

CAPITOLO 5

GESTIONE ATTREZZATURE E STRUMENTAZIONE, TARATURA E CALIBRAZIONE STRUMENTI

PRINCIPI GENERALI

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

INDICE

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

GESTIONE ATTREZZATURE E STRUMENTAZIONE

Normative di riferimento

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



Descrizione delle attrezzature e strumentazione

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



Installazione e gestione delle attrezzature e strumentazione

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



Tracciabilità della gestione strumentazione

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

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

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

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

Laboratorio di I livello:

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

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

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

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

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

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

REQUISITI MANDATORI



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

Deve essere predisposto un piano di manutenzione programmata.

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

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

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



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

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

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

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



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

CARATTERISTICHE DELLE ATTREZZATURE

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

DEFINIZIONI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MISURAZIONE

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

AGGIUSTAMENTO

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

CAPPE A FLUSSO LAMINARE



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

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

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

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

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

FLUSSO LAMINARE VERTICALE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FLUSSO LAMINARE ORIZZONTALE

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

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

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

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

QUALIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DELLE CAPPE



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

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

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

QUALIFICA

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

MANUTENZIONI

La manutenzione ordinaria (con adeguata frequenza) deve prevedere:

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

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

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

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



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

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

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

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

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

TARATURA DELLA TEMPERATURA DELLE CAPPE

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

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

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

MICROSCOPI

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

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

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

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



Si consiglia:

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

QUALIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DEI MICROSCOPI



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

QUALIFICA DEI MICROSCOPI

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

MANUTENZIONE DEI MICROSCOPI

La manutenzione ordinaria dei microscopi prevede:

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

La manutenzione programmata dei microscopi prevede:

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



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

MICROMANIPOLATORI

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

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

- Idraulico
- Meccanico
- Elettrico

I micromanipolatori utilizzati in PMA sono principalmente:

MICROMANIPOLATORE IDRAULICO

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



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

MICROMANIPOLATORE ELETTRICO

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

MICROMANIPOLATORE MECCANICO

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

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

Manutenzione programmata dei **micromanipolatori idraulici**:

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

INCUBATORI



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



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

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

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

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

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

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

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

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

QUALIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DEGLI INCUBATORI



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



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

TIPOLOGIE DI INCUBATORI

Gli incubatori a controllo esclusivo di CO₂ consentono di regolare il pH dei mezzi di coltura, è dunque preferibile impostare generalmente la concentrazione di questo gas intorno al 6%. L'erogazione del gas agli incubatori avviene attraverso una rampa, la quale termina con un rubinetto dotato di manometro che serve a regolare la pressione del gas distribuito agli incubatori.

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

Un'altra tecnologia di incubatori permette di poter controllare anche la concentrazione di ossigeno presente nell'incubatore. Gli incubatori che si avvalgono di questa tecnologia sono gli incubatori a controllo della 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 concentrazione di O₂ di circa 6,0 ± 1,0%.

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

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

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



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

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

Manutenzione ordinaria degli incubatori:

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

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

Manutenzione programmata degli **incubatori**:

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

TARATURA DEGLI INCUBATORI

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

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

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

CO₂: $6 \pm 0,5\%$

O₂: $6 \pm 1,0\%$



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

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



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



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

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

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



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

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



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

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

FRIGORIFERI E CONGELATORI

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

MANUTENZIONE DELLE APPARECCHIATURE: FRIGORIFERI E CONGELATORI

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

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

TARATURA DELLE APPARECCHIATURE: FRIGORIFERI

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

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

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

BAGNI TERMOSTATICI

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

Manutenzione ordinaria dei **bagni termostatici**

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

Manutenzione programmata dei **bagni termostatici**

- Taratura della temperatura
- Verifica sicurezza elettrica

TARATURA DELLE APPARECCHIATURE: BAGNI TERMOSTATICI

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

PIPETTATRICI

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

Inoltre è consigliato:

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

DISPENSATORI

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

- provette
- bottiglie
- capsule di Petri.

È opportuno:

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

STRUMENTI DI MISURA PER EFFETTUARE LA TARATURA

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

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

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

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

Va inoltre controllato periodicamente:

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

CONTROLLI MICROBIOLOGICI



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

CONTROLLI MICROBIOLOGICI DELLE CAPPE

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

PIASTRE DA CONTATTO

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

PIASTRE DA SEDIMENTAZIONE

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

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

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

CONTROLLI MICROBIOLOGICI DEGLI INCUBATORI

È necessario effettuare controlli microbiologici sui ripiani degli incubatori.

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



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

PIANIFICAZIONE DELLE ATTIVITÀ

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

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

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

I *datalogger* possono essere:

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

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

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



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

MODULISTICA

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

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

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