campione viene criopreservato. Questo di solito coinvolge attrezzature specifiche computerizzate e programmi per il raffreddamento di diversi tipi di tessuti e cellule in soluzioni con sostanze crioprotettive.

La vitrificazione è un metodo di raffreddamento ultra-rapido che si basa su velocità di raffreddamento molto elevate (da 4.000 a 6.000 °C/s fino a >10.000 °C/s, a seconda del volume e del dispositivo utilizzato) della soluzione in cui il campione viene criopreservato, in assenza di formazione di cristalli di ghiaccio. Questo è un metodo veloce che non richiede attrezzature di raffreddamento speciali (sebbene siano necessari materiali consumabili speciali) e viene eseguito con l'aggiunta di crioprotettori a concentrazioni più elevate (rispetto al lento congelamento) per tempi di esposizione più brevi.

Esistono differenze significative nella sensibilità di diversi tipi di gameti maschili e femminili e embrioni in diverse fasi dello sviluppo alle basse temperature e agli agenti crioprotettivi [29, 30, 31, 32].

Sorgono preoccupazioni sulla sicurezza e sulla qualità dei gameti umani e degli embrioni criopreservati, in particolare riguardo ad eventuali danni cellulari (disgregazione dei fusoli meiotici, rottura delle membrane), agli effetti tossici dei crioprotettori, ai danni osmotici e alla disidratazione incompleta, che hanno un effetto sulla vitalità delle cellule [33]. Tuttavia, nel complesso, i dati di laboratorio e clinici convergono verso l'idea che la criopreservazione di gameti ed embrioni sia una procedura sicura [34].

29.8.1.1. Criopreservazione dello sperma

Per lo sperma, il congelamento lento è ancora il metodo d'elezione, ma il raffreddamento rapido è un'alternativa possibile [29]. Il congelamento/scongelo dello sperma umano è una tecnologia ben collaudata. I campioni di sperma vengono di solito criopreservati in soluzioni crioprotettive a base di glicerolo, in criotubi o cannuce e congelati in un dispositivo di congelamento cellulare programmato. In alternativa, possono essere raffreddati a 4 °C, temporaneamente conservati nel vapore di azoto liquido e infine immersi nell'azoto liquido.

Prima del congelamento, il plasma seminale e gli spermatozoi immobili e danneggiati possono essere rimossi (mediante un processo di processazione dello sperma) per selezionare una popolazione di spermatozoi con maggiori possibilità di sopravvivenza. È consigliabile elaborare i campioni di biopsia testicolare prima del congelamento.

29.8.1.2. Criopreservazione degli ovociti

Negli ultimi anni, sono stati segnalati in tutto il mondo successi nella criopreservazione di ovociti umani MII, con tassi di riuscita in rapido aumento grazie all'ottimizzazione dei protocolli. Questi dati suggeriscono fortemente che la vitrificazione può essere il metodo preferito nella criopreservazione degli ovociti, poiché sono stati ottenuti tassi migliorati di sopravvivenza, impianto e gravidanza utilizzando questo metodo rispetto al lento congelamento [30, 31, 32].

29.8.1.3. Criopreservazione degli embrioni

Zigoti, embrioni, morule e blastocisti sono stati criopreservati con successo e utilizzati successivamente per il "trasferimento di embrioni congelati". Possono essere utilizzate sia il congelamento lento che la vitrificazione, con la vitrificazione/scongelo in crioprotettori a base di dimetilsolfossido che produce tassi di sopravvivenza migliori; vedi ad esempio [32]. Il tempo di esposizione al crioprotettore prima della vitrificazione è cruciale e le istruzioni del produttore devono essere rigorosamente rispettate.

29.9. Stoccaggio

Per quanto riguarda le sale ciobiologiche, i principali aspetti da considerare sono la posizione, la ventilazione e i materiali di costruzione.

Da un punto di vista pratico, la sala criobiologica con i serbatoi di azoto liquido dovrebbe essere situata vicino al laboratorio, in modo che i gameti o gli embrioni crioconservati possano essere trasferiti con facilità, rapito e successo nella sala criobio-

logica e nei serbatoi di azoto liquido. Se i gameti o gli embrioni crioconservati devono essere trasportati prima di essere conservati, è necessario l'adeguato mantenimento della temperatura corretta.

Si consiglia di dotarsi di un sistema di ventilazione forzata che possa essere attivato automaticamente quando viene rilevata una bassa percentuale di ossigeno.

Il tipo di materiali di costruzione dovrebbe essere simile a quelli utilizzati nelle strutture di approvvigionamento e di processazione, con superfici lisce e facili da pulire. Una particolare considerazione nella scelta dei materiali di costruzione è che il pavimento dovrebbe resistere a grandi variazioni di temperatura causate da fuoriuscite di azoto liquido.

29.9.1. Limiti di stoccaggio

Non esistono prove scientifiche che gameti, embrioni e tessuti gonadici, se conservati in adeguate condizioni di stoccaggio, si deteriorino dopo un certo periodo di stoccaggio; pertanto, possono essere conservati per lunghi periodi di tempo. L'uso di sperma congelato attraverso tecniche di riproduzione assistita ha portato alla nascita di prole sana più di 20 anni dopo l'inizio della conservazione [35], e vi sono anche pubblicazioni che trattano di ovociti ed embrioni conservati con successo per lunghi periodi [36, 37]. Tuttavia, a intervalli definiti nel tempo, è necessario contattare i pazienti per determinare il destino del loro materiale criopreservato. In alcuni Paesi dell'Unione Europea, le leggi nazionali stabiliscono un periodo massimo di conservazione legale. I pazienti devono dichiarare per iscritto il destino del loro materiale riproduttivo quando questo periodo massimo di conservazione sarà terminato (vedi anche §29.3.2 sul consenso del donatore).

Si raccomanda un controllo periodico dei tank di crioconservazione, che includa il raffronto tra il contenuto e i registri di stoccaggio.

29.9.2. Temperatura di stoccaggio

La temperatura di stoccaggio ottimale è basata sul tipo di tessuto, il crioprotettore e il metodo di congelamento utilizzato. Tuttavia, una temperatura inferiore a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ per tessuti gonadici, embrioni e gameti è appropriata, mentre una temperatura superiore a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ è dannosa per la sopravvivenza e la qualità del materiale criopreservato. Anche se lo stoccaggio nella fase liquida dell'azoto o nella fase di vapore che si forma sopra di esso è pratica comune e garantisce temperature uniformi, è importante garantire che la temperatura critica minima sia mantenuta anche

durante la processazione dei campioni conservati ($< -140\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dovrebbe essere prestata particolare attenzione ai cambiamenti di temperatura durante la manipolazione del materiale vitrificato conservato nel vapore di azoto liquido.

29.9.3. Dispositivi di stoccaggio

Sono diversi i dispositivi che possono essere utilizzati per conservare il materiale riproduttivo. Lo sperma può essere conservato in cannuce o fiale, mentre il tessuto gonadico è conservato principalmente in fiale. Gli ovociti e gli embrioni sono conservati in cannuce, ognuna delle quali può contenere uno o più ovociti/embrioni. Tuttavia, è considerata più efficace la pratica di conservare un solo embrione per supporto per favorire il trasferimento di un singolo embrione congelato e mantenere la tracciabilità tra la qualità dell'ovocita o lo sviluppo dell'embrione congelato.

Nel caso dell'uso di supporti per la conservazione (e in particolare per la conservazione degli ovociti), possono essere utilizzati sistemi aperti o chiusi. L'uso di sistemi di conservazione aperti implica il contatto diretto delle cellule con l'azoto liquido, ad un certo punto della processazione dei tessuti e cellule riproduttive. In un sistema chiuso, non c'è contatto diretto tra le cellule e l'azoto liquido.

29.9.4. Contaminazione incrociata durante lo stoccaggio

L'introduzione di contaminanti nel recipiente di conservazione è dovuta alle manipolazioni umane durante la processazione. Gli agenti virali e microbici possono sopravvivere per lunghi periodi di tempo nell'azoto liquido. Tuttavia, nessun rapporto ha mostrato contaminazione incrociata tra questi patogeni derivati dall'ambiente e il materiale riproduttivo conservato. Inoltre, la conservazione di materiale riproduttivo proveniente da pazienti portatori di malattie infettive nell'azoto liquido non ha causato contaminazioni incrociate con altro materiale riproduttivo congelato presente nello stesso recipiente [38, 39]. Nonostante l'assenza di prove, dovrebbe essere considerata una buona pratica di laboratorio, quella di conservare separatamente il materiale riproduttivo dei pazienti con sierologia positiva e negativa. I contenitori di conservazione a fase di vapore sono stati proposti come alternativa ai contenitori di azoto liquido. Si raccomanda lo scongelamento e la pulizia periodica dei contenitori di conservazione per prolungare la vita del recipiente, così come la decontaminazione periodica degli agenti virali e microbici.

29.9.5. Sicurezza dello stoccaggio

La conservazione in tank di azoto liquido o in vapori di azoto è sicuramente la metodologia più comune utilizzata per conservare gameti, embrioni e tessuti gonadici. La crioconservazione e lo scongelamento del materiale sono processi quotidiani in una Centro PMA. Pertanto, è di fondamentale importanza che il personale operante all'interno della sala criobiologica abbia ricevuto una formazione adeguata su come gestire l'azoto liquido e che sia consapevole dei potenziali pericoli. Il personale deve essere dotato di indumenti protettivi specifici (guanti, sovrascarpe criogeniche e occhiali protettivi) e utilizzare pinze speciali per la manipolazione dei dispositivi di congelamento. Tutti gli ambienti delle sale in cui viene utilizzato l'azoto liquido devono essere dotate di sensori di ossigeno per garantire la sicurezza di tutto il personale di laboratorio.

Per le apparecchiature che dipendono dall'elettricità (allarmi, ecc.), la struttura di stoccaggio dovrebbe far parte del piano di emergenza generale della clinica, in modo che in caso di perdita di energia elettrica sia presente un generatore o un sistema di alimentazione ininterrotta (UPS); per ulteriori informazioni, vedere il Capitolo 10 - Conservazione.

29.10. Distribuzione, import/export

Il trasporto di tessuti e cellule all'interno dell'UE è generalmente definito come distribuzione (vedi Capitolo 12). Durante il trasporto di gameti ed embrioni, devono essere adottate misure per garantire la qualità, la sicurezza e la tracciabilità dei tessuti e delle cellule riproduttive. Prima del trasporto, sono necessarie alcune azioni specifiche utilizzando i documenti appropriati:

- a. un accordo di trasporto firmato tra l'ente distributore (o l'ente esportatore se al di fuori dell'UE) e l'ente ricevente (o l'ente importatore se al di fuori dell'UE);
- b. consenso firmato dai pazienti per il trasporto del campione;
- c. quando viene utilizzato un corriere di terze parti per eseguire il trasporto del materiale, l'ente distributore deve avere un contratto o un accordo di livello di servizio (SLA) con il suddetto corriere qualificato;
- d. Altri documenti pertinenti devono includere:
 - i. anamnesi medica (compresa malattie genetiche, storia familiare di malattia e storia delle trasfusioni);
 - ii. un protocollo per la gestione adeguata del campione durante il trasporto, la conservazione, lo

- scongelo (per il lento congelamento) e il riscaldamento (per la vitrificazione);
- iii. un protocollo di accettazione (per il controllo di eventuali danni al contenitore, dei campioni e per l'identificazione del paziente e la presenza di documentazione valida);
- iv. informazioni sull'etichettatura dei campioni; e
- e. In caso di distribuzione di gameti donati, la catena di tracciabilità deve essere costantemente completa. Ciò implica che gli enti distributori e riceventi devono informare tutti gli interessati di eventuali reazioni avverse gravi (SARE) quando vengono utilizzati gameti donati. Le malattie genetiche o multifattoriali nei bambini nati dall'utilizzo dei gameti donati distribuiti devono essere segnalate dall'istituto dei tessuti ricevente e/o SARE nel fascicolo del donatore da parte dell'istituto dei tessuti distributore.

È inoltre necessario considerare e controllare rigorosamente le condizioni durante il trasporto effettivo perché il materiale criopreservato è altamente sensibile a qualsiasi variazione di temperatura. Vedi anche il Capitolo 15 e la sezione 29.9.

Per l'esportazione e l'importazione da Paesi al di fuori dell'UE, sono necessari requisiti diversi; per i dettagli, consultare il Capitolo 12.

29.11. Imballaggio ed etichettatura per le tecniche di riproduzione assistita

Come anticipato nel Capitolo 15, la codifica, l'imballaggio e l'etichettatura di tessuti e cellule hanno un ruolo importante durante le procedure di banking. L'imballaggio si applica solo a gameti e embrioni criopreservati in stoccaggio e trasporto. Gameti e embrioni congelati vengono imballati e conservati in cannuccie o fiale criogenici come descritto nella sezione 29.9.3.

L'etichettatura ha lo scopo di identificare in modo inequivocabile i gameti e gli embrioni. I sistemi di etichettatura e identificazione possono variare tra i centri e i Paesi. Deve essere in atto una procedura che assicuri l'identificazione corretta dei pazienti in tutte le fasi di manipolazione, utilizzando almeno due punti di identificazione (ad esempio, numero di trattamento, codice SEC, codice colore e/o data di nascita) e dovrebbe includere almeno i nomi dei partner (quando pertinente) e la data di processazione. Per i campioni congelati, dovrebbe essere

utilizzato anche un codice colore per i dispositivi criogenici.

Al momento della crioconservazione, la documentazione sul materiale biologico dovrebbe includere l'etichettatura dei dispositivi, il metodo di crioconservazione data e ora della cripreservazione, operatore, qualità dell'embrione e stadio di sviluppo, numero di ovociti o embrioni per dispositivo, numero di dispositivi conservati per paziente, posizione dei campioni conservati (serbatoio, contenitore). I dispositivi criogenici devono essere chiaramente e permanentemente etichettati con un metodo resistente all'azoto liquido con riferimento ai dettagli del paziente, al numero di trattamento e/o a un'identificazione univoca.

Al momento dello scongelamento, la documentazione sul materiale biologico dovrebbe includere il metodo di scongelamento, data e ora dello scongelamento, identità dell'operatore e qualità del campione post-scongelamento.

29.12. Tracciabilità

L'identificazione dei pazienti e la tracciabilità delle loro cellule riproduttive sono aspetti cruciali nei trattamenti di procreazione medicalmente assistita (PMA). Ogni laboratorio di fecondazione *in vitro* (FIV) deve disporre di un sistema efficace e accurato per identificare, tracciare e localizzare in modo univoco le cellule riproduttive durante ciascuna fase procedurale. Un adeguato sistema di identificazione dovrebbe garantire che le principali caratteristiche dei pazienti (o donatori) e dei loro tessuti e cellule, insieme a dati pertinenti relativi a prodotti e materiali a contatto con essi, siano sempre disponibili.

Si raccomanda vivamente una formazione adeguata sulle procedure di tracciabilità per tutto il personale di laboratorio.

Prima di avviare qualsiasi procedura, il laboratorio deve essere fornito dell'identificazione univoca di ciascun paziente, con un riferimento chiaro e semplice alla documentazione del paziente stesso. Ogni ciclo di trattamento deve essere assegnato a un'identificazione univoca.

Le forme di consenso pertinenti, i dati clinici e i dettagli degli esami sierologici effettuati dai pazienti/donatori prima dell'ammissione al trattamento devono essere disponibili al personale di laboratorio.

Devono essere stabilite regole riguardanti l'identificazione corretta e l'elaborazione delle cellule riproduttive mediante un sistema di codici e controlli che prenda in considerazione tutti i seguenti aspetti:

a. È necessaria la verifica diretta dell'identità del paziente e la corrispondenza con la sua identi-

ficazione unica assegnata in ogni fase critica. I pazienti dovrebbero essere invitati a fornire le proprie informazioni identificative (almeno il nome completo e la data di nascita) prima del prelievo o dell'inseminazione assistita/trasferimento embrionale.

- b. L'etichettatura di piastre contenenti gameti ed embrioni deve essere permanente e sul contenitore stesso, non solo sul coperchio rimovibile.
- c. Tutti i dispositivi contenenti materiale biologico devono essere chiaramente e permanentemente etichettati con l'identificazione unica del paziente e del ciclo.
- d. Il materiale biologico proveniente da pazienti diversi non deve essere elaborato nella stessa area di lavoro contemporaneamente.
- e. Gli incubatori e i sistemi di criostoccaggio devono essere organizzati in modo da garantire un facile accesso e identificazione dei materiali biologici al loro interno.
- f. Durante le fasi critiche, la tracciabilità deve essere verificata mediante l'identificazione corretta delle cellule e dei tessuti riproduttivi. Ciò può essere eseguito, ad esempio, mediante il principio dei quattro occhi di verifica (cioè una doppia verifica dell'identificazione da parte di una seconda persona) e/o mediante l'uso di un sistema di identificazione elettronica.
- g. I prodotti e i materiali utilizzati con il materiale biologico devono essere tracciabili. La data e l'ora di ciascuna manipolazione e l'identità di tutti gli operatori e i testimoni devono essere documentati durante tutto il trattamento. Questi registri dovrebbero essere conservati per un periodo di tempo specificato secondo la legislazione europea e/o nazionale.
- h. I gameti e gli embrioni provenienti da donatori non partner richiedono una codifica specifica per quei Paesi regolamentati secondo le direttive della Commissione europea, in particolare la Direttiva 2015/565 che modifica la Direttiva 2006/86/CE (vedi anche Capitolo 15 §15.2.3).
- i. Il trasporto di cellule e tessuti riproduttivi richiede l'identificazione delle strutture distributrici, importatrici ed esportatrici, nonché l'identificazione del materiale biologico e la sua conformità all'uso clinico. In entrambe le istituzioni, la documentazione allegata e l'identificazione del campione sul dispositivo di conservazione devono essere controllate per assicurarsi che corrispondano alla documentazione del paziente.
- j. Gli istituti dei tessuti che conservano e distribuiscono gameti non partner devono

etichettare i contenitori con un'adeguata identificazione unica per la donazione. Nell'UE, si applicano i requisiti di codifica per la donazione non partner (vedi §15.2.3.)

29.13. Biovigilanza nelle procedure di procreazione medicalmente assistita

Le deviazioni dalle procedure standard operative (POS) negli istituti dei tessuti o altri eventi avversi che possono influenzare la qualità e la sicurezza dei tessuti e delle cellule dovrebbero comportare la segnalazione di eventi avversi alle Autorità Sanitarie (SARE). Le reazioni avverse possono anche essere correlate alla stimolazione ovarica e al prelievo chirurgico di gameti, sia in donatori partner che non partner.

Di seguito sono riportati alcuni esempi di SARE segnalati per la PMA. Inoltre, la Notify Library (www.notifylibrary.org) include molti casi ben documentati di eventi avversi nei trattamenti PMA. Il database è accessibile al pubblico e può essere cercato per sostanza, evento avverso e numero di record.

Tutti i pazienti coinvolti in un SARE dovrebbero essere informati al più presto possibile e dovrebbe essere offerta loro consulenza e supporto.

29.13.1. Reazioni ed eventi avversi gravi

29.13.1.1. Eventi avversi gravi

Gli eventi avversi gravi (SAE) possono essere, ad esempio, scambi o perdita di gameti, embrioni o tessuti, e possono verificarsi in qualsiasi fase dei processi clinici o di laboratorio (raccolta, inseminazione, trasferimento embrionale, crioconservazione). Le ragioni degli scambi o della perdita di cellule o tessuti possono essere molteplici, tra cui passaggi di processazione errati, etichettatura sbagliata, contaminazione, coinvolgimento di fattori umani, errata identificazione, mancanza o fallimento della supervisione e/o sistemi di scarsa qualità. Le conseguenze possono includere una ridotta o nulla possibilità di gravidanza, trasmissione di malattie (genetiche), impatto psicologico e questioni etiche/legali. I fattori causali devono sempre essere indagati.

29.13.1.2. Esempi di SAE notificati nella PMA

29.13.1.2.1. Scambi/perdita di tracciabilità

- a. Scambio di campioni di sperma durante la preparazione/trattamento;

- b. Campione di sperma contaminato da un altro campione (ad esempio, con una pipetta già usata);
- c. Ovociti fecondati con spermatozoi di persona sbagliata;
- d. Inseminazione di una donna con spermatozoi di un donatore sbagliato;
- e. Scongelo di embrioni sbagliati;
- f. Errore di etichettatura di tubi/piastre contenenti gli ovociti/spermatozoi/embrioni.

29.13.1.2.2. Perdita accidentale di gameti ed embrioni

- a. Perdita di gameti o embrioni che comporta la totale perdita della possibilità di gravidanza in un ciclo (ad esempio, guasto tecnico dell'incubatore, dell'apparecchiatura di crioconservazione o del contenitore criogenico, incidente con piastre di coltura);
- b. Embrioni destinati alla coltura o alla crioconservazione sono stati invece distrutti (errore nella trasmissione delle informazioni);
- c. Perdita di gameti o embrioni a causa di contaminazione microbiologica.

29.13.1.2.3. Eventi avversi post trattamento con gameti donati

- a. patologia genetica scoperta nel donatore di sperma/ovociti anni dopo la donazione dei gameti (per ulteriori informazioni vedi §29.13.2).

29.13.1.3. Reazioni avverse gravi

Tutte le reazioni avverse gravi (SARs) correlate alla stimolazione ovarica e al prelievo dei tessuti e delle cellule dovrebbero essere segnalate alle Autorità Sanitarie nella categoria "SARs" nei donatori. L'ospedalizzazione a causa della stimolazione ovarica (OHSS) dovrebbe essere considerata come una reazione avversa (reazione avversa non grave se è solo per osservazione).

Anche se la nascita di un bambino con una malattia genetica ereditata dal donatore è un esito negativo, dovrebbe essere segnalata nella categoria di SARs per i riceventi (vedi ad esempio §29.13.1.3.2.d)

29.13.1.3.1. Esempi di SAR notificati nella PMA dei donatori

- a. grave OHSS risultante in ospedalizzazione;
- b. sanguinamento dopo il prelievo degli ovociti;
- c. torsione ovarica.

29.13.1.3.2. Esempi di SAR notificati nella PMA dei riceventi

- a. salpingite dopo inseminazione intrauterina;
- b. infezione batterica del ricevente a causa di spermatozoi infetti;
- c. torsione ovarica dopo stimolazione ovarica;
- d. scambio di campioni nel laboratorio di genetica o di FIV (trattamento PGT-M), causando la nascita di un bambino portatore di una malattia genetica.

29.13.2. Trasmissione di malattie genetiche tramite PMA con donazioni da non partner

I donatori potrebbero portare inconsapevolmente difetti genetici che causano malattie gravi o meno gravi. Di conseguenza, le banche di gameti, ad esempio, quando distribuiscono spermatozoi o ovociti da donatori non partner a più riceventi, potrebbero potenzialmente diffondere malattie genetiche (gravi). Gli istituti dei tessuti dovrebbero tenere presente questo aspetto, specialmente quando informano i donatori e i riceventi delle donazioni da donatori non partner. Si raccomanda vivamente la creazione di registri nazionali per facilitare la tracciabilità dei donatori e dei discendenti.

Ai donatori non partner dovrebbero essere fortemente consigliato di informare il centro di approvvigionamento o l'istituto dei tessuti di eventuali diagnosi di anomalie genetiche. Si consiglia di contattare il ricevente in caso di una diagnosi che potrebbe seriamente influenzare la salute del bambino.

I riceventi di donazioni non partner dovrebbero informare la clinica dove hanno ricevuto il trattamento di fertilità e anche ogni medico che ha in cura un bambino con una malattia genetica che il bambino è stato concepito tramite una donazione non partner, in modo che possano essere avviate appropriate indagini sull'origine del difetto genetico. Dovrebbero essere adottate misure per impedire l'uso di gameti dello stesso donatore fino a quando non sono state eseguite indagini appropriate e valutazioni del rischio. Le misure successive possono includere l'attivazione di allerte rapide internazionali (RATC) se i gameti dello stesso donatore sono stati distribuiti o esportati in altri Paesi.

Questi esempi sottolineano che la tracciabilità anterograda e retrograda è di estrema importanza nei trattamenti di PMA.

29.13.3. Gestione transfrontaliera di reazioni avverse e eventi gravi

Le persone viaggiano all'estero per accedere ai trattamenti di fertilità per vari motivi (vincoli legali, lunghi tempi di attesa, costi del trattamento, mancanza di competenze, qualità del trattamento). Se i pazienti tornano a casa dopo il trattamento, c'è il rischio che possa verificarsi una SAR che potrebbe non essere segnalata ai professionisti che hanno effettuato il trattamento o alle Autorità Sanitarie. Di conseguenza, non viene effettuata alcuna indagine sulle possibili cause e non vengono adottate misure preventive. Si raccomanda vivamente che ai team medici coinvolti in entrambi i Paesi di comunicare fra loro per garantire un trattamento adeguato e un adeguato follow-up. Gli operatori sanitari dovrebbero segnalare qualsiasi SAR alle autorità sanitarie nazionali, anche per i trattamenti transfrontalieri.

29.14. Ulteriori considerazioni

Ai donatori e ai riceventi devono essere fornite informazioni chiare e appropriate durante tutte le fasi dei trattamenti di PMA. Le possibilità di successo (compresa la percentuale di nati vivi) dovrebbero essere discusse in modo appropriato. I clinici, gli embriologi, il personale tecnico, gli infermieri e tutti i professionisti coinvolti devono comunicare in modo continuo per garantire un lavoro di squadra ottimale a beneficio dei pazienti.

Fra gli argomenti da affrontare con i pazienti vi sono il rischio di OHSS, la selezione appropriata dei metodi di laboratorio, il rischio di gravidanza multipla e le sue complicanze, e la necessità di portare avanti il follow-up dei bambini. In questo senso, l'uso di un database europeo unico per l'assegnazione donatore-riceventi sarebbe fondamentale per ottenere una gestione rapida, tempestiva e affidabile delle segnalazioni di SAR.

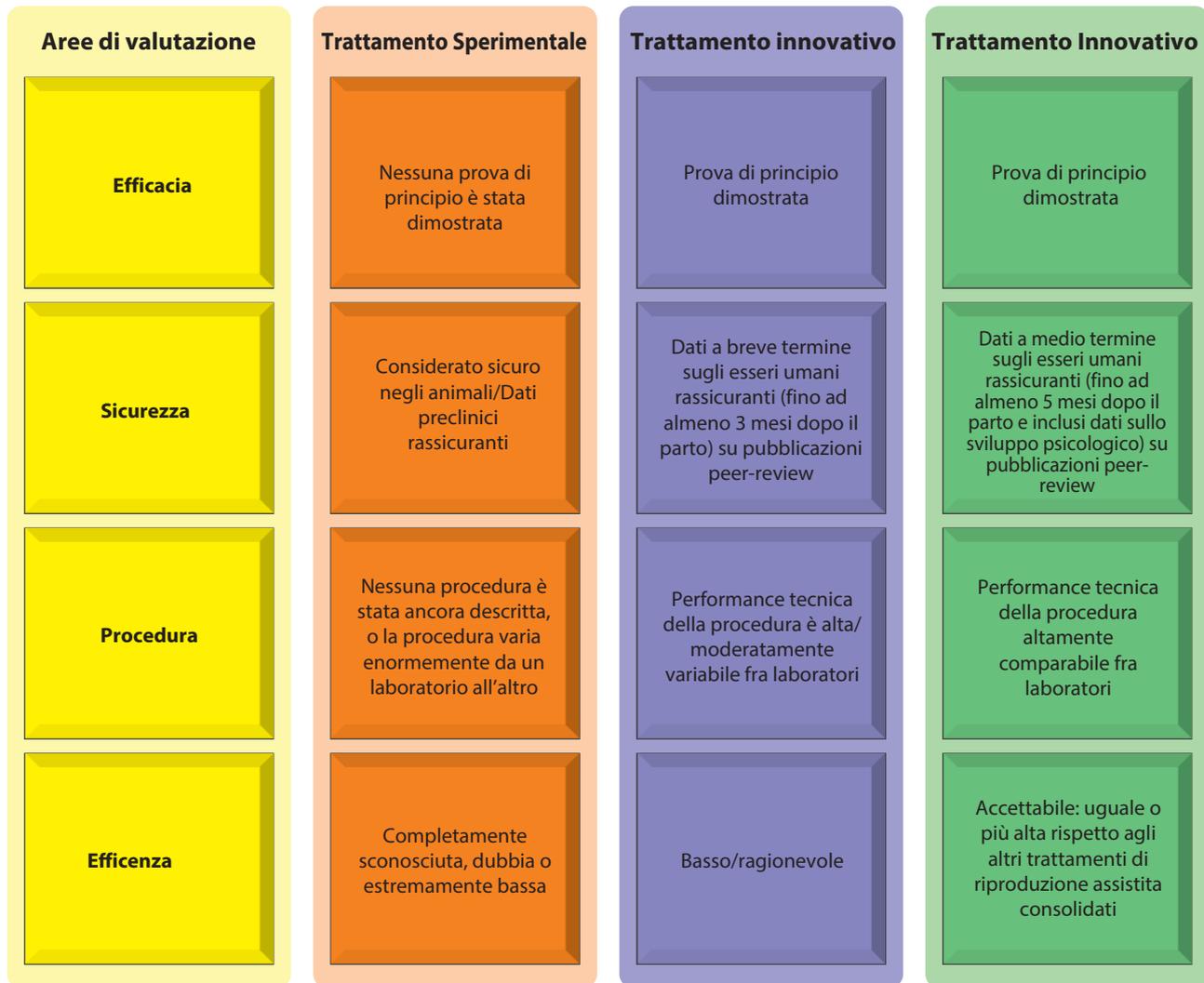
Tutte le strutture sono esortate a documentare i dati e i risultati interni e a confrontarsi con gli standard internazionali [3, 5, 6]. È anche importante tenere traccia dei progressi che possono intensificare la sicurezza e la qualità.

Al fine di garantire una coerenza globale e un'armonizzazione nella comunicazione relativa alla PMA, è stata generata un insieme di termini e definizioni di consenso e basati su evidenze [1].

29.15. Applicazioni cliniche in via di sviluppo

La PMA è un ambito in rapida evoluzione. Lo sviluppo e l'implementazione di nuove tecnologie

Figura 29.9. Trattamenti sperimentali, innovativi e consolidati



Fonte: adattato da Provoost V *et al.* Beyond the dichotomy: a tool for distinguishing between experimental, innovative and established treatment. *Hum Reprod* 2014 Mar;29(3):413-17 [5].

possono influenzare non solo i donatori e i riceventi, ma anche le generazioni future. È pertanto importante dimostrare che tali procedure sono sicure ed efficienti.

Una metodologia per l'introduzione di nuove tecniche e trattamenti nella pratica clinica è stata proposta da Provoost *et al.* [8] e prevede tre livelli: dallo sperimentale, all'innovativo, fino a quello consolidato. Uno strumento di valutazione viene utilizzato per ciascun livello per determinare se è stata raggiunta una soglia sufficiente di efficacia, sicurezza, procedura ed efficienza (vedi Figura 29.9). Per ulteriori informazioni sull'introduzione della nuova metodologia, consultare il Capitolo 18.

29.15.1. Tecnologia time-lapse

La tecnologia Time-lapse (TLT) è una tecnica di microscopia cellulare dal concetto semplice, in

cui le microfotografie vengono acquisite a brevi intervalli di tempo e visualizzate in sequenza a un ritmo accelerato per osservare fenomeni e processi altrimenti invisibili. In associazione con l'ottica a contrasto di fase, la TLT è particolarmente adatta per osservare in modo dinamico e non invasivo lo sviluppo dell'embrione pre-impianto *in vitro*, la cui capacità di sviluppare una gravidanza in grado di procedere è riflessa nel raggiungimento di specifiche fasi di sviluppo a intervalli di tempo precisi. Eventi come la divisione dell'embrione, la frammentazione, la multinucleazione, la compattazione, la formazione del blastocite e lo sviluppo del blastocisti possono essere descritti temporalmente con una precisione senza precedenti e quindi interpretati sotto una nuova luce.

Il dibattito sulla capacità della TLT di migliorare l'efficienza dei trattamenti di PMA, classificando gli embrioni di una coorte in base alla loro capacità

di sviluppo e privilegiandone l'uso per il trasferimento dell'embrione, rimane attualmente irrisolto [40, 41]. Tuttavia, la TLT ha rivelato comportamenti di sviluppo insospettati dell'embrione, manifestati in modalità atipiche di espulsione del secondo corpo polare (PBII), deregolazione della formazione e rottura del pronucleo, divisione anormale e altri fenomeni insoliti. L'accesso a tali evidenze ha il potenziale per estendere la nostra comprensione della biologia dello sviluppo dell'embrione. Inoltre, la TLT consente la valutazione dell'embrione senza rimuovere le piastre di coltura dall'incubatore, garantendo così condizioni di coltura ideali, superiori alla coltura standard dell'embrione. Studi recenti indicano anche che il pieno potenziale della TLT nel prevedere la capacità di sviluppo dell'embrione può essere raggiunto combinando avanzate tecniche di imaging e intelligenza artificiale [42].

29.15.2. Test genetico di pre-impianto degli embrioni non invasivo

È noto che la morfologia dell'embrione svolge un ruolo relativamente limitato nel determinare la qualità dell'embrione e nella previsione dell'impianto. Molti embrioni che non si impiantano o che risultano in un aborto spontaneo sono portatori di anomalie cromosomiche dovute ad errori meiotici e mitotici ereditati.

La scoperta di acidi nucleici privi di cellula nei mezzi di coltura degli embrioni umani ha sostenuto la ricerca su nuovi biomarcatori non invasivi di vitalità dell'embrione (niPGT) che potrebbero alla fine sostituire i metodi di screening invasivi attuali (PGT) [43]. Questa nuova tecnologia potrebbe essere in grado di determinare lo stato di euploidia o anche mutazioni genetiche singole negli embrioni umani misurando il DNA privo di cellula nei mezzi di coltura esausti [44] o nel liquido del blastocite [45]. La validazione dei metodi deve ancora essere effettuata. Studi recenti hanno dimostrato una buona capacità predittiva con elevati valori di sensibilità e specificità in una situazione specifica di beta-talassemia [46].

29.15.3. Screening dell'intero genoma

Gli sviluppi recenti nella ricerca nel campo della genomica hanno reso possibile il test completo del genoma umano combinando i metodi di sequenziamento di nuova generazione con avanzate tecniche bioinformatiche. In questo modo, si ottiene un quadro completo del genoma di ciascun individuo, includendo variazioni del singolo nucleotide (SNV) e del numero di copie (CNV), che permette un'ampia

analisi del DNA. L'applicazione di questo approccio consente il PGT (preimpianto genetico) e i test prenatali non invasivi, con un'ampia analisi dei portatori di anomalie genetiche, ma comporta anche la possibile divulgazione dell'anonimato dei donatori di gameti. Le informazioni complete derivanti dallo screening dell'intero genoma presentano vantaggi, limitazioni e rischi, e la sua introduzione nella pratica clinica richiede prudenza e consulenza genetica [47].

29.15.4. Terapia di sostituzione mitocondriale

Di recente, sono state introdotte nella pratica clinica nuove tecnologie riproduttive conosciute come donazione mitocondriale o terapia di sostituzione mitocondriale (MRT). Queste consentono alle donne con malattie del DNA mitocondriale (mtDNA) di avere figli sani, geneticamente correlati [48]. Poiché la trasmissione mitocondriale è uniparentale e di origine materna, le malattie causate da disfunzione mitocondriale vengono trasmesse dalla madre alla prole in modo dominante. Dal momento che non vi è una cura per le malattie mitocondriali, la prevenzione della trasmissione nella linea germinale è una priorità.

Il PGT sembra essere una procedura affidabile per ridurre la trasmissione di mutazioni eteroplasmiche del mtDNA, anche se può essere eticamente gravoso determinare quali embrioni dovrebbero essere trasferiti [49].

Le MRT, tuttavia, sono in grado di evitare la trasmissione delle mutazioni nel mtDNA. Poiché la tecnica utilizza una parte di un ovulo donato per sostituire il mtDNA materno mutato, il bambino erediterà il DNA da una "terza persona", ovvero il donatore mitocondriale.

Le MRT sono una modifica della FIV convenzionale e comprendono due principali strategie. Nella procedura di trasferimento del pronucleo, l'ovocita materno con mtDNA mutato viene fecondato con lo spermatozoo paterno e contemporaneamente, anche un ovocita donato con mtDNA di ceppo selvatico viene fecondato con lo spermatozoo paterno. Successivamente, i pronuclei parentali vengono rimossi dallo zigote con mtDNA mutato e trasferiti nello zigote senza nucleo con mtDNA di ceppo selvatico. Infine, l'embrione con mtDNA di ceppo selvatico viene trasferito nell'utero.

La tecnica del *maternal spindle transfer* (trasferimento del fuso mitotico materno) inizia in una fase più precoce dello sviluppo dell'ovocita. Il fuso mitotico MII e i cromosomi associati vengono trasferiti dall'ovocita materno con mtDNA mutato in un ovocita donato senza nucleo con mtDNA di ceppo

selvatico. Successivamente, l'ovocita ricostruito viene fecondato con lo spermatozoo paterno e l'embrione con mtDNA di ceppo selvatico viene trasferito nell'utero. Il trasferimento del fuso mitotico materno è tecnicamente più impegnativo del trasferimento del pronucleo. Tuttavia, con la tecnica di trasferimento del pronucleo viene scartato uno zigote, il che potrebbe sollevare preoccupazioni etiche, mentre con la tecnica del *maternal spindle transfer* nessuno zigote viene distrutto.

La terapia di sostituzione mitocondriale è ancora considerata caso per caso. Sono stati pubblicati pochi report di casi di successo e mancano risultati a lungo termine.

29.15.5. Editing genetico

L'editing genetico comprende un gruppo di tecnologie che consentono di correggere il genoma inserendo, eliminando, sostituendo o modificando il materiale genetico in posizioni specifiche nella sequenza del DNA. Nei casi in cui i geni presentino una mutazione, l'enzima taglia la mutazione e la sostituisce con la sequenza corretta del DNA, rendendo questa tecnica di grande interesse nella prevenzione e nel trattamento delle malattie umane. Questo approccio può essere utilizzato per l'editing delle cellule somatiche per il trattamento non solo di una malattia genetica, ma anche di tumori e malattie infettive. Tuttavia, l'applicazione dell'editing genetico finalizzato ad alterare i geni nei gameti o negli embrioni, introducendo cambiamenti che verranno trasmessi alle generazioni future, solleva delle questioni etiche.

Nel 2015, è stato pubblicato uno studio dalla Cina, sull'editing genomico tramite CRISPR-Cas9 su embrioni umani non vitali [50]. L'anno successivo, il Regno Unito ha rilasciato la prima autorizzazione al mondo di un'autorità nazionale di regolamentazione per la ricerca sugli embrioni umani utilizzando la modifica del genoma. Studi aggiuntivi hanno dimostrato come la modifica del gene della linea germinale umana stia progredendo rapidamente dal campo sperimentale alle applicazioni di ricerca clinica [51].

I risultati ottenuti finora suscitano grandi aspettative riguardo alle possibili applicazioni terapeutiche negli esseri umani, ma molto rimane da considerare prima delle applicazioni cliniche, tra cui la riproducibilità della tecnica e le possibili conseguenze a lungo termine [52].

29.16. Bibliografia

- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S *et al.* The international glossary on infertility and fertility care. *Hum Reprod* 2017;32(9):1786-1801, and *Fertil Steril* 2017;108(3):393-406.
- ESHRE Guideline Group on Viral Infection/Disease, Mocanu E, Drakeley A *et al.* ESHRE guideline: medically assisted reproduction in patients with a viral infection/disease. *Hum Reprod Open* 2021;4:hoabo37.
- Wyns C, De Geyter Ch, Calhaz-Jorge C *et al.* ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open* (2021) 3:2021, hoabo26. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoabo26>.
- Rienzi L, Bariani F, Dalla Zorza M *et al.* Comprehensive protocol of traceability during IVF: the result of a multicentre failure mode and effect analysis. Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR), Italy. *Hum Reprod* 2017;32(8):1612-20.
- ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Hum Reprod Open* 2017;2 and *Reprod Biomed Online* 2017;35(5):494-510.
- ESHRE Clinic PI Working Group, Vlaisavljevic V, Apter S *et al.* The Maribor consensus: report of an expert meeting on the development of performance indicators for clinical practice in ART. *Hum Reprod Open* 2021;3:hoabo22.
- Harper J, Magli MC, Lundin K *et al.* When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum Reprod* 2012;27(2):303-13.
- Provoost V, Tilleman K, D'Angelo A *et al.* Beyond the dichotomy: a tool for distinguishing between experimental, innovative and established treatment. *Hum Reprod* 2014 Mar;29(3):413-17.
- ESHRE Working Group on Reproductive Donation, Kirkman-Brown J, Calhaz-Jorge C, Dancet EAF *et al.* Good practice recommendations for information provision for those involved in reproductive donation. *Hum Reprod Open* 2022 Feb 16;2022(1):hoaco01. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaco01>. PMID: 35178481; PMCID: PMC8847071.
- Gameiro S, Boivin J, Dancet E *et al.* ESHRE guideline: routine psychosocial care in infertility and medically assisted reproduction-a guide for fertility staff. *Hum Reprod* 2015;30(11):2476-85.
- WHO Department of Reproductive Health and Research. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 6th edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2021.
- Van Landeghem S, Tilleman K, Vanden Meerschaut F *et al.* Screening of chlamydia trachomatis in non-partner donors: situation of stored donations and proposal for periodic screening. *Reprod Biomed Online* 2021; <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.11.025>.
- European Centre for Disease Prevention and

- Control. *Laboratory testing of non-partner sperm donors – an assessment of potential risks involved in changing the current testing protocols for HIV, hepatitis B and hepatitis C*. Stockholm: ECDC; 2018. ISBN 978-92-9498-246-9; <https://doi.org/10.29000/952089>; Catalogue number TQ-04-18-586-EN-N.
14. ESHRE Working Group on Ultrasound in ART, D'Angelo A, Panayotidis C, Amso N *et al*. Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up. *Hum Reprod Open* 2019; Dec 10;2019(4):hozo25. <https://doi.org/10.1093/hropen/hozo25>. eCollection2019.
 15. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos MJ, Apter S, Coticchio G *et al*. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories: oocyte pick up. *Hum Reprod*. 2016 Apr;31(4):685-6. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew016>. Epub 2016 Feb.
 16. Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST *et al*. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2018; 36(6):658-74.
 17. Verheyen G, Popovic-Todorovic B, Herman Tournaye H. Processing and selection of surgically-retrieved sperm for ICSI: a review. *Basic Clin Androl* 2017;27:6.
 18. Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod Biomed Online* 2015;31(4):459-71.
 19. ESHRE Working group on Time-lapse technology, Apter S, Ebner T *et al*. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Hum Reprod Open* 2020; Mar 19;2020(2):hoaa008. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>. eCollection 2020.
 20. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE *et al*. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod* 2014;29(12):2650-60.
 21. ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali G, Coticchio G, Bronet F *et al*. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Hum Reprod Open* 2020(3):2020, hoaa020. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa020>.
 22. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F, Moutou C, Dimitriadou E *et al*. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open* 2020(3):2020, hoaa018. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa018>.
 23. ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen E, Rubio C, Christopikou D *et al*. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod Open* 2020(3):2020, hoaa017. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa017>.
 24. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L *et al*. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2017;107(5):1122-9.
 25. Verpoest W, Staessen C, Bossuyt PM *et al*. Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. *Hum Reprod* 2018;33(9):1767-76.
 26. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. *In vitro* maturation: committee opinion. *Fertil Steril* 2013;99(3):663-6.
 27. Savasi V, Mandia L, Laoreti A, Cetin I. Reproductive assistance in HIV serodiscordant couples. *Hum Reprod Update* 2013;19(2):136-50.
 28. Jindal SK, Rawlins RG, Muller CH, Drobnis EZ. Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 2016 Aug;33(2):121-30.
 29. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol* 2012;2012:854837. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>.
 30. Potdar N, Gelbaya TA, Nardo LG. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2014;29(2):159-76.
 31. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11(3):300-8.
 32. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R *et al*. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017; 23(2):139-55.
 33. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update* 2015;21(2):209-27.
 34. Cobo A, Serra V, Garrido N *et al*. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil Steril* 2014;102(4):1006-15.e4.
 35. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril* 2005;84(4):1017.
 36. Urquiza MF, Carretero I, Cano Carabajal PR *et al*. Successful live birth from oocytes after more than 14

- years of cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31:1553-5.
37. Revel A, Safran A, Laufer N *et al.* Twin delivery following 12 years of human embryo cryopreservation: case report. *Hum Reprod* 2004;19(2):328-9.
38. Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J *et al.* Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril* 2010;94(4):1181-8.
39. 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 Jan;97(1):74-8.
40. Armstrong S, Bhide P, Jordan V *et al.* Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2018 May 25;5:CD011320. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011320.pub3>. Review. [Update in *Cochrane Database Syst Rev* 2019 May 29;5:CD011320.]
41. ESHRE Working group on Time-lapse technology, Apter S, Ebner T, Freour T *et al.* Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Hum Reprod Open* 2020 Mar 19;2020(2):hoaa008. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>. eCollection 2020.
42. Berntsen J, Rimestad J, Lassen JT *et al.* Robust and generalizable embryo selection based on artificial intelligence and time-lapse image sequences. *PLoS One*. 2022 Feb 2;17(2):e0262661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262661>. eCollection 2022.
43. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Hum Reprod Update* 2020 Jan 1;26(1):16-42.
44. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril* 2016;106:1312-18.
45. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM *et al.* Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol* 223.5 (2020):751-e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.04.035>.
46. Liu WQ, Liu JQ, Du HZ *et al.* Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium. *Annals of Medicine* 2017;49(4):319-28.
47. Harper JC, Aittomäki K, Borry P *et al.* on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology and European Society of Human Genetics. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet* 2018 Jan;26(1):12-33, and *Hum Reprod Open* 2017(3), 5 October 2017.
48. Herbert M, Turnbull D. Progress in mitochondrial replacement therapies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018 Jan 23;19(2):71-2.
49. Sallevelt SCEH, Dreesen JCFM, Coonen E *et al.* Pre-implantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA mutations: analysis of one blastomere suffices. *J Med Genet*. 2017 Oct;54(10):693-7.
50. Liang P, Xu Y, Zhang X *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015 May;6(5):363-72. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>. Epub 2015 Apr 18.
51. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW *et al.* Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017 Aug 24;548(7668):413-19. <https://doi.org/10.1038/nature23305>. Epub 2017 Aug 2.
52. Davies B. The technical risks of human gene editing. *Hum Reprod*. 2019;34(11):2104-11.

Traduzione e revisione italiana a cura di : Valentina Caramia, Fiorenza Bariani, Liliam Santilli

© Centro Nazionale Trapianti (CNT), 2024

Capitolo 30. Preservazione della Fertilità

30.1. Introduzione

Nonostante alcune differenze nelle modalità tecniche e nei risultati attesi, oggi la preservazione della fertilità (FP) può essere applicata sia per motivi medici che non medici.

La FP comprende interventi biomedici intrapresi al fine di evitare, ritardare, diminuire o aggirare l'esaurimento del patrimonio di cellule germinali dell'individuo. Nella maggior parte delle circostanze attuali, sia per prevenire gli effetti della terapia citotossica utilizzata per trattare una grave malattia, sia per una serie di possibili motivi che causano il rinvio della scelta di genitorialità, ciò comporta la crioconservazione di tessuti gonadici, gameti o embrioni.

Le tecniche di FP vengono solitamente offerte a ragazze e ragazzi prepuberi e a uomini e donne in età riproduttiva a rischio di perdere il loro potenziale riproduttivo a causa di malattie sia maligne che non maligne. La crioconservazione dei gameti è anche un'opzione per condizioni non mediche, come il rinvio della genitorialità, la precedente vasectomia, i trattamenti per transgender o altre ragioni.

Questo capitolo descrive le indicazioni per la FP maschile e femminile e le tecniche attualmente disponibili per la crioconservazione delle cellule riproduttive e dei tessuti germinali. La collaborazione tra tutte le specialità mediche coinvolte, come pediatri, oncologi e specialisti della riproduzione, è essenziale per garantire una corretta valutazione e consulenza per ciascun paziente. La valutazione e l'approccio al paziente dipenderanno dalla malattia, dall'età e dal trattamento. Le informazioni sulle possibili opzioni e

sull'uso futuro di gameti o tessuti germinali crioconservati devono essere discusse con i pazienti, o con i genitori (nel caso dei minori). È importante rendersi conto che la FP e il successivo ripristino possono includere tecniche sperimentali, la cui disponibilità può essere limitata in base alla legislazione nazionale.

Questo capitolo deve essere letto in combinazione con il Capitolo 29 - Procreazione medicalmente assistita e i capitoli seguenti (Parte A) di questa guida:

- a. Capitolo 1: Introduzione
- b. Capitolo 2: Gestione della qualità e validazione
- c. Capitolo 3: Gestione del rischio
- d. Capitolo 4. Reclutamento di potenziali donatori, identificazione e consenso
- e. Capitolo 5. Valutazione del donatore
- f. Capitolo 6. Test del donatore - indicatori per malattie infettive
- g. Capitolo 7. Approvvigionamento
- h. Capitolo 8. Locali
- i. Capitolo 9. Processazione
- j. Capitolo 10. Stoccaggio
- k. Capitolo 11. Principi dei test microbiologici
- l. Capitolo 12. Rilascio, distribuzione e import/export
- m. Capitolo 13. Interazione tra istituti dei tessuti e organizzazioni responsabili dell'applicazione umana
- n. Capitolo 14. Sistemi informatizzati
- o. Capitolo 15. Codifica, imballaggio e etichettatura
- p. Capitolo 16. Tracciabilità
- q. Capitolo 17. Biovigilanza

- r. Capitolo 18. Introduzione di nuovi processi e applicazioni cliniche

30.1.1. Preservazione della fertilità femminile

La preservazione della fertilità (FP) femminile dovrebbe essere considerata ogni volta che si prevede una perdita di fertilità come conseguenza di un trattamento citotossico per una specifica malattia (ad esempio, nelle pazienti affette da cancro) [1, 2], o a causa della malattia stessa (maligna o non maligna, ad esempio, grave endometriosi) [3, 4]. Questa parte comprende indicazioni per la preservazione della fertilità in condizioni mediche (oncologiche e non oncologiche) e per motivi non medici.

30.1.1.1. Ragioni mediche

Tutte le ragazze in età prepuberale e le donne in età riproduttiva con una diagnosi recente e con specifiche condizioni mediche (ad esempio, alcuni tipi di cancro o artrite reumatoide) e il cui trattamento può causare insufficienza ovarica prematura (POI) dovrebbero essere indirizzate a un esperto di fertilità, per ricevere una consulenza sul rischio di infertilità e per essere informate sulla preservazione della fertilità. La FP dovrebbe idealmente essere offerta prima di iniziare il trattamento, ma non dovrebbe ritardare il trattamento. Le implicazioni nel sottoporsi alla FP, inclusi i possibili ritardi nel trattamento del cancro, dovrebbero essere valutate rispetto ai benefici di avere cellule e/o tessuti riproduttivi conservati per un uso futuro. Fattori come l'età, la riserva ovarica, la gonadotossicità del trattamento e il tempo disponibile prima dell'inizio dello stesso aiuteranno nella decisione [5].

30.1.1.1.1. Ragioni oncologiche per la preservazione della fertilità

La chemioterapia e la radioterapia possono causare la deplezione del pool di follicoli primordiali nelle ovaie di ragazze o donne in pre-menopausa e renderle quindi non fertili. Una volta che le ovaie hanno esaurito i follicoli, la paziente sperimenterà la POI e l'infertilità. Nel caso di ragazze pre-pubere, la perdita dell'intero stock di follicoli primordiali implica che la ragazza non entrerà spontaneamente in pubertà e che non potrà diventare madre con i propri ovociti in futuro. Questo è ovviamente un grave effetto collaterale di un trattamento contro il cancro altrimenti efficace ed è considerato, da molti, una significativa riduzione della qualità della vita. Poiché sempre più ragazze e donne in età riproduttiva sopravvivono oggi a una malattia maligna, questi

effetti indesiderati colpiranno un numero crescente di adulti nella popolazione.

È ben noto che i farmaci chemioterapici appartenenti al gruppo degli agenti alchilanti causano il danno più grave alle ovaie. Gli agenti alchilanti, come il ciclofosfamido o il busulfano, vengono utilizzati per trattare diverse forme di cancro, tra cui il cancro al seno, il linfoma e il sarcoma. Vengono anche utilizzati nel protocollo di preconditionamento prima del trapianto di cellule progenitrici ematopoietiche (HPC). Poiché gli agenti alchilanti causano danni sia alle cellule in divisione che a quelle in riposo, sono molto tossici per gli ovociti e le cellule della granulosa dei follicoli primordiali, che sono il tipo di follicolo più immaturo e "dormiente" [6].

La radioterapia, che sia somministrata all'addome o alla colonna vertebrale, influirà anche sulla funzione ovarica. La radioterapia è molto tossica per gli ovociti e dosi anche basse come 2 Gy distruggeranno la metà del pool di follicoli. Quando possibile, le ovaie vengono schermate o spostate lontano dal campo di radiazione, ma la dose diffusa è inevitabile [7].

Alcune condizioni genetiche possono essere anche un motivo per la FP. Le donne portatrici di mutazioni nei geni BRCA (gene del cancro al seno) possono ricevere consulenza per l'asportazione profilattica delle ovaie a causa di un aumento del rischio di sviluppare il cancro ovarico rispetto alla popolazione generale [8].

30.1.1.1.2. Ragioni non oncologiche per la preservazione della fertilità

Diagnosi non maligne - come malattie renali, malattie autoimmuni o malattie ematologiche come anemia aplastica o talassemia - possono talvolta essere potenzialmente letali e richiedere il trattamento con agenti alchilanti o addirittura HPC. Le donne affette da qualsiasi grave malattia che richieda questi trattamenti possono avere bisogno di FP.

Quando è necessario un intervento chirurgico alle ovaie, come nel caso di grave endometriosi o cisti ovariche benigne o cisti borderline, il tessuto ovarico sano contenente follicoli primordiali verrà inevitabilmente asportato come effetto della procedura operativa. Questi interventi possono rappresentare una minaccia per il potenziale riproduttivo della paziente e in questi casi dovrebbe essere offerta anche la FP [3, 4].

Alcune condizioni genetiche - come il mosaicismo di Turner, la galattosemia, lo stato di portatrice di mutazioni del gene Fragile X o la sindrome di blefarofimosi, ptosi o epicanto inversa - sono associate all'esaurimento prematuro del pool di folli-

coli primordiali nelle ovaie e le ragazze e le donne in età riproduttiva affette da una qualsiasi di queste condizioni possono anche essere potenziali candidate per la FP.

Esistono diverse opzioni per preservare la fertilità nelle ragazze e donne post-pubere. Gli ovociti, gli embrioni e il tessuto ovarico possono essere crioconservati a seconda delle caratteristiche di ogni caso individuale e considerando l'alternativa più efficiente per ogni paziente [5].

Anche il trattamento con ormoni incrociati per le persone transgender può essere potenzialmente dannoso per la loro fertilità. Pertanto, i pazienti transgender da femmina a maschio possono sottoporsi a raccolta e conservazione di ovociti prima del trattamento con ormoni incrociati e intervento di riassegnazione sessuale. Nel caso del trattamento di persone transgender da femmina a maschio, i pazienti dovrebbero essere informati dell'eventuale utilizzo dei loro gameti in futuro. Questo approccio può variare in diversi Paesi a seconda della legislazione nazionale.

30.1.1.2. *Ragioni non mediche per la preservazione della fertilità*

La preservazione della fertilità non medica può essere considerata anche per le giovani donne che desiderano posticipare la maternità (preservazione della fertilità legata all'età) [4].

In tutti i casi, le donne dovrebbero essere consapevoli di domande rilevanti, come ad esempio il tasso di sopravvivenza previsto degli ovociti dopo la crioconservazione o il fatto che la probabilità di successo di nati vivi dipende strettamente dal numero di ovociti conservati; in questo senso, lo sviluppo di modelli di previsione *ad hoc* è un approccio interessante che può guidare i pazienti e i clinici [5].

In particolare, per i casi di preservazione della fertilità legata all'età, le donne dovrebbero essere adeguatamente informate sulla limitazione biologica associata alla gravidanza a causa dell'aneuploidia degli ovociti dipendente dall'età.

30.1.2. **Preservazione della fertilità maschile**

30.1.2.1. *Ragioni mediche*

La FP è indicata per tutti i ragazzi e gli uomini che affrontano un trattamento gonadotossico o procedure chirurgiche che influiscono sulla produzione e raccolta di sperma. Tutti i pazienti a rischio di perdita di fertilità dovrebbero essere informati sulle opzioni di FP.

30.1.2.1.1. *Ragioni oncologiche per la preservazione della fertilità*

Gli agenti chemioterapici e i trattamenti radioterapici possono influenzare negativamente l'epitelio gonadico maschile. Pertanto, le terapie utilizzate per curare il cancro (ma anche per diverse condizioni non maligne) possono rendere temporaneamente o permanentemente non fertile il paziente. La quantità di danni dipende dal regime di trattamento, dalla dose cumulativa dei trattamenti utilizzati e dalla capacità individuale di ripresa. Le spermatogonie mitoticamente attive sono altamente sensibili ai trattamenti citotossici e alle radiazioni. Le basse dosi di questi trattamenti impoveriscono la popolazione di spermatogonie differenzianti, mentre le cellule staminali spermatogoniali (SSC) possono inizialmente sopravvivere e gli spermatozoi e gli spermatozoidi possono continuare la loro maturazione in spermatozoi. L'involutione testicolare si verifica quando non vengono forniti nuovi precursori dalla popolazione di cellule staminali e le cellule germinali differenzianti maturano in spermatozoi, che vengono rilasciati dall'epitelio seminifero [9, 10].

Sono stati segnalati danni significativi dopo il trattamento con agenti alchilanti, per i quali sono riportate diverse dosi soglia nella letteratura (ad esempio, per i farmaci a base di ciclofosfamide e cisplatino). Sia gli agenti alchilanti che quelli a base di platino causano danni diretti al DNA e all'RNA, influenzando quindi anche le cellule staminali non divise. L'epitelio gonadico è altamente suscettibile ai danni indotti dalle radiazioni. Le spermatogonie differenzianti sono sensibili a dosi sparse di radiazioni anche basse come 0,1 Gy, portando a una cessazione a breve termine della spermatogenesi. Dosi cumulative superiori a 3 Gy influenzano le SSC e causano azoospermia a lungo termine, mentre dosi superiori a 6 Gy impoveriscono la popolazione di SSC e possono portare a infertilità permanente. Il frazionamento della radioterapia aumenta la tossicità delle cellule germinali. In generale, fino al 60 % dei pazienti affetti da cancro, riporta problemi di infertilità dopo il trattamento [11].

30.1.2.1.2. *Ragioni non oncologiche per la preservazione della fertilità*

Come nelle femmine, alcune patologie non maligne come le condizioni ematologiche e autoimmuni che richiedono trattamenti potenzialmente gonadotossici potrebbero compromettere la fertilità maschile. Le donne transgender potrebbero desiderare di conservare il seme per la preservazione della fertilità. Le persone transgender che pianificano di iniziare il trattamento con ormoni incrociati

e sottoporsi a interventi chirurgici di riassegnazione sessuale possono trarre beneficio dalla preservazione della fertilità. Le considerazioni analoghe spiegate in precedenza per gli uomini transgender si applicano anche alle donne transgender [5].

30.1.2.2. *Ragioni non mediche per la preservazione della fertilità*

Queste indicazioni includono gruppi come gli uomini nei servizi militari, che sono a rischio di potenziale danneggiamento della loro fertilità.

30.2. Il Consenso nella preservazione della fertilità

Dopo la segnalazione del paziente, il medico dovrebbe ottenere il consenso informato per la FP. Tuttavia, poiché anche i bambini pre-puberi possono trarre vantaggio dalle tecniche di FP, il consenso informato dovrebbe essere discusso con i genitori o i tutori legali del bambino e firmato da loro. È importante che, nel caso della FP per bambini pre-puberi, si spieghi attentamente l'uso futuro del tessuto gonadico conservato.

I singoli Paesi possono avere una propria legislazione riguardo alla FP e pertanto i moduli di consenso possono variare. Le informazioni riguardanti il processo, il tempo legale di conservazione e i potenziali rischi possono essere riportate nel modulo di consenso o in un documento informativo correlato.

30.3. Valutazione del paziente

Oltre all'esame clinico della malattia da trattare, i pazienti che sono candidati alla preservazione

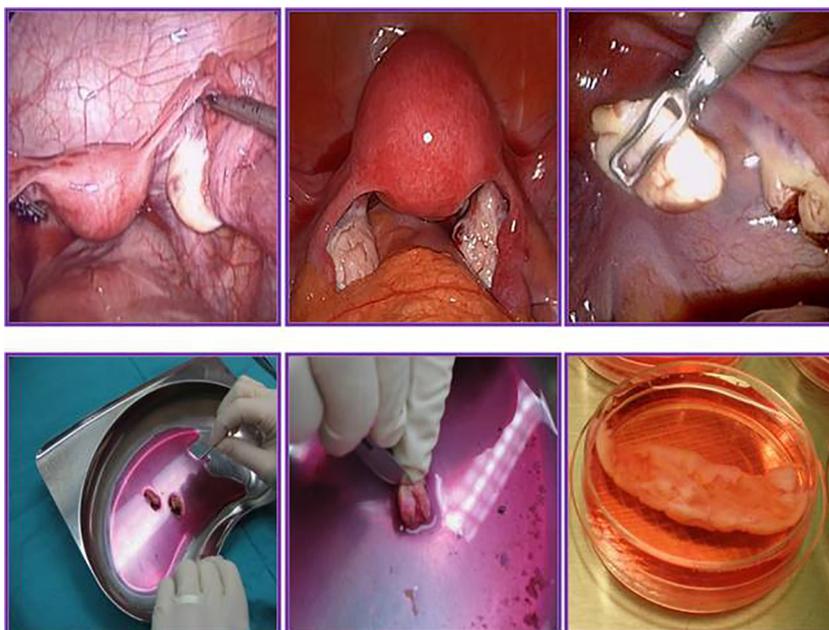
della fertilità sono sottoposti a una valutazione simile a quella dei pazienti che si sottopongono a tecniche di procreazione medicalmente assistita (Capitolo 29). L'uso futuro del tessuto gonadico o dei gameti conservati comporterà alla fine l'utilizzo di tale materiale nelle tecniche di procreazione medicalmente assistita con l'obiettivo di ottenere embrioni in un trattamento di donazione (non) partner.

La valutazione del paziente per i ragazzi e le ragazze in età prepuberale richiede una cura particolare nei casi in cui il tessuto gonadico viene rimosso e conservato. In questo senso, è essenziale una stretta collaborazione tra pediatri, chirurghi, oncologi e specialisti della fertilità. Al primo incontro con i pazienti nel reparto di oncologia, è necessario discutere l'impatto del trattamento del cancro sulle future condizioni del paziente e spiegare le opzioni di preservazione della fertilità. Il rinvio a una clinica di fertilità dovrebbe essere reso possibile in tempi molto rapidi a causa del breve intervallo di tempo disponibile per alcuni pazienti per sottoporsi alla FP prima del trattamento per la loro specifica malattia. Nella clinica di fertilità, verranno offerte informazioni dettagliate sulla possibilità e sul processo di FP su base individuale. Inoltre, sarà necessario affrontare l'argomento dell'uso futuro del materiale riproduttivo conservato.

Per migliorare la conformità del paziente, alcuni aspetti del processo di FP dovrebbero essere gestiti con attenzione. Ad esempio, per fare in modo che il paziente subisca il minor trauma possibile, il recupero chirurgico del tessuto gonadico dovrebbe essere combinato con altre procedure che richiedono anestesia, come il prelievo di midollo osseo o l'impianto di portacateteri venosi. A tal fine, è neces-

Figura 30.1. **Prelievo di tessuto ovarico tramite laparoscopia: stadio 1**

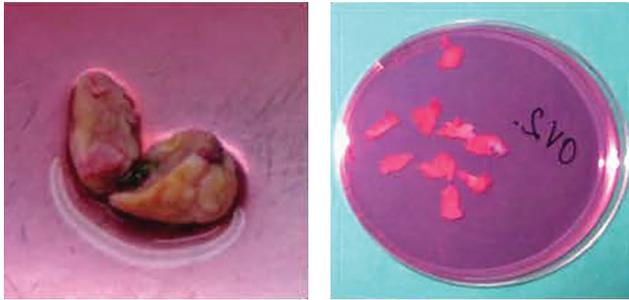
Le immagini nel pannello superiore mostrano le fasi dell'intervento per ottenere il tessuto. Le immagini nel pannello inferiore mostrano le fasi di processazione: la medulla ovarica viene rimossa.



Fonte: Immagini fornite da Sonia Herraiz, Valencia, Spagna.

Figura 30.2. Prelievo del tessuto ovarico tramite laparoscopia: stadio 2

Dopo la rimozione della medulla, la restante corteccia ovarica viene tagliata in piccoli pezzi di $10 \times 5-10$ mm



Fonte: Immagini fornite da Sonia Herraiz, Valencia, Spagna.

saria una stretta collaborazione interdisciplinare tra oncologi pediatrici e ginecologi, urologi, chirurghi pediatrici, psicologi o altri specialisti medici.

Nel caso dei ragazzi pre-puberi, la misurazione del volume testicolare è utile per prevedere le possibilità di recupero con successo di spermatozoi e la produzione di sperma negli adolescenti, i cui parametri seminali - non appena la spermatogenesi ha avuto inizio - sono paragonabili a quelli dei pazienti adulti, indipendentemente dalla malattia da cui sono affetti [12, 13]. Nel caso delle ragazze pre-pubere, può essere valutata la riserva ovarica mediante la misurazione dei livelli ematici dell'ormone anti-Mülleriano (AMH) [14]. Non dovrebbero essere effettuate ulteriori indagini ginecologiche, poiché possono essere percepite come invasive e rappresentare un carico emotivo e psicologico per le pazienti.

30.4. Approvvigionamento

30.4.1. Femmine

30.4.1.1. Tessuto ovarico

Il prelievo del tessuto ovarico può essere effettuato in qualsiasi momento del ciclo mestruale e può essere eseguito con poco preavviso.

Attraverso il prelievo del tessuto ovarico, possono essere conservate molte migliaia di follicoli primordiali. Tali follicoli si trovano all'interno del tessuto corticale di un ovaio, con la stragrande maggioranza dei follicoli reperibili nei 1-2 mm più esterni dell'ovaio. Un intero ovaio, una sua porzione o biopsie corticali ovariche vengono rimosse mediante un intervento effettuato sotto anestesia generale e preparati per la criopreservazione [15]. Vedere Figura 30.1 e Figura 30.2.

Il prelievo del tessuto ovarico viene proposto alle ragazze in età pre e post puberale non pronte a sottoporsi a stimolazione ovarica, monitoraggio ecografico transvaginale e recupero degli ovociti

per ottenere e conservare ovociti. Anche le donne adulte che non hanno il tempo di sottoporsi alla stimolazione per il prelievo degli ovociti, sia perché il trattamento contro il cancro è imminente sia perché il cancro è influenzato dagli ormoni, sono candidate alla criopreservazione del tessuto ovarico.

Sebbene, da un punto di vista tecnico, sia possibile conservare il tessuto ovarico durante la chirurgia di riassegnazione del sesso e terapia ormonale per l'affermazione di genere, questo approccio è altamente sperimentale [16]. Per tutti i pazienti, compresi gli uomini transgender, il prelievo ovarico dovrebbe essere eseguito prima dell'inizio del trattamento gonadotossico.

30.4.1.2. Ovociti

Per raccogliere ovociti maturi, è necessaria una stimolazione ovarica controllata. Questa stimolazione è simile alla stimolazione per la fecondazione *in vitro* (FIV) (Capitolo 29). Il numero di ovociti che possono essere raccolti dipende dall'età della paziente e dalla sua riserva ovarica. Sono necessarie considerazioni speciali per evitare una produzione elevata di estrogeni durante la stimolazione ovarica in pazienti con malattie influenzate dagli estrogeni. Nei casi di cancro al seno, sono stati sviluppati protocolli di stimolazione per ridurre il rischio di un livello indesiderato di estradiolo. Idealmente, la stimolazione dovrebbe iniziare il terzo giorno del ciclo mestruale, ma può iniziare in qualsiasi momento del ciclo mestruale, compresa la fase luteale, con risultati apparentemente buoni. Al fine di aumentare la produzione degli ovociti, possono essere eseguite due stimolazioni consecutive secondo l'approccio denominato stimolazione doppia [17]. Qualsiasi paziente in pre-menopausa con una sufficiente riserva ovarica è idonea per la raccolta degli ovociti per la FP. Alcune ragazze in post-pubertà potrebbero essere in grado di sottoporsi a stimolazione ovarica e tollerare il monitoraggio ecografico transvaginale e il recupero degli ovociti.

Gli ovociti vengono raccolti per aspirazione transvaginale seguendo gli stessi passaggi precedentemente descritti nel Capitolo 29.

30.4.2. Maschi

30.4.2.1. Tessuto testicolare

Il tessuto testicolare viene principalmente prelevato nei ragazzi in età pre-puberale quando non è possibile produrre un campione di sperma. La raccolta di tessuto testicolare può essere effettuata in qualsiasi momento. In generale, viene effettuato

un prelievo unilaterale con un massimo di metà del testicolo.

La procedura utilizzata per la biopsia testicolare nei ragazzi pre-puberi è piuttosto semplice e simile alla tecnica descritta negli adulti. Fondamentalmente, dovrebbe essere eseguita al polo cranico della gonade, per evitare danni all'arteria testicolare principale. Dopo aver effettuato un'incisione della pelle scrotale trasversale o mediana di 2-3 cm, la tunica vaginale viene aperta e la superficie laterale del testicolo viene esposta. La tunica albuginea viene incisa (lunghezza di 0,5 cm) e il testicolo viene compresso per far sporgere il tessuto testicolare. Viene quindi effettuata una biopsia di 2-3 mm³ con le forbici. La tunica albuginea e la pelle vengono poi richiuse. Oltre a essere utile per la preservazione della fertilità, la biopsia testicolare nei ragazzi pre-puberi è una procedura minore che può fornire informazioni preziose per prevedere il rischio di malignità e fertilità, come descritto in Faure *et al.* 2016 [18] (vedi anche Figura 30.3).

La quantità di tessuto prelevata per la FP avrà un effetto sulla futura produzione di testosterone e potrebbe essere necessaria una terapia di sostituzione ormonale. Tuttavia, è stato dimostrato che lo sviluppo del testicolo nei ragazzi dopo la biopsia di tessuto gonadico per la FP non ha avuto un effetto sulla crescita testicolare [19].

Un equilibrio tra la quantità di tessuto prelevata e la quantità conservata è importante per raggiungere livelli adeguati di testosterone. Poiché il volume del testicolo nei bambini molto piccoli in età pre-puberale può essere limitato, di solito si preleva un terzo del testicolo in questa popolazione di pazienti. La colorazione immunocitochimica è necessaria per valutare la presenza di cellule staminali spermatogoniali nel tessuto prelevato e conservato [20].

30.4.2.2. Spermia

I campioni di sperma vengono principalmente ottenuti tramite masturbazione. I campioni di sperma possono essere raccolti negli uomini adulti, nei ragazzi post-puberi e nei ragazzi peri-puberi se il paziente è in grado di ottenere un campione tramite masturbazione [13, 21-23]. Nei casi in cui non sia possibile produrre un campione di sperma tramite masturbazione, possono essere considerate tecniche di eiaculazione assistita come la stimolazione vibrante del pene o l'elettro-eiaculazione sotto anestesia generale come opzione di trattamento di seconda linea.

Dovrebbe essere prestata particolare attenzione a spiegare chiaramente ai ragazzi giovani post-puberi come produrre un campione tramite eiaculazione,

poiché non tutti i pazienti saranno sessualmente attivi.

30.5. Processazione

Le strutture di PMA, come i centri PMA e le banche di tessuti, possono processare e conservare tessuti gonadici, gameti e embrioni per la FP. Le tecniche di processazione e conservazione sono descritte nel Capitolo 29. Per ulteriori test microbiologici, fare riferimento al Capitolo 11. La processazione e lo stoccaggio del tessuto gonadico richiedono un istituto dei tessuti con le strutture, autorizzazioni e competenze per eseguire la procedura e trattare e conservare il tessuto. Queste sono descritte in dettaglio di seguito.

Sulla base dell'analisi del rischio e della possibilità di test per le malattie infettive (HIV, epatite), verrà eseguita la processazione e lo stoccaggio separato del materiale infettivo.

30.5.1. Femmine

30.5.1.1. Tessuto ovarico

Il tessuto ovarico dovrebbe essere trasportato in ghiaccio in un mezzo di trasporto integrato con albumina sierica [24]. Il trattamento del tessuto ovarico inizia con la biopsia ovarica o con la biscazione dell'ovaio, nel caso di ovariectomia completa. La medulla, la parte interna del tessuto ovarico, viene rimossa tramite attenta raschiatura con un bisturi per preparare il tessuto corticale con uno spessore richiesto di, in media, 1-2 mm. La corteccia viene successivamente tagliata in frammenti più piccoli (5 × 5 mm) e da 1 a 3 frammenti di tessuto ovarico vengono trasferiti in criovials, immersi in una soluzione crioprotettiva, e successivamente congelati in maniera controllata per la criopreservazione. Ogni criovial deve essere identificato inequivocabilmente [24]. La vitrificazione del tessuto ovarico è un'altra metodologia opzionale (vedi monografia 30.1) [5]. Durante il trattamento del tessuto ovarico, la medulla dovrebbe essere ulteriormente sminuzzata in piccoli pezzi in una piastra di Petri con mezzo di coltura e osservata sotto uno stereomicroscopio per la presenza di complessi cumulo-oociti (COC). Questi COC possono essere raccolti e sottoposti a maturazione *in vitro* (MIV) al fine di ottenere ovociti in metafase II che possono essere raccolti e conservati. Questa raccolta, con MIV e conservazione degli ovociti ottenuti durante il trattamento del tessuto ovarico, è considerata una tecnica di FP altamente innovativa ma ancora sperimentale, poiché finora sono stati descritti solo cinque nati vivi in Europa [25]. Tuttavia, si fa strada la possibilità di criopreservare alcuni ovociti

maturati *in vitro* nel caso di prelievo e conservazione di tessuto ovarico.

Il trasporto del tessuto prelevato da diversi centri verso un istituto dei tessuti centrale è un'opzione logistica realistica ed efficiente [24].

30.5.1.2. Ovociti

La crioconservazione degli ovociti è l'opzione privilegiata per la FP in pazienti post-pubere che possono essere sottoposte a stimolazione ovarica controllata. La vitrificazione è la tecnica d'elezione, grazie agli eccellenti risultati ottenuti nei pazienti sottoposti a FIV in termini di sopravvivenza, sviluppo embrionale e impianto [1, 26]. La metodologia è descritta nel Capitolo 29.

30.5.1.3. Embrioni

Nonostante oggi venga generalmente praticata la crioconservazione degli ovociti, anche la crioconservazione degli embrioni può essere considerata per la FP nel caso di coppie. Gli embrioni crioconservati non saranno utilizzati per scopi riproduttivi se la coppia si separa; tuttavia, la situazione può essere diversa a seconda delle regolamentazioni nazionali.

30.5.2. Maschi

30.5.2.1. Eiaculato

La crioconservazione dello sperma viene eseguita per la FP maschile negli uomini in età

post-puberale. Le caratteristiche del seme possono variare sia in base all'età del paziente che al tipo di malattia, ove i pazienti affetti da tumore testicolare presentano il seme di peggior qualità. Nei ragazzi adolescenti, in più dell'80% dei casi, lo sperma può essere crioconservato. Tuttavia, fino al 20% dei pazienti adolescenti o adulti potrebbe non riuscire a produrre un campione di sperma o potrebbe presentare azoospermia. La misurazione del volume testicolare è utile per prevedere le probabilità di recupero degli spermatozoi e della produzione di sperma negli adolescenti, i cui parametri del seme - non appena è stata avviata la spermatogenesi - sono paragonabili a quelli dei pazienti adulti, indipendentemente dalla malattia da cui sono affetti.

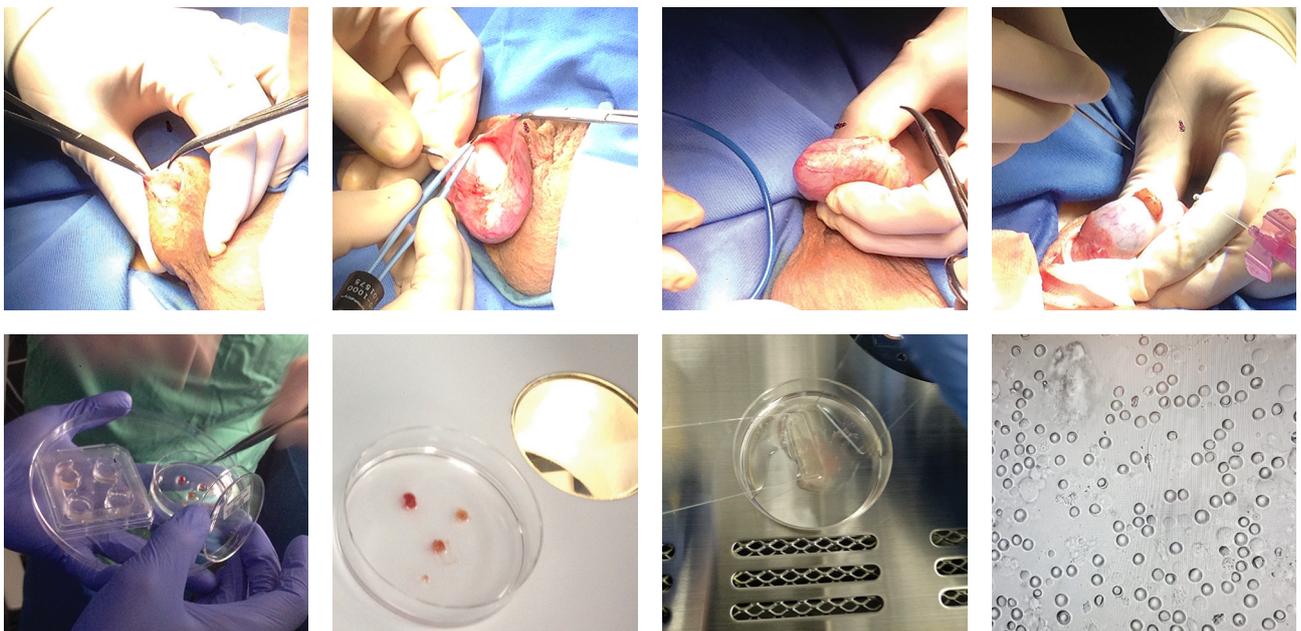
La metodologia per la criopreservazione dello sperma è descritta nel Capitolo 29.

30.5.2.2. Recupero chirurgico dello sperma dal tessuto testicolare/epididimo

In caso di pazienti pre-puberi, azoospermici o di aneiaculazione, dovrebbe essere offerta la possibilità di ottenere lo sperma tramite procedure di estrazione dello sperma. Lo sperma può essere recuperato attraverso l'aspirazione microchirurgica del fluido epididimale (microaspirazione epididimale microchirurgica, MESA) o mediante biopsia testicolare/aspirazione di sperma testicolare (TESA) o estrazione di sperma testicolare (TESE).

Figura 30.3. Biopsia testicolare convenzionale e processazione del tessuto per il recupero dello sperma

Le immagini nel pannello superiore mostrano una procedura chirurgica per l'estrazione del tessuto testicolare. Il pannello inferiore mostra i passaggi di processazione: i piccoli pezzi di tessuto vengono tagliati in pezzi più piccoli. Gli spermatozoi testicolari isolati e/o il tessuto possono essere crioconservati e scongelati per un uso futuro.



Fonte: Immagini fornite da Dina Pabón (Spagna).

Il tessuto testicolare dovrebbe essere trasportato in ghiaccio in un terreno di trasporto (ad esempio, DMEM/F12 tampone Hepes-buffered), integrato con albumina sierica (in generale, 10 % di HSA).

30.6. Biopsia testicolare convenzionale e processazione del tessuto per il recupero dello sperma

La processazione del tessuto testicolare consiste nel tagliare il tessuto in piccoli frammenti, immergere i pezzi in un terreno integrato con un crioprotettore per preservare le cellule dai danni da criogenia e quindi sottoporli a un lento congelamento controllato. Tuttavia, non esiste un protocollo standardizzato per la criopreservazione del tessuto testicolare immaturo. La maggior parte dei gruppi utilizza crioprotettori a base di DMSO (0,7-1,4 M di DMSO) con o senza aggiunta di saccarosio. Vengono principalmente utilizzati protocolli di congelamento lento. La vitrificazione può essere efficace anche quando si utilizzano dosi più elevate di crioprotettori. I flaconi/tubi vengono quindi immersi in azoto liquido o in fase di vapore. Poiché il potenziale riproduttivo del tessuto testicolare immaturo crioconservato deve ancora essere dimostrato negli esseri umani, la tecnica rimane sperimentale.

La legislazione e le raccomandazioni per la FP nei maschi differiscono tra i Paesi. Non ci sono limiti rigorosi sulla qualità dello sperma o sul numero di spermatozoi per le strategie di FP e non ci sono linee guida internazionali per la durata della conservazione degli spermatozoi, sia che siano eiaculati o ottenuti direttamente dal testicolo.

30.7. Stoccaggio

Il periodo di stoccaggio consentito per lo sperma, gli ovociti e gli embrioni crioconservati e i tessuti riproduttivi varia in base alla legislazione nazionale.

Lo stoccaggio a lungo termine di spermatozoi eiaculati o testicolari, corteccia ovarica, ovociti o embrioni non influisce negativamente sulla qualità del materiale congelato, purché sia conservato a una temperatura di ≤ -140 °C [27-31].

30.8. Applicazione clinica

30.8.1. Ripristino della fertilità femminile

Quando una paziente desidera utilizzare il proprio tessuto preservato o gli ovociti/embrioni per il trattamento di PMA, il medico che si è occupato

di somministrarle la terapia gonadotossica dovrebbe essere consultato per stabilire se è sicuro per la paziente tentare una gravidanza.

Rapporti recenti che confrontano l'efficacia della vitrificazione degli ovociti e la crioconservazione del tessuto ovarico nelle donne sottoposte a trattamenti gonadotossici mostrano una tendenza verso tassi di nati vivi più elevati dopo la vitrificazione degli ovociti [26].

Nei casi di trapianto di tessuto ovarico, questo può essere eseguito in modo ortotopico (nel rimanente ovaio o nel sito dell'ovaio rimosso) o in modo eterotopico in altri siti come la parete addominale. Queste opzioni alternative hanno implicazioni per le modalità con cui la gravidanza può essere ottenuta, spontaneamente o tramite PMA. Ci vogliono circa 20 settimane dal momento del trapianto affinché il tessuto torni attivo, come dimostrato dal ritorno delle mestruazioni e dalla produzione di estrogeni. Pertanto, il ripristino della fertilità è combinato con il ripristino dell'ambiente endocrino del paziente. Sebbene il motivo principale per l'uso del materiale riproduttivo conservato possa essere il desiderio futuro di un bambino, il ripristino della funzione endocrina potrebbe essere potenzialmente una ragione per trapiantare il tessuto ovarico. Quest'ultima opzione deve essere considerata con cautela poiché una recente revisione di Dolman *et al.* [32] ha mostrato che, su 258 pazienti sottoposte a trapianto di tessuto ovarico e per cui erano disponibili dati di follow-up, 204 hanno ricevuto una diagnosi di insufficienza ovarica prematura. Di queste, 181 (88,7 %, con una variazione dal 77,6 % al 97,2 % a seconda del centro) hanno sperimentato il ripristino della funzione endocrina ovarica, come dimostrato dalla ripresa delle mestruazioni.

Le gravidanze spontanee possono verificarsi dopo che i follicoli iniziano a maturare e la paziente riacquista il ciclo mestruale, ma talvolta può essere necessaria la FIV. La durata della funzionalità varia da pochi mesi fino a 10 anni, con una media di 3-4 anni. Se gli ovociti o gli embrioni sono stati crioconservati deve essere pianificato un ciclo di transfer degli embrioni. Se la donna è in menopausa, il suo endometrio verrà preparato con un ciclo di terapia ormonale sostitutiva.

Deve essere sottolineato che un significativo numero di donne affette da cancro al seno sperimenterà un ritorno spontaneo della funzione ovarica mesi dopo la chemioterapia. Per queste donne possono verificarsi gravidanze spontanee e potrebbe non essere necessario utilizzare i loro gameti o tessuto ovarico crioconservato [28]. Nonostante il numero di casi sia ancora limitato, alcune serie di casi impor-

tanti hanno mostrato tassi di concepimento del 29 % dopo il trapianto di tessuto ovarico. Pubblicazioni più recenti hanno rivelato tassi di nati vivi simili, pari all'11 %, sia dopo il concepimento spontaneo che dopo la FIV [26]. Le pazienti in fase pre-menarca che perdono tutto il loro tessuto ovarico a causa di chemio o radioterapia non entreranno spontaneamente in pubertà. A queste pazienti, il normale sviluppo puberale dovrà essere indotto con ormoni esogeni. Dopo la pubertà, dovranno assumere terapia ormonale sostitutiva per prevenire l'osteoporosi e migliorare il benessere generale. Più avanti nella vita, possono sottoporsi a trapianto del tessuto ovarico crioconservato per ripristinare il ciclo mestruale e/o rimanere incinte [33].

30.8.2. Ripristino della fertilità maschile

Nella maggior parte dei casi in cui si è stati sottoposti a chemioterapia e/o radioterapia, il recupero spontaneo della spermatogenesi è possibile fino a 10-15 anni dopo la fine del trattamento; tuttavia, non può essere previsto con precisione. Pertanto, dovrebbe essere offerta ai pazienti una regolare analisi del liquido seminale dopo il trattamento. Circa il 60 % dei pazienti maschi affetti da cancro affronteranno problemi di infertilità dopo la fine della terapia contro il cancro [23].

Quando vengono utilizzati campioni crioconservati, si raccomanda l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) per migliorare le probabilità di successo. Prima dell'implementazione dell'ICSI, il tasso di successo delle procedure di PMA con campioni di sperma crioconservato (IUI o IVF) era basso. Quando vengono applicate procedure di ICSI, i tassi di successo utilizzando spermatozoi crioconservati sono confrontabili con le procedure standard di FIV e ICSI in coppie infertili che utilizzano spermatozoi freschi.

30.9. Controllo qualità e valutazione del tessuto

Il controllo di qualità dopo il trapianto di tessuto include approcci mirati a ridurre il rischio di ricorrenza del cancro, massimizzando al contempo la vitalità del tessuto dopo lo scongelamento o il riscaldamento.

Poiché l'autotrapianto di tessuti crioconservati di pazienti oncologici potrebbe essere associato a un rischio di reintroduzione di cellule tumorali, sono in fase di sviluppo diversi approcci per rilevare tali cellule [34-36]. A seconda della indicazione medica per la crioconservazione del tessuto e del tipo di

malattia, la corteccia ovarica e il tessuto testicolare dovrebbero essere campionati e inviati per l'esame istologico al fine di rilevare eventuali cellule maligne.

La vitalità del tessuto ovarico dopo la crioconservazione dipende sia dai danni possibili causati dalla metodologia di crioconservazione che dalla quantità originale di follicoli primordiali. La densità follicolare nel tessuto destinato alla crioconservazione può essere valutata istologicamente per prevedere le possibilità di ripristino della funzione ovarica dopo lo stoccaggio. Tuttavia, poiché i follicoli primordiali sono spesso distribuiti in modo irregolare in tutta la corteccia ovarica, la loro assenza o scarsità in piccoli campioni esaminati non corrisponde necessariamente a una controindicazione per la crioconservazione. Dopo lo stoccaggio, il successo del trapianto della corteccia ovarica, che dipende dalla qualità e dalla quantità del tessuto reintrodotta, può essere valutato misurando la funzione endocrina rilevante e il ripristino della fertilità [33, 37].

30.10. Biovigilanza

Ogni evento o reazione avversa deve essere notificato, in base alle regole generali descritte nel Capitolo 17.

30.10.1. Femmine

Una valutazione del rischio per la reintroduzione di cellule maligne dovrebbe essere effettuata e il trapianto di tessuto deve avvenire con il consenso dell'oncologo curante. Questo è particolarmente importante nel caso della leucemia, poiché è noto che le cellule leucemiche possono risiedere nello stroma del tessuto corticale. Alle donne affette da cancro disseminato con rischio di metastasi ovariche dovrebbero essere sconsigliato il trapianto del tessuto [36]. Poiché tali trapianti sono rari, rispetto ad altre discipline, sono stati segnalati pochi casi di reazioni ed eventi avversi. Fino ad oggi, le complicazioni legate all'intervento chirurgico sono rimaste basse (circa il 3 %), sebbene sia stato pubblicato il rapporto di una complicazione grave (emorragia intra-addominale) nel 2017 [37].

Tuttavia, la segnalazione di reazioni ed eventi avversi gravi che riguardano la prole dovrebbe seguire le stesse regole usate per la PMA (Capitolo 29).

30.10.2. Maschi

Quando vengono utilizzati campioni di sperma crioconservato, la tecnica di ICSI aumenta il numero di trattamenti di PMA che possono essere eseguiti.

Non sono stati segnalati effetti negativi sulla salute della prole dalla combinazione di crioconservazione del seme e successiva PMA.

Sono stati effettuati numerosi studi sulla qualità dello sperma nell'uomo dopo il recupero spontaneo della spermatogenesi. Sia il cancro che il suo trattamento sono associati a danni al DNA dello sperma, anche se i danni al DNA indotti dal trattamento sembrano essere modesti e transitori. In uno studio su ampia scala sulla prole di maschi sopravvissuti al cancro, è stato osservato un aumento modesto ma statisticamente significativo del rischio di anomalie congenite gravi. Questo era indipendente dal fatto che lo sperma fosse stato crioconservato prima del trattamento e utilizzato per la PMA o se i bambini fossero stati concepiti naturalmente [38, 39].

Eventuali segnalazioni di reazioni e eventi avversi gravi dovrebbero seguire gli stessi criteri utilizzati per le tecniche di riproduzione assistita (Capitolo 29).

30.11. Applicazioni in via di sviluppo

30.11.1. Approcci sperimentali per le pazienti femmine

30.11.1.1. Rigenerazione degli ovociti

Nei casi in cui non esistano ovociti, si stanno conducendo, attualmente, delle indagini sulla generazione di ovociti derivati *in vitro* da cellule staminali pluripotenti: una terapia promettente seppure ancora nella sua fase iniziale.

30.11.1.2. Maturazione *in vitro*

Le pazienti femmine che desiderano effettuare la preservazione della fertilità ma non possono sottoporsi alla stimolazione ovarica e alla conservazione degli ovociti/embrioni possono considerare l'uso di ovociti immaturi. La maturazione *in vitro* può essere eseguita su follicoli antrali raccolti durante la fase follicolare o luteale [40]. Anche i follicoli di piccole o medie dimensioni possono essere ottenuti come parte della tecnica di processazione della corteccia ovarica e della medulla. L'efficacia della MIV nel contesto di tumori sensibili agli estrogeni o in donne con poco tempo per avviare la preservazione della fertilità prima di sottoporsi a trattamenti anticancro potenzialmente gonadotossici, non è ancora chiara. Attualmente, tuttavia, ci si aspetta che i tassi di successo derivanti dalla MIV siano bassi poiché la MIV non è stata ancora ottimizzata come processo di laboratorio [39, 41].

30.11.1.3. Coltura d'organo

Inoltre, si stanno esplorando altre strategie per far fronte a quei casi in cui il reimpianto è controindicato. Alcune di esse includono la crescita *in vitro* di strutture contenenti cellule della teca e follicoli primordiali insieme. Questo approccio richiederà l'uso di tecniche di MIV e di determinazione della misura in cui la crioconservazione influenzerà la vitalità follicolare [42].

Altre linee di indagine potrebbero coinvolgere anche la perfusione *in vitro* e la stimolazione ormonale dell'intero ovaio (o ovaie) rimosso della paziente, dove gli ovociti possono essere maturati, aspirati e crioconservati. Poiché non è richiesta alcuna stimolazione ovarica, queste tecniche accorcerebbero il tempo per l'inizio del trattamento oncologico della paziente, oltre a prevenire il rischio di reintroduzione di cellule maligne tramite il trapianto.

30.11.2. Approcci sperimentali per i pazienti maschi

30.11.2.1. Rigenerazione dello sperma

Lo sviluppo delle procedure utilizzate per la conservazione delle cellule staminali spermatogoniali (SSC) e dei tessuti testicolari da ragazzi e adolescenti è molto più avanzato rispetto alla ricerca sui metodi necessari per realizzare il potenziale fertile di queste cellule. In linea di principio, le strategie di ripristino della fertilità nella pratica di laboratorio includeranno l'autotrapianto di una sospensione di SSC mediante iniezione nel testicolo per ripristinare la spermatogenesi o l'autotrapianto di innesti testicolari congelati-scongelati nel testicolo o in un sito ectopico. Nel caso in cui esista un rischio di reintroduzione di cellule maligne tramite il trapianto, l'unica opzione è far crescere e maturare le SSC *in vitro*.

Il trapianto di SSC è stato originariamente descritto nel topo ed è ora uno strumento di ricerca consolidato. Le SSC vengono infuse attraverso i dotti efferenti nel rete testis, una tecnica che è stata applicata con successo in diverse specie, compresi gli esseri umani. La procedura viene meglio eseguita sotto guida ecografica e rappresenta una strategia relativamente poco invasiva per il trasferimento di cellule staminali. Tuttavia, l'efficienza di colonizzazione dopo l'infusione di cellule testicolari digerite con enzimi rimane bassa. Per future applicazioni cliniche, le SSC devono essere isolate, arricchite e propagate *in vitro* prima di poter essere autotrapiantate nel numero necessario per ri-colonizzare efficacemente il testicolo e ripristinare la spermatogenesi.

Tuttavia, il principio della procedura è stato dimostrato ed è stata generata prole da spermatogonie

trapiantate in diverse specie, compresi i primati. Sebbene la dimostrazione di spermatogenesi funzionale da donatori dopo il trapianto di SSC nei primati sia un importante traguardo per il loro utilizzo per ripristinare la fertilità umana, rimane fondamentale dimostrare che la programmazione epigenetica e la stabilità delle SSC non siano compromesse dopo la criopreservazione, la coltura e il trapianto negli esseri umani.

Il trapianto di frammenti di tessuto testicolare offre una strategia alternativa all'uso di tessuto testicolare immaturo conservato congelato. Questo approccio mantiene le SSC all'interno del loro ambiente naturale non esposto, preservando così le interazioni tra le cellule germinali e le loro cellule somatiche di supporto. Questa procedura è stata applicata con successo per recuperare spermatozoi da innesti ectopici e intra-testicolari, e studi di inseminazione utilizzando ICSI hanno dimostrato che gli spermatozoi erano in grado di sostenere lo sviluppo a termine della prole. Questa procedura è ora testata in diverse specie.

Analogamente a quanto accade nel caso degli ovociti, quando non sono disponibili cellule germinali nel prelievo iniziale del testicolo, un'opzione alternativa potrebbe essere la derivazione *in vitro* di cellule spermatiche dalle cellule somatiche del paziente, come fibroblasti della pelle, mediante pluripotenza indotta o trasdifferenziazione di queste cellule. Questo approccio è ancora in fase iniziale.

30.11.2.2. Coltura d'organo

La principale sfida che deve essere superata nei pazienti affetti da una neoplasia ematologica è il rischio di reintrodurre cellule maligne residue tramite il tessuto testicolare. I protocolli di selezione utilizzando la separazione cellulare magnetica attivata (MACS), la separazione cellulare attivata dalla fluorescenza (FACS) o la coltura differenziale hanno dimostrato un'efficienza variabile quando utilizzati per arricchire le SSC umane. Il rischio di reintroduzione di cellule maligne tramite l'innesto può essere evitato tramite la spermatogenesi *in vitro*. Gli spermatozoi derivati *in vitro*, privi di malattia residua, possono quindi essere utilizzati per inseminare gli ovociti tramite ICSI. Diverse strategie, incluse le colture bidimensionali standard, le colture tridimensionali di cellule testicolari o la coltura d'organi, sono state testate e hanno mostrato alcuni risultati promettenti. Sebbene siano stati recentemente ottenuti risultati incoraggianti riguardo alla stabilità genetica ed epigenetica delle SSC umane durante la coltura a lungo termine, la fertilità degli spermatozoi derivati *in vitro* deve ancora essere stabilita prima che il valore clinico

di questo tipo di approccio sperimentale possa essere completamente valutato.

30.12. Bibliografia

1. Cobo A, Garcia-Velasco J, Domingo J *et al.* Elective and onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod* 2018;33(12):2222-31.
2. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT *et al.* Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod* 2015;30(12):2838-45.
3. Cobo A, Giles J, Paoletti S *et al.* Oocyte vitrification for fertility preservation in women with endometriosis: an observational study. *Fertil Steril.* 2020;113(4):836-44.
4. Somigliana E, Vigano P, Filippi F *et al.* Fertility preservation in women with endometriosis: for all, for some, for none? *Hum Reprod* 2015;30(6):1280-6.
5. The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation, Anderson RA, Amant F, Braat D *et al.* ESHRE guideline: female fertility preservation. *Hum Reprod Open* 2020(4):2020, hoaa052. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa052>.
6. Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D *et al.* Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplantation* 1998;22(10):989-94.
7. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC *et al.* Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1989 Nov;1(2):75-9.
8. Julian-Reynier C. [Genetic predisposition to breast and ovarian cancer: importance of test results]. *Med Sci (Paris)* Jun/Jul 2011;27(6-7):657-61. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011276019> [in French].
9. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(2):287-302.
10. Jahnukainen K, Ehmcke J, Nurmio M, Schlatt S. Autologous ectopic grafting of cryopreserved testicular tissue preserves the fertility of prepubescent monkeys that receive sterilizing cytotoxic therapy. *Cancer Res* 2012 Oct 15;72(20):5174-8.
11. Meirou D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169(1-2):123-31.
12. Bahadur G, Ling KL, Hart R *et al.* Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum Reprod* 2002;17(12):3157-61.
13. Kliesch S, Behre HM, Jurgens H, Nieschlag E. Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Med Pediatr Oncol* 1996;26(1):20-7.

14. Fasano G, Dechene J, Antonacci R *et al.* Outcomes of immature oocytes collected from ovarian tissue for cryopreservation in adult and prepubertal patients. *Reprod Biomed Online* 2017 Jun;34(6):575-82.
15. Newton H, Aubard Y, Rutherford A *et al.* Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996;11(7):1487-91.
16. De Roo C, Tilleman K, T'Sjoen G, De Sutter P. Fertility options in transgender people. *Int Rev Psychiatry* 2016;28(1):112-19.
17. Vaiarelli A, Cimadomo D, Trabucco E *et al.* Double stimulation in the same ovarian cycle (duostim) to maximize the number of oocytes retrieved from poor prognosis patients: a multicenter experience and SWOT analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018 Jun 14;9:317. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00317>.
18. Faure A, Bouty A, O'Brien M *et al.* Testicular biopsy in prepubertal boys: a worthwhile minor surgical procedure? *Nat Rev Urol* 2016 Mar;13(3):141-50.
19. Uijldert M, Meissner A, de Melker AA *et al.* Development of the testis in pre-pubertal boys with cancer after biopsy for fertility preservation. *Hum Reprod* 2017;32(12):2366-72.
20. Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 2009 Aug;53(2):274-80.
21. Kamischke A, Jurgens H, Hertle L *et al.* Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies. *J Androl* 2004 Jul-Aug;25(4):586-92.
22. Nangia AK, Krieg SA, Kim SS. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertil Steril* 2013;100(5):1203-9.
23. Picton HM, Wyns C, Anderson RA *et al.* A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod* 2015;30(11):2463-75.
24. Vilela JMV, Dolmans M-M, Amorim CA. Ovarian tissue transportation: a systematic review. *Reproductive BioMedicine Online* 2021;42:351-65.
25. Segers I, Bardhi E, Mateizel I *et al.* Live births following fertility preservation using in-vitro maturation of ovarian tissue oocytes. *Hum Reprod* 2020 Sep 1;35(9):2026-36. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa175>. PMID: 32829388.
26. Diaz-Garcia C, Domingo J, Garcia-Velasco JA *et al.* Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 2018;109(3):478-85 e2.
27. Cobo A, Romero JL, Perez S *et al.* Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010;94(5):1903-7.
28. Dunlop CE, Brady BM, McLaughlin M *et al.* Re-implantation of cryopreserved ovarian cortex resulting in restoration of ovarian function, natural conception and successful pregnancy after haematopoietic stem cell transplantation for Wilms tumour. *J Assist Reprod Genet* 2016;33(12):1615-20.
29. Kelleher S, Wishart SM, Liu PY *et al.* Long-term outcomes of elective human sperm cryostorage. *Hum Reprod* 2001;16(12):2632-9.
30. Liu Q, Lian Y, Huang J *et al.* The safety of long-term cryopreservation on slow-frozen early cleavage human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(4):471-5.
31. Urquiza MF, Carretero I, Cano Carabajal PR *et al.* Successful live birth from oocytes after more than 14 years of cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(11):1553-5.
32. Dolmans MM, von Wolff M, Poirot C *et al.* Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertil Steril* 2021 May;115(5):1102-15. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.008>. PMID: 33933173.
33. Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM *et al.* Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol* 2016 May;17(5):567-76.
34. Mouloungui E, Zver T, Roux C, Amiot C. A protocol to isolate and qualify purified human preantral follicles in cases of acute leukemia, for future clinical applications. *J Ovarian Res* 2018 Jan 5;11(1):4.
35. Rodriguez-Iglesias B, Novella-Maestre E, Herraiz S *et al.* New methods to improve the safety assessment of cryopreserved ovarian tissue for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil Steril* 2015;104(6):1493-502, e1-2.
36. Soares M, Saussoy P, Maskens M *et al.* Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2017 Jul;178(2):231-9.
37. Jadoul P, Guilmain A, Squifflet J *et al.* Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. *Hum Reprod* 2017;32(5):1046-54.
38. Romerius P, Stahl O, Moell C *et al.* Sperm DNA integrity in men treated for childhood cancer. *Clin Cancer Res* 2010 Aug 1;16(15):3843-50.
39. Wang X, Gook DA, Walters KA *et al.* Improving fertility preservation for girls and women by coupling oocyte *in vitro* maturation with existing strategies. *Women's Health* 2016;12(3):275-8.
40. Huang JY, Chian RC, Gilbert L *et al.* Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by *in vitro* maturation and vitrification: A novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am J Surg* 2010 Jul;200(1):177-83.

41. ASRM opinion paper: Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, the Society of Reproductive Biologists and Technologists, and the Society for Assisted Reproductive Technology. In vitro maturation: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2021 Feb;115(2):298-304. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.018>. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33358333.
42. Telfer EE. Fertility preservation: progress and prospects for developing human immature oocytes *in vitro*. *Reproduction* 2019 Nov;158(5):F45-F54. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0077>.
43. Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni M *et al*. New horizons for *in vitro* spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 2009 Sep;15(9):521-9.
42. Telfer EE. Fertility preservation: progress and

Traduzione e revisione italiana a cura di: Valentina Caramia, Fiorenza Bariani, Liliam Santilli

© Centro Nazionale Trapianti (CNT), 2024