

CAPITOLO 7

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

PRINCIPI GENERALI

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

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

INDICE

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

IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E TRACCIABILITÀ NEL LABORATORIO

PRIMA DELLA DONAZIONE

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

DURANTE LA LAVORAZIONE

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

AL TRANSFER

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

NUMERO IDENTIFICATIVO



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

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



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

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



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



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

TRACCIABILITÀ DEI GAMETI E DEGLI EMBRIONI

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



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

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

TRACCIABILITÀ DURANTE LA CRIOPRESERVAZIONE



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

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

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



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

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



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

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

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

TRACCIABILITÀ DEGLI OPERATORI



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

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

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

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

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

TRACCIABILITÀ DEL MATERIALE CRITICO

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

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

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

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



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

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

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

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

Esempio di lista del materiale e reagenti critici:

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

TRACCIABILITÀ DELLA STRUMENTAZIONE CRITICA

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

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



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

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

ANALISI DELLE FASI CRITICHE DEL PROCESSO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nella scheda di laboratorio devono essere registrati tutti i dati

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



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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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