



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi



Manuale laboratorio PMA

Manuale laboratorio PMA

Redazione: RL

Verifica: RGQ

Approvazione: RUOS

Maurizio Casavalle

Maurizio Casavalle

M. Gangemi

MAN-LAB-PMA

Azienda Ospedaliera di Padova
Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino
U.O.C. Ginecologia Ostetricia
Direttore : Prof. G.B.Nardelli

MANUALE di LABORATORIO PMA – Procreazione Medicalmente Assistita

INDICE

Esame Liquido Seminale	2
Swim-up	9
Filtrazione su Gradiente	9
Procedura IUI	11
Accettazione e Riconoscimento del Partner Maschile	12
Lavaggio e Capacitazione del Liquido Seminale	13
Procedura FIVET	14
Preparazione del Materiale	16
Ricerca e Messa in Coltura degli Ovociti	17
Accettazione e Riconoscimento del Partner Maschile	18
Lavaggio e Capacitazione del Liquido Seminale	18
Messa in Fecondazione	19
Ricerca degli Ovociti Fecondati e Messa in Coltura degli Embrioni	20
Valutazione e trasferimento Embrioni	20
Procedura ICSI	22
Preparazione del Materiale	24
Ricerca e Messa in Coltura degli Ovociti	24
Accettazione e Riconoscimento del Partner Maschile	25
Lavaggio e Capacitazione del Liquido Seminale	26
Decoronizzazione Ovociti	26
Osservazione al Microscopio Invertito e Determinazione Stadio Maturativo	27
Esecuzione ICSI	27
Ricerca degli Ovociti Fecondati e Messa in Coltura degli Embrioni	29
Valutazione e trasferimento Embrioni	29
Procedura Congelamento Lento Ovociti	31
Procedura Congelamento Rapido Ovociti	33
Procedura Vittrificazione Ovociti	35
Procedura DeCongelamento Ovociti	37

Procedura Congelamento Lento Protozigoti/Embrioni	39
Procedura DeCongelamento Rapido Protozigoti/Embrioni	41
Procedura Vittrificazione Protozigoti/Embrioni	43
Procedura DeCongelamento Protozigoti/Embrioni	
Crioconservati Mediante Vittrificazione	45
Procedura Congelamento Liquido Seminale	46
Procedura DeCongelamento Liquido Seminale	49
Procedura Prelievo TESA / PESA	50
Procedura DeCongelamento TESE / TESA / PESA	51
Procedura Trasferimento	
Verso il Nostro Centro di Materiale Biologico Crioconservato	52
Procedura Trasferimento	
Materiale Biologico Crioconservato dal Nostro Centro Verso Altri Centri	55
MANUALE DI STRUMENTAZIONE	
Allineamento Koeller-Hoffmann	58
Illuminazione di Koeller	58
Alineamento del Contrasto	59
Contrasto di Hoffmann	60
PULIZIA MICROSCOPI e STEREOMICROSCOPI	60
PULIZIA MICROMANIPOLATORE	62
MANUTENZIONE MICROMANIPOLATORE	62
PULIZIA CENTRIFUGHE	63
MANUTENZIONE CENTRIFUGA LABOFUGE 400R Function Lina-Heraeus	63
MANUTENZIONE CENTRIFUGA ALC4218	64
PULIZIA FRIGORIFERO / CONGELATORE	65
MANUTENZIONE FRIGORIFERO / CONGELATORE	66
PULIZIA CAPPE	66
MANUTENZIONE CAPPE	67
PULIZIA INCUBATORI	68
MANUTENZIONE INCUBATORI	69
PULIZIA SISTEMA C.A.S.A.	74
MANUTENZIONE TERMOMETRI	75
MANUTENZIONE GAS ANALIZZATORE	76
AZOTO LIQUIDO	76
PULIZIA STANZA BIOLOGICA	78
PROGRAMMI MINICOOL 40 PC AIR LIQUIDE	79
MODALITA' DI ACCESSO	80
ABBIGLIAMENTO	81
CALZATURE / CUFFIE / MASCHERINE	82
GUANTI / IGIENE / COSMESI del PERSONALE	83
COMPORAMENTI IN AMBIENTE	84
PROCEDURA VESTIZIONE	85
PROCEDURE PER ORDINI MATERIALE	86



Manuale laboratorio PMA

ESAME LIQUIDO SEMINALE

Materialè necessario

MATERIALE / ATTREZZATURE	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Provette coniche sterili	15 ml	Magazzino generale
Pipette Pasteur	Falcon plastica 3 ml	"
Barattolo sterile tappo rosso	100 ml	Magazzino Farmacia
Siringhe atossiche	1 ml	Ufficio approvvigionamenti
1 cappa sterile Telstar Bio-II-A	Flusso laminare verticale	Ingegneria Clinica
1 termostato ad aria	Aria; 37°C	Ingegneria Clinica
1 centrifuga Heraeus labofughe 400R	0-2500 rpm / 0-600 g refrigerata	Ingegneria Clinica
1 microscopio Nikon Eclipse E400	Contrasto di fase con oculare reticolato	Ingegneria Clinica
Sistema Hamilton Thorne (C.A.S.A.)	Vetrini 12 micron cod. DZG3606	Ingegneria Clinica
Vetrini Menzel - Glaser	76 x 26 mm ground edges/frosted end	Ufficio approvvigionamenti
Copri-vetrini Menzel - Glaser	24 x 50 mm	"
Vetrini per morfologia Testsimplets		"
Cartina misura pH 6,4 - 8,0 Merk		Magazzino farmacia
Camera di Makler		Ingegneria Clinica

Terreni necessari

TERRENI / DITTA	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Sperm Preparation Medium Medicult-Origio cod. D2VS005	Terreno di lavaggio	Farmacia
Isolate - Irvine Scientific cod. D6SI001	Terreno di selezione spermatica	Farmacia



Manuale laboratorio PMA

1) Accettazione del paziente:

il paziente accede al laboratorio previo appuntamento e dopo aver osservato un periodo di astinenza dall'ultima eiaculazione di tre giorni.

L'accettazione prevede il controllo dei dati anagrafici del paziente e la compilazione del foglio di lavoro in cui vanno indicati per entrambi i partner: nome, cognome, data di nascita, codice fiscale, indirizzo e numero spermioγραμμα. I dati che vanno riportati su un barattolo sterile tappo rosso per la raccolta del campione sono: nome e cognome del paziente maschile, data e numero dello spermioγραμμα diagnostico;

2) Raccolta del campione:

al paziente viene consegnato il contenitore con i propri dati identificativi ed una monodose di sapone disinfettante (clorexidina gluconato 0,015% + cetrimide 0,15%) per la toilette. Viene quindi accompagnato nei locali dedicati alla raccolta del campione.

La raccolta avviene per ipsazione ed il campione va posto entro 30 minuti in termostato a 37°C per evitare escursioni termiche che potrebbero deteriorarne la qualità.

E' necessario accertarsi che il paziente non abbia perso parti dell'eiaculato durante la raccolta. Eventuali perdite vanno segnalate sul foglio di lavoro.

Eventuali difficoltà del paziente nel raccogliere il campione vanno segnalate nel foglio di lavoro;

3) Firma, da parte del paziente, del consenso che autocertifica di avere consegnato il proprio liquido seminale prodotto nei locali del laboratorio stesso; nei rari casi eccezionali in cui la raccolta del materiale biologico avvenga al di fuori dei locali del laboratorio, verrà firmato un consenso dichiarante la proprietà del materiale ottenuto al di fuori dei locali del Centro;

4) Analisi:

La fase analitica viene suddivisa in due momenti distinti: valutazione macroscopica e microscopica.



Manuale laboratorio PMA

La **valutazione macroscopica** prevede la registrazione dei seguenti parametri:

- Volume: misurato tramite pipetta sterile - valori di riferimento $\geq 1,5$ ml e $6,0$ ml*
- pH: misurato tramite cartina tornasole, range 5,5-9 - valore di riferimento $\geq 7,2^*$
- Colore: grigio opalescente - trasparente – giallastro – ematico
- Coagulo dopo eiaculazione: si segnala la presenza o meno del coagulo
- Liquefazione dopo 30 minuti: completa - incompleta
- Viscosità: si segnala la lunghezza in cm di eventuale filamento osservato tramite percolamento del liquido seminale da una provetta Pasteur.

La **valutazione microscopica** viene fatta tramite microscopio a contrasto di fase (oculare 10x ed obiettivo ad immersione 100x) e deve essere sempre eseguita al termine dei processi di fluidificazione del campione.

Alcuni parametri microscopici possono essere indagati tramite metodica Computer Assisted Sperm Analyzers (C.A.S.A.).

A tal proposito 20 μ l di campione vengono caricati in apposito vetrino e si procede all'analisi computerizzata del campione. L'analisi viene condotta su 5 differenti campi selezionati dall'operatore.

E' così possibile valutare i seguenti parametri:

- Concentrazione spermatica (10^6 /ml) - valori di riferimento ≥ 15 e 169^* .

Nel caso in cui la valutazione tramite C.A.S.A. indichi una presenza molto bassa di spermatozoi, si ricorre alla lettura della concentrazione in camera di Makler (sensibilità pari a 100.000 cellule) o camera di Neubauer (in cui 1 spermatozoo nelle due griglie corrisponde a 5.000 cellule per ml). Se non si rilevano spermatozoi nelle camere di conta i campioni vengono centrifugati per 10 minuti a 3600 giri e risospesi in 100 μ l di surnatante. Vengono quindi osservati 10 μ l su un vetrino cercando l'eventuale presenza di spermatozoi. In caso negativo si procede alla "lettura su goccia"; posizionando una goccia (10 μ l) di campione all'interno di una piastra Petri 3,5 cm, ricoperta di



Manuale laboratorio PMA

olio di paraffina (Paraffin Oil Medicult Origio), ed osservandola al microscopio invertito (oculare x ed obiettivo 40x) si definisce l'eventuale presenza di spermatozoi come spermatozoi/campo a 40x.

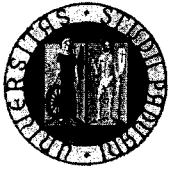
▪ Motilità

La motilità degli spermatozoi viene espressa in tre classi:

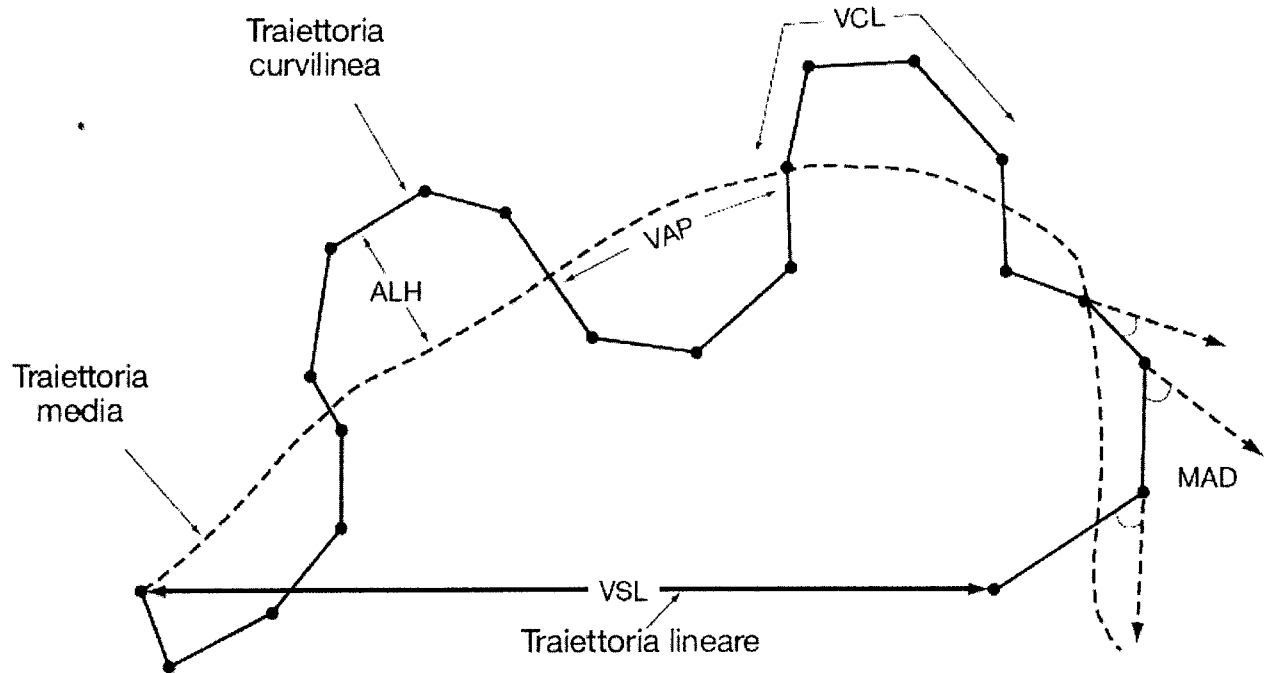
- progressiva (PR, %) valori di riferimento ≥ 32 e $\geq 69^*$
- non progressiva (NP, %)
- assente (IM, %)

Oltre a queste, la tecnologia C.A.S.A. permette di valutare:

- VAP, velocità media della testa di uno spermatozoo lungo la sua traiettoria media ($\mu\text{m/s}$).
- VSL, velocità media della testa di uno spermatozoo lungo la linea retta della sua posizione di partenza ($\mu\text{m/s}$).
- LIN, linearità di una traiettoria curvilinea (VSL/ VAP).
- ALH, grandezza dello spostamento laterale della testa di uno spermatozoo lungo la sua traiettoria media.



Manuale laboratorio PMA



Nel caso in cui la valutazione tramite C.A.S.A. indichi una presenza molto bassa di spermatozoi, si ricorre alla lettura della motilità in camera di Makler esprimendola in percentuale.

Ogni giorno almeno 1 campione è sottoposto parallelamente ad un conteggio manuale; se la differenza tra i due conteggi supera il 20%, si chiama il tecnico per un controllo.

▪ Vitalità

Test per la valutazione dell'integrità cellulare dello spermatozoo. Si pongono 10 μ l di liquido seminale su vetrino a cui si aggiungono 10 μ l di eosina (soluzione al 0,5%W/V in terreno di coltura). Si mescola con vetrino copri-oggetto e si effettua la lettura al microscopio a 40X. Si contano gli spermatozoi morti (colorati in rosso) e quelli vivi (colorati di bianco). Se la percentuale di cellule vive risulta inferiore al 50% si parla di necrozoospermia.



Manuale laboratorio PMA

▪ Swelling test

Il test di rigonfiamento osmotico indaga l'integrità funzionale della membrana. Si esegue mescolando 0,1 ml di liquido seminale con 1 ml di soluzione di swelling ed incubando per almeno 30 minuti a 37°C. La lettura si effettua distinguendo gli spermatozoi normali da quelli rigonfiati e esprimendo i risultati in percentuale.

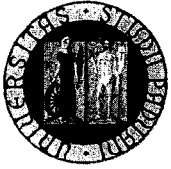
Preparazione soluzione di swelling:

0,735 g di citrato di sodio e 1,351 g di fruttosio vanno disciolti e portati a 100 ml con acqua distillata. Filtrare la soluzione con filtri Millipore 0,22 µ e conservare a 4°C in aliquote da 1 ml.

▪ Morfologia

La valutazione morfologica si basa sulla distinzione tra forme tipiche e forme atipiche. Le forme atipiche possono interessare sia la testa, che il collo, che i flagelli e, generalmente, comprendono:

TESTA	COLLO	FLAGELLI
Macrocefali	Resti citoplasmatici	Doppi
Microcefali	Angolati	Arrotolati
Amorfe		Isolati
Allungate		Corti
Rotonde		
Assenti		
Doppie		
Isolate		



Manuale laboratorio PMA

La lettura viene eseguita su vetrino precolorato (Testsimplets) dopo avervi posto una goccia di liquido seminale e averla coperta con coprioggetto. Il vetrino viene lasciato a riposo per 15 minuti e poi letto al microscopio in immersione (100X).

In ogni serie di osservazioni si includono almeno tre vetrini anonimi presentanti gradi variabili di teratozoospermia (severa, moderata, leggera) per i quali la morfologia è già stata valutata in modo da verificare le variazioni inter ed intra individuali nella stima del tasso di forme normali. Si può ammettere un errore massimo del 10%.

▪ Immunobead test (IBT)

La ricerca di autoanticorpi delle classi IgA e IgG viene indagata mediante utilizzo di apposito Kit.

Preparazione delle immunosferette:

Aggiungere ml di soluzione di lavaggio a mg di sferette. Mescolare bene. Centrifugare a 600 g per minuti. Eliminare il surnatante. Risospendere in 20 ml di soluzione di lavaggio e preparare aliquote di 100 µl nelle provette Eppendorf. Congelare a -20° C. Al momento dell'utilizzo le eppendorf contenenti le aliquote per l' Immunobead test verranno spostate dal -20°C e lasciate a 37°C per almeno 30 minuti.

Test diretto:

20 µl di spermatozoi lavati con swim-up o filtrazione su doppio gradiente vengono aggiunti alla sospensione di 100 µl di immunosferette in provetta Eppendorf. Mescolare e depositare 20 µl di soluzione tra vetrino e coprioggetto. Indagare al microscopio a contrasto di fase la percentuale di spermatozoi che presentano sferette attaccate a livello di testa, collo, flagello.

Valori normali: <10 %;

5) Selezione nemaspermica:

Le metodiche di selezione nemaspermica hanno lo scopo di separare gli spermatozoi dal plasma seminale e di ottenere una sospensione finale concentrata di spermatozoi mobili.

Al termine del trattamento è necessario rivalutare i parametri seminali di concentrazione e motilità per giudicare la procedura attuata.



Manuale laboratorio PMA

E' possibile effettuare la selezione nemaspermica mediante tecnica di swim-up o di filtrazione su gradiente;

SWIM – UP

Questa metodica può essere utilizzata quando lo sperma nativo presenta una concentrazione ≥ 15 milioni/ml, una percentuale di forme mobili $\geq 32\%$, una viscosità $< 2\text{cm}$.

Le operazioni vanno realizzate sotto cappa a flusso laminare.

- Preriscaldare il terreno di coltura a 37°C (Sperm Preparation Medium Medicult Origio);
- Depositare sterilmente 2 ml di terreno di coltura in tubo Falcon da 13 ml, fondo tondo;
- Con l'aiuto di una pipetta sterile da 1 ml, depositare sul fondo della provetta 1 ml di sperma (se necessario si possono preparare più provette in parallelo);
- Depositare la provetta nell'incubatore a 37°C con posizione inclinata di 45° . Lasciare incubare per 30 – 60 minuti;
- Con l'aiuto di una pipetta sterile da 2 ml, prelevare 1 ml del surnatante;
- Depositare questa frazione in una provetta conica da 15 ml ed aggiungere 1 ml di terreno di coltura. Centrifugare a 200 - 250 g per 5 minuti;
- Eliminare il sopranatante e risospendere il fondo in 0,25 ml di terreno di coltura; Procedere alla seconda determinazione di concentrazione e motilità (vedi protocolli relativi).

FILTRAZIONE SU GRADIENTE

Le operazioni vanno realizzate sotto cappa a flusso laminare.

- Depositare in una provetta conica 1 ml di terreno a densità minore (50%) (Sperm Preparation Medium *Upper Layer* Isolate Irvine Scientific);
- Con l'aiuto di una pipetta sterile depositare sul fondo della stessa provetta 1 ml di terreno a densità maggiore (90%) (Sperm Preparation Medium *Lower Layer*- ISOLATE);



Manuale laboratorio PMA

- Con l'aiuto di una pipetta sterile depositare delicatamente 2 ml di sperma nativo sopra il doppio gradiente precedentemente allestito;
- Centrifugare per 20 minuti a 300 g;
- Eliminare il sopranatante e risospendere il pellet in una nuova provetta con 2 ml di terreno di lavaggio (Sperm Preparation Medium - Origio);
- Centrifugare a 200 - 250 g per 5 minuti;
- Eliminare il sopranatante e risospendere il fondo con 250 µl di terreno di lavaggio (Sperm Preparation Medium - Origio);
- Procedere alla seconda determinazione di concentrazione e motilità (vedi protocolli relativi);

All'interno del nostro Laboratorio la metodica più comunemente utilizzata è la filtrazione su gradiente; la preparazione standard del campione seminale da utilizzare in PMA, dovrebbe basarsi sempre sull'applicazione di gradienti di densità perché, oltre a separare la popolazione spermatica di interesse, rimuovono o riducono fortemente la carica di agenti infettivi. La centrifugazione diretta del seme non viene eseguita in quanto sconsigliata perché tale trattamento potrebbe generare un danno agli spermatozoi per effetto delle specie reattive dell'ossigeno (R.O.S.) rilasciate da eventuali spermatozoi immaturi o globuli bianchi. Lo *swim-up* da seme non trattato non viene eseguito in quanto il rischio di contaminazione da plasma seminale ed eventuali agenti infettivi è elevato.

N.B. Al termine dall'analisi diagnostica del liquido seminale, il materiale biologico viene totalmente eliminato.

6) Refertazione:

Tutti i dati indagati e contenuti sulla scheda lavoro vanno riportati sul database informatico del laboratorio (programma MediTex) per la stampa del referto.



Manuale laboratorio PMA

Copia cartacea del referto va inserita nella cartella del paziente. Il foglio di lavoro va conservato, con numero progressivo, nell'apposito raccoglitore del laboratorio.

* Valori di riferimento secondo le indicazioni WHO 2010 relativi al 5° e 90° percentile della popolazione fertile.

PROCEDURA IUI

PRINCIPIO

L'inseminazione è una tecnica di procreazione medicalmente assistita ampiamente utilizzata e rispettosa delle fisiologiche tappe dei processi di fecondazione dell'ovocita. L'aiuto del medico consiste nell'identificazione del periodo ovulatorio e nell'inserimento in utero del liquido seminale opportunamente trattato. Si effettua una induzione dell'ovulazione il cui obiettivo è quello di portare a maturazione 2-3 follicoli per aumentare la possibilità che almeno uno di essi venga fecondato. Per mezzo del monitoraggio follicolare ecografico si stabilisce il momento più opportuno per indurre l'ovulazione (mediante somministrazione di hCG) e dopo 24-48 ore si procede all'inseminazione. Il giorno dell'inseminazione, il liquido seminale, raccolto mediante masturbazione, subisce un trattamento attraverso il quale vengono selezionati gli spermatozoi migliori. L'inseminazione vera e propria si esegue con un sottile catetere che, attraverso il collo uterino, deposita nella cavità uterina una piccola quantità (0,20 - 0,25 μ l) di liquido seminale. Le indicazioni all'inseminazione intrauterina sono:

1. Sterilità idiopatica
2. Infertilità maschile di grado lieve-moderato
3. Anovulazione cronica



Manuale laboratorio PMA

Materiale necessario

MATERIALE	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Provette coniche sterili	15 ml	Magazzino generale
Pipette sterili monouso	1 ml; 2 ml	"
Pipette Pasteur	Falcon plastica 3 ml	"
Barattolo sterile tappo rosso	100 ml	Magazzino Farmacia
Siringhe atossiche	1 ml	Ufficio approvvigionamenti
1 cappa sterile K System	Flusso laminare verticale	Ingegneria Clinica
1 termostato ad aria	Aria; 37°C	Ingegneria Clinica
1 centrifuga Heraeus labofughe 400R	0-2500 rpm / 0-600 g refrigerata	Ingegneria Clinica
1 microscopio Nikon Eclipse E400 a contrasto di fase	Contrasto di fase	Ingegneria Clinica
Sistema Hamilton Thorne (C.A.S.A.)	Vetrini 12 micron cod. DZG3606	Ingegneria Clinica
Catetere per IUI	Cod. 4220 Biocare Europe sas	Ufficio approvvigionamenti

Terreni necessari

TERRENI / DITTA	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Sperm Preparation Medium Medicult-Origio cod. D2VS005	Terreno di lavaggio	Farmacia
Isolate - Irvine Scientific cod. D6SI001	Terreno di selezione spermatica	Farmacia

PROCEDURA

Accettazione e riconoscimento del partner maschile

Il partner della Signora sottoposta alla procedura di IUI viene ricevuto, alle ore 08.30, presso il laboratorio del Centro PMA.

L'accettazione consiste nel:

- controllo dei dati anagrafici della coppia (nome, cognome, data di nascita, C.F.);



Manuale laboratorio PMA

- contrassegno, con i nomi e cognomi della coppia e numero spermogramma della coppia, del contenitore sterile (barattolo sterile con tappo rosso) utilizzato per la raccolta del liquido seminale.

La raccolta avviene per ipsazione all'interno in appositi locali adiacenti al laboratorio. Il campione raccolto in attesa di essere processato viene mantenuto in termostato a 37°C.

Il paziente, alla consegna del materiale seminale, firma un'autocertificazione, dichiarante la proprietà del campione biologico consegnato, e la destinazione di esso (tecnica di Procreazione Medicalmente Assistita). L'operatore che accetta il materiale controfirma e segna l'ora.

Astenersi da tutti i rapporti sessuali per i 2 giorni precedenti la raccolta. Notare che questo intervallo deve essere rispettato poiché un'astinenza prolungata può causare una qualità peggiore del campione.

Lavaggio e capacitazione del liquido seminale

Tutte le procedure riguardanti la valutazione ed il trattamento dei campioni di liquido seminale vengono condotte seguendo le linee guida del "Manuale di laboratorio per l'analisi del liquido seminale umano" del World Health Organization (WHO; 2010)

1. la selezione degli spermatozoi mobili viene realizzata mediante tecnica di filtrazione su doppio gradiente isotonic discontinuo, in quanto questa tecnica ci permette di rimuovere fortemente l'eventuale carica di agente infettivi;
2. Una volta effettuato il lavaggio e la selezione spermatica, le provette contenenti il campione, vengono etichettate con i nomi e cognomi della coppia, data e numero spermogramma della coppia e vengono mantenute nel termostato fino al momento dell'utilizzo;
3. L'eventuale liquido seminale non utilizzato nel trattamento di IUI, viene eliminato.



Manuale laboratorio PMA

N.B. Le seguenti fasi: accettazione del campione biologico, spostamento del campione dal contenitore sterile tappo rosso alla provetta con il doppio gradiente, spostamento del campione dalla prima provetta alla seconda (lavaggio), essendo **punti critici**, vengono eseguite con il controllo dei dati della coppia, da parte di due operatori.

PROCEDURA FIVET

PRINCIPIO

La stimolazione ovarica di un ciclo di fecondazione in vitro con FSH è indispensabile e conduce alla formazione di molteplici follicoli con diametro di 16-18 mm dopo 10-13 giorni. Questi follicoli vengono punti per via trans-vaginale sotto guida ecografica 36 ore dopo l'induzione dell'ovulazione con l'hCG. I liquidi follicolari vengono opportunamente trasferiti in provette sterili, inseriti nell'incubatore portatile a temperatura di 37 °C, inviati nel più breve tempo possibile (2-3 minuti max) al laboratorio del centro ed analizzati per il recupero dei complessi cumulo-ovocita. Lo sperma del partner maschile della paziente sottoposta a prelievo ovocitario viene preparato in laboratorio. I complessi cumulo-ovocita sono messi in coltura ed incubati con il liquido seminale preparato. Il giorno successivo (16-18 ore dopo la messa in coltura dei due gameti), gli ovociti che presentano 2 nuclei aploidi sono identificati e trasferiti in un mezzo di coltura fresco (ISM1 Medicult Origio). Dopo 24 ore di coltura gli embrioni vengono osservati, classificati, spostati in terreno fresco (UTM Medicult Origio) e quindi trasferiti in utero della paziente.

Esiste la possibilità di criocongelare gli embrioni (vedi paragrafo "Crioconservazione prozigoti/embrioni).



Manuale laboratorio PMA

Materiale necessario

MATERIALE / ATTREZZATURE	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Piastre Petri	10 cm; 3,5 cm	Magazzino generale
Micropipettatore EasyLab	Regolabile 1-10 ml	"
Provette coniche sterili	Falcon 15 ml fondo conico	"
Provette sterili a fondo rotondo	Falcon 4 ml Falcon 15 ml	"
Pipette sterili monouso	1 ml; 2 ml	"
Pipette Pasteur	Vetro sterilizzato Falcon plastica 3 ml	"
Barattolo sterile tappo rosso	100 ml	Magazzino Farmacia
Siringhe atossiche	10 ml	Ufficio approvvigionamenti
Piastre a 4 pozzetti Nunc	4 pozzetti da 1 ml	"
Capillari in policarbonato Origio	130 um; 150 um; 175 um	"
Catetere per E.T. Cook K-JETS-7019-SIVF	Con guida	"
2 cappe sterili K-System	Flusso laminare verticale	Ingegneria Clinica
3 incubatori Astec	37°C, 95% Umidità, 5% CO ₂ , 5% O ₂	Ingegneria Clinica
2 incubatore Heraeus Cytoperm2	37°C, 95% Umidità, 5% CO ₂ , 5% O ₂	Ingegneria Clinica
1 centrifuga Heraeus labofughe 400R	0-2500 rpm / 0-600 g refrigerata	Ingegneria Clinica
2 microscopi invertiti: Nikon TE2000-S, Nikon TE200	20 X; piano riscaldato	"
2 stereomicroscopi: Leica WildMZ8; Nikon SMZ800		"
1 termostato ad aria	37 °C	"
1 Frigorifero Liebherr		"
1 cappa a flusso laminare orizzontale Helios		"
1 stereomicroscopio Nikon SMZ645		"



Manuale laboratorio PMA

Terreni necessari

TERRENI / DITTA	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Flushing Medium Medicult – Origio	Terreno di lavaggio	Farmacia
IVF Medicult – Origio	Terreno di coltura/lavaggio	“
ISM1 Medicult – Origio	Terreno di coltura	“
UTM Medicult – Origio	“	“
Isolate Irvine Scientific	Terreno di selezione spermatica	“

Osservazioni preliminari

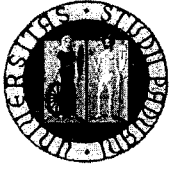
1. tutti i terreni, di coltura e di lavaggio, e gli strumenti di plastica/vetro devono essere preparati precedentemente alla Procedure FIVET;
2. deve essere noto che i parametri temperatura e luce devono essere costantemente monitorati e mantenuti a livelli ottimali prima e durante l'intera Procedura FIVET: gli ovociti devono essere infatti mantenuti ad una temperatura compresa tra 37°C e +/- 0,5 °C. Si eviti un'esposizione del materiale biologico a luce intensa e/o in modo prolungato (es. esposizione sotto il microscopio). Si riduca al minimo la permanenza del materiale biologico fuori dall'incubatore.

PROCEDURA

Preparazione del materiale

Il giorno prima della Procedura FIVET preparare:

- piastre Petri 3,5 cm con 3 ml di IVF per il lavaggio dei complessi cumulo-ovocita da equilibrare una notte in incubatore a 37°C, 5% di CO₂, 5% di O₂ e 95% di umidità;
- piastre Nunc a 4 pozzetti con 0,9 ml di IVF. Da equilibrare una notte in incubatore a 37°C 5% di CO₂, 5% di O₂ e 95% di umidità;



Manuale laboratorio PMA

- provette fondo tondo da 5 ml con 1,5 ml di terreno di lavaggio Flushing riscaldato a 37%. Il numero di provette e di piastre deve essere valutato in base all'ecografia del giorno prima del prelievo ovocitario.

Ricerca e messa in coltura degli ovociti

1. I liquidi follicolari vengono recuperati in sala operatoria. In prossimità del termine dell'intervento, l'operatore medico avvisa telefonicamente il laboratorio. Dal laboratorio, il biologo, utilizzando un apposito incubatore da trasporto riscaldato a 37°C (modello K-System), si reca nell'area filtro della sala operatoria per prelevare le provette della paziente sottoposta a prelievo ovocitario. Il trasporto deve essere quanto più rapido possibile e non deve superare i 2 – 3 minuti;
2. Successivamente ogni singola provetta di liquido follicolare viene svuotata sotto cappa a flusso laminare con piano riscaldato a 37°C, in una piastra Petri da 10 cm ed analizzata nel suo contenuto;
3. I complessi cumulo-ovocita recuperati al microscopio con l'utilizzo di una pipetta Pasteur sterile, vengono trasferiti per essere lavati in una piastra Petri da 3,5 cm contenente terreno di lavaggio IVF;
4. I complessi cumulo-ovocita recuperati vengono lavati una seconda volta in una piastra Petri da 3,5 cm e trasferiti nelle piastre Nunc di coltura a 4 pozzetti in ragione di un cumulo per pozzetto;
5. Le piastre di coltura vengono contrassegnate con il nome e cognome della paziente ed il numero spermogramma della coppia e trasferite nell'incubatore a 37°C, 5% di CO₂, 5% di O₂ e 95% di umidità;



Manuale laboratorio PMA

Accettazione e riconoscimento del partner maschile

Il partner della Signora sottoposta a *pick-up* ovocitario viene ricevuto, alle ore 10.00, presso il laboratorio del Centro PMA.

L'accettazione consiste nel:

- controllo dei dati anagrafici della coppia (nome, cognome, data di nascita, C.F. della coppia);
- contrassegno, con i nomi e cognomi della coppia, data e numero spermogramma della coppia, del contenitore sterile (barattolo sterile con tappo rosso) utilizzato per la raccolta del liquido seminale;
- Astenersi da tutti i rapporti sessuali per i tre giorni precedenti la raccolta. Notare che questo intervallo deve essere rispettato poiché un'astinenza prolungata può causare una qualità peggiore del campione.

La raccolta avviene per ipsazione all'interno in appositi locali adiacenti al laboratorio. Il campione raccolto in attesa di essere processato viene mantenuto in termostato a 37°C.

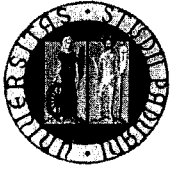
Il paziente, alla consegna del materiale seminale, firma un'autocertificazione, dichiarante la proprietà del campione biologico consegnato, e la destinazione di esso (tecnica di Procreazione Medicalmente Assistita). L'operatore che accetta il materiale controfirma e segna l'ora.

Lavaggio e capacitazione del liquido seminale

Tutte le procedure riguardanti la valutazione ed il trattamento dei campioni di liquido seminale vengono condotte seguendo le linee guida del "Manuale di laboratorio per l'analisi del liquido seminale umano" del World Health Organization (WHO; 2010)

1. la selezione degli spermatozoi mobili viene realizzata mediante tecnica di filtrazione su doppio gradiente isototonico discontinuo;

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

2. La sospensione degli spermatozoi ottenuti viene diluita ad una concentrazione 10x superiore alla concentrazione finale. La scelta della concentrazione ottimale viene fatta in funzione della mobilità degli spermatozoi;
3. le provette contenenti il liquido seminale vengono etichettate con i nomi e cognomi della coppia e numero spermioγραμμα della coppia e quindi conservate nell'incubatore fino al momento dell'utilizzo.
4. L'eventuale liquido seminale non utilizzato per il trattamento FIVET, viene eliminato.

(approfondimenti al capitolo Spermioγραμμα diagnostico).

Messa in fecondazione

1. 4-6 ore dopo il recupero degli ovociti aggiungere 0,1 ml della sospensione opportunamente diluita di spermatozoi al contenuto di ogni pozzetto. Poichè i pozzetti contenenti i complessi cumulo-ovocita contengono 0,9 ml di terreno, gli spermatozoi sono diluiti ulteriormente 10 volte. L'intera operazione viene effettuata sotto cappa a flusso laminare con piano riscaldato. **È rigorosamente vietato avere sotto la cappa i gameti di coppie diverse. Verificare prima dell'inseminazione che i nomi scritti nelle piastre di coltura corrispondano alle etichette delle provette contenenti il liquido seminale;**
2. Si esamina al microscopio invertito il contenuto di ogni pozzetto e si annota il grado di maturità o le caratteristiche di ogni complesso cumulo-ovocita;
3. Si verifica la presenza di spermatozoi mobili in tutti i pozzetti contenenti il complesso cumulo-ovocita;
4. Si trasferiscono le piastre di coltura, contrassegnate con il nome, cognome della paziente, e numero spermioγραμμα della coppia, nell'incubatore, fino al giorno successivo;
5. Nel caso in cui non si fosse recuperato alcun ovocita, non verrà richiesta la raccolta del liquido seminale della coppia;



Manuale laboratorio PMA

6. Nel caso in cui ci fossero ovociti sovrannumerari (minimo tre), con caratteristiche morfologiche e maturative idonee, si procede, previo consenso da parte della paziente, con la crioconservazione degli stessi utilizzando la tecnica del congelamento lento o la vitrificazione (vedi paragrafo "Crioconservazione ovociti"). Gli ovociti sovrannumerari, non idonei alla fecondazione o alla crioconservazione, vengono eliminati.

Ricerca degli ovociti fecondati e messa in coltura degli embrioni

1. 16-18 ore dopo l'inseminazione gli ovociti vengono liberati, utilizzando specifici capillari in policarbonato con diametro da 150 um, dalle cellule del cumulo e trasferiti in piastre contenenti terreno di coltura ISM1;
2. Gli ovociti fecondati sono individuati al microscopio invertito. Si ricerca la presenza dei 2 pronuclei ben visibili e dei due globuli polari distinti;
3. Gli ovociti fecondati vengono trasferiti in piastre di coltura contenenti mezzo di coltura fresco. Si contrassegnano le piastre di coltura con il nome, il cognome della paziente ed il numero dello spermogramma, e vengono trasferite nell'incubatore fino al giorno successivo.

Valutazione e trasferimento embrioni

1. dopo 24 ore di coltura, gli embrioni vengono osservati al microscopio. Per ogni embrione si annota il numero dei blastomeri, la loro dimensione e la presenza o meno di frammenti anucleati ed in base a queste caratteristiche sono classificati secondo 5 diversi gradi di valutazione, secondo lo standard corrente dei criteri morfologici usati nella valutazione della qualità embrionale (grading embrioni);
2. Gli embrioni vengono trasportati in sala transfer mediante il mini-incubatore K-System da trasporto con temperatura, % di CO₂ e umidità controllate;
3. Subito prima del transfert il Biologo effettua il riconoscimento della coppia (nome, cognome, data di nascita) che si sottoporrà al trasferimento embrionale;



Manuale laboratorio PMA

4. Si trasferiscono gli embrioni su apposito catetere per embryo transfert e si consegna al medico;
5. una volta realizzato il transfert, per controllare che effettivamente gli embrioni siano stati trasferiti, sotto cappa a flusso laminare, mediante stereomicroscopio, si controlla che non siano rimasti embrioni nel catetere.

Lo score utilizzato è il seguente:

Grado I: blastomeri di uguale dimensione, assenza di frammenti;

Grado II: blastomeri di uguale dimensione con presenza di frammenti anucleati occupanti <20% del volume totale;

Grado III: blastomeri ineguali, con frammentazione compresa tra il 25% ed il 50%;

Grado IV: blastomeri ineguali con frammentazione compresa tra il 55% ed il 70%;

Grado V: blastomeri ineguali con frammentazione compresa tra il 75% ed il 90%.

Esiste la possibilità di criocongelare gli embrioni (vedi paragrafo "Crioconservazione prozigoti/embrioni").

N.B. Le seguenti fasi:

liquido seminale: accettazione del campione biologico, spostamento del campione dal contenitore sterile tappo rosso alla provetta con il doppio gradiente, spostamento del campione dalla prima provetta alla seconda (lavaggio);

messa in fecondazione: scelta dall'incubatore del campione seminale e della piastra Nunc contenente gli ovociti;

trasferimento embrionario: scelta dall'incubatore della piastra Nunc;

essendo **punti critici**, vengono eseguite con il controllo dei dati della coppia, da parte di due operatori.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA ICSI

PRINCIPIO

La stimolazione ovarica di un ciclo di fecondazione in vitro con FSH è indispensabile e conduce alla formazione di molteplici follicoli con diametro di 16-18 mm dopo 10-13 giorni. Questi follicoli vengono punti per via trans-vaginale sotto guida ecografica 36 ore dopo l'induzione dell'ovulazione con l'hCG. I liquidi follicolari vengono opportunamente trasferiti in provette sterili, trasmessi al laboratorio del centro e rapidamente analizzati per il recupero dei complessi cumulo-ovocita. Lo sperma del partner maschile della paziente sottoposta a prelievo ovocitario viene preparato in laboratorio. Uno spermatozoo mobile è selezionato ed iniettato nell'ovocita. Il giorno dopo (16-18 ore) gli ovociti che presentano 2 nuclei aploidi sono identificati e trasferiti in un mezzo di coltura fresco (ISM1 Medicult Origio). Dopo 24 ore di coltura gli embrioni vengono osservati, classificati, spostati in terreno fresco (UTM Medicult Origio) e successivamente trasferiti in utero della paziente.

Materiale necessario

MATERIALE / ATTREZZATURE	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Piastre Petri	10 cm; 3,5 cm	Magazzino generale
Micropipettatore EasyLab	Regolabile 1-10 ml	"
Provette coniche sterili	Falcon 15 ml fondo conico	"
Provette sterili a fondo rotondo	Falcon 4 ml Falcon 15 ml	"
Pipette sterili monouso	1 ml; 2 ml	"
Pipette Pasteur	Vetro sterilizzato Falcon plastica 3 ml	"
Barattolo sterile tappo rosso	100 ml	Magazzino Farmacia
Siringhe atossiche	10 ml	Ufficio approvvigionamenti
Piastre a 4 pozzetti Nunc	4 pozzetti da 1 ml	"
Capillari in policarbonato Origio	130 um; 150 um; 175 um	"
Catetere per E.T. Cook K-JETS-7019-SIVF	Con guida	"

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

2 cappe sterili K-System	Flusso laminare verticale	Ingegneria Clinica
3 incubatori Astec	37°C, 95% Umidità, 5% CO ₂ , 5% O ₂	Ingegneria Clinica
2 incubatore Heraeus Cytoperm2	37°C, 95% Umidità, 5% CO ₂ , 5% O ₂	Ingegneria Clinica
1 centrifuga Heraeus labofughe 400R	0-2500 rpm / 0-600 g refrigerata	Ingegneria Clinica
2 microscopi invertito: Nikon TE2000-S, Nikon TE200	20 X; piano riscaldato	"
2 stereomicroscopi: Leica WildMZ8; Nikon SMZ800		"
2 micromanipolatori Narishige	Pompe ad olio	"
1 termostato ad aria	37 °C	"
1 Frigorifero Liebherr		"
1 cappa a flusso laminare orizzontale Helios		"
1 stereomicroscopio Nikon SMZ645		"
Aghi Holding Humagen	MPH-Med- 35	Ufficio approvvigionamenti
Aghi Inject Humagen	MIC- Si- 35	"

Terreni necessari

TERRENI / DITTA	CARATTERISTICHE	FORNITORE
Flushing Medium Medicult – Origio	Terreno di lavaggio	Farmacia
IVF Medicult – Origio	Terreno di coltura/lavaggio	"
ISM1 Medicult – Origio	Terreno di coltura	"
UTM Medicult – Origio	"	"
Isolate Irvine scientific	Terreno di selezione spermatica	"
Sperm Preparation Medium Medicult – Origio	Terreno di lavaggio	"
PVP Medicult – Origio	ICSI	"
Paraffin Oil Medicult – Origio	ICSI	"
Jaluronidasi Medicult – Origio	Decumulazione ovociti	"



Manuale laboratorio PMA

Osservazioni preliminari

3. tutti i terreni, di coltura e di lavaggio, e gli strumenti di plastica/vetro devono essere preparati precedentemente alla Procedure ICSI;
4. deve essere noto che i parametri temperatura e luce devono essere costantemente monitorati e mantenuti a livelli ottimali prima e durante l'intera Procedura ICSI: gli ovociti devono essere infatti mantenuti ad una temperatura compresa tra 37°C e + /- 0,5 °C. Si eviti un'esposizione del materiale biologico a luce intensa e/o in modo prolungato (es. esposizione sotto il microscopio). Si riduca al minimo la permanenza del materiale biologico fuori dall'incubatore.

PROCEDURA

Preparazione del materiale

Il giorno prima della Procedura ICSI preparare:

- piastre di lavaggio da 3,5 ml con 3 ml di terreno IVF. Da equilibrare una notte in incubatore a 37°C, 5% di CO₂, 5% di O₂, 95% di umidità;
- piastre Nunc a 4 pozzetti con 0,9 ml di IVF. Da equilibrare una notte in incubatore a 37°C;
- provette fondo tondo da 5 ml con 1,5 ml di terreno di lavaggio Flushing preriscaldate in termostato a 37°C.

Il numero di provette e di piastre deve essere valutato in base all'ecografia del giorno prima del prelievo ovocitario.

Ricerca e messa in coltura degli ovociti

1. I liquidi follicolari vengono recuperati in sala operatoria. In prossimità del termine dell'intervento, l'operatore medico avvisa telefonicamente il laboratorio. Dal laboratorio, il



Manuale laboratorio PMA

biologo, utilizzando un apposito trasportino riscaldato a 37°C (modello K-System), si reca nell'area filtro della sala operatoria per prelevare le provette della paziente sottoposta a prelievo ovocitario. Il trasporto deve essere quanto più rapido possibile e non deve superare i 2 - 3 minuti;

2. Successivamente ogni singola provetta di liquido follicolare viene svuotata sotto cappa a flusso laminare con piano riscaldato a 37°C, in una piastra Petri da 10 cm ed analizzata nel suo contenuto utilizzando lo stereomicroscopio;
3. I complessi cumulo-ovocita recuperati al microscopio con l'utilizzo di una pipetta Pasteur sterile, vengono trasferiti per essere lavati in una piastra Petri da 3,5 cm contenente terreno di lavaggio IVF;
4. I complessi cumulo-ovocita recuperati vengono lavati una seconda volta in una piastra Petri da 3,5 cm e trasferiti nelle piastre di coltura a 4 pozzetti in ragione di un cumulo per pozzetto Nunc;
5. Le piastre di coltura vengono contrassegnate con il nome e cognome della paziente e n° spermogramma e trasferite nell'incubatore a 37°C.

Accettazione e riconoscimento del partner maschile

Il partner della Signora sottoposta a pick-up ovocitario viene ricevuto, alle ore 10.00, presso il laboratorio del Centro PMA.

L'accettazione consiste nel:

- controllo dei dati anagrafici della coppia (nome, cognome, data di nascita, C.F.);
- contrassegno, con nome e cognome della coppia, data e numero spermogramma della coppia, del contenitore sterile (barattolo sterile con tappo rosso) utilizzato per la raccolta del liquido seminale;
- Astenersi da tutti i rapporti sessuali per i tre giorni precedenti la raccolta. Notare che questo intervallo deve essere rispettato poiché un'astinenza prolungata può causare una qualità peggiore del campione.

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

La raccolta avviene per ipsazione all'interno in appositi locali adiacenti al laboratorio. Il campione raccolto in attesa di essere processato viene mantenuto in termostati a 37 °C.

Il paziente, alla consegna del materiale seminale, firma un'autocertificazione, dichiarante la proprietà del campione biologico consegnato, e la destinazione di esso (tecnica di Procreazione Medicalmente Assistita). L'operatore che accetta il materiale controfirma e segna l'ora.

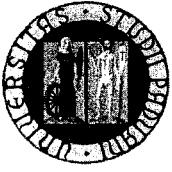
Lavaggio e capacitazione del liquido seminale

Tutte le procedure riguardanti la valutazione ed il trattamento dei campioni di liquido seminale vengono condotte seguendo le linee guida del "Manuale di laboratorio per l'analisi del liquido seminale umano" del World Health Organization (WHO; 2010)

1. la selezione degli spermatozoi mobili viene realizzata mediante tecnica di *swim-up* o filtrazione su doppio gradiente isotonic discontinuo;
2. La sospensione degli spermatozoi ottenuti viene diluita ad una concentrazione di 3/5 mil/ml;
3. le provette contenenti il liquido seminale vengono etichettate con il nome e cognome della coppia e numero spermiogramma della coppia e conservate nell'incubatore fino al momento dell'utilizzo;
4. L'eventuale liquido seminale non utilizzato per il trattamento ICSI, viene eliminato.
(approfondimenti al capitolo Spermiogramma diagnostico)

Decoronizzazione ovociti

- a. Preparazione piastra Nunc a 4 pozzetti contenenti, rispettivamente, enzima cumulasi (ICSI Cumulasi Medicult Origio) e terreno SPM (Sperm Preparation Medium Medicult Origio) negli altri tre; mettere a 37°C il terreno per almeno 2 ore;



Manuale laboratorio PMA

- b. passaggio dei OCC nel primo pozzetto per la disgregazione enzimatica delle cellule del cumulo;
- c. passaggio degli ovociti nel secondo pozzetto per la disgregazione meccanica, utilizzando capillari di policarbonato di differenti diametri (rispettivamente 175, 150 e talvolta 135 micron);
- d. passaggio degli ovociti nel terzo e quarto pozzetto per risciacquo degli ovociti.

Osservazione al microscopio invertito 20x per la determinazione dello stadio maturativo degli ovociti

Piastra Nunc 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio): suddivisione degli ovociti in differenti pozzetti in base al loro stadio maturativo e posizionamento della piastra in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%).

Nel caso in cui ci fossero di ovociti sovrannumerari (minimo tre), con caratteristiche maturative e morfologiche idonee, si procede, previo consenso da parte della paziente, con la crioconservazione degli stessi utilizzando la tecnica del congelamento lento o la vitrificazione (vedi paragrafo "Crioconservazione ovociti"). Gli ovociti non idonei alla fecondazione o alla crioconservazione, vengono eliminati.

Esecuzione ICSI

- 1) preparazione piastra Petri diametro 5 cm o 3,5 cm
 - a. posizionamento centrale di una goccia di PVP (Medicult Origio) del volume di 3-5 µl;
 - b. posizionamento di una goccia di terreno SPM (Medicult Origio) del volume di 3-5 µl;



Manuale laboratorio PMA

- c. posizionamento radiale, rispetto alle gocce precedentemente create, di tante gocce di terreno SPM (Medicult Origio) del volume di 3-5 μ l, tanti quanti sono gli ovociti da iniettare. Il tutto ricoperto con olio di paraffina (Paraffin Oil Medicult Origio).
- 2) calibrazione di holding ed inject
 - a. montaggio della holding e posizionamento della stessa in modo da averla a fuoco sul piano del fondo della piastra Petri;
 - b. controllo del corretto funzionamento della pompa della holding;
 - c. lasciare a calibrare per 15 min;
 - d. montaggio della inject e posizionamento della stessa in modo da averla a fuoco sul piano del fondo della piastra Petri;
 - e. controllo del corretto funzionamento della pompa dell'inject;
 - f. lasciare a calibrare per 15 min.
 - 3) campione di liquido seminale
 - a. concentrazione ottimale: 3-5 milioni/ml;
 - b. posizionare una quantità adeguata di campione di liquido seminale nella goccia di PVP.
 - 4) ovociti
 - a. posizionare gli ovociti nella goccia sottostante quella del PVP: 1 ovocita per goccia di terreno.
 - 5) esecuzione ICSI
 - a. individuare uno spermatozoo morfologicamente idoneo all'iniezione;
 - b. fermare lo stesso utilizzando la *inject*;
 - c. aspirare lo spermatozoo dal flagello;



Manuale laboratorio PMA

- d. spostarsi in una delle gocce contenenti gli ovociti;
- e. individuare l'ovocita da iniettare e bloccarlo utilizzando la *holding*;
- f. iniettare l'ovocita;
- g. Tornare nella goccia contenente gli spermatozoi e ripetere la procedura fino ad avere iniettato tutti gli ovociti.

6) Ovociti iniettati

- a. Utilizzando terreno ISM1 (Medicult Origio), posto all'interno dei pozzetti di una piastra Nunc con 4 pozzetti, sciacquare gli ovociti iniettati;
- b. Posizionare gli ovociti in un pozzetto contenente lo stesso terreno ISM1 (Medicult Origio) e porli in incubatore con temperatura e concentrazione di ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%).

Ricerca degli ovociti fecondati e messa in coltura degli embrioni

1. 16-18 ore dopo l'iniezione intracitoplasmatica, gli ovociti vengono osservati; quelli fecondati sono individuati al microscopio invertito (20x), ricercando la presenza dei 2 pronuclei ben visibili e dei due globuli polari distinti;
2. Gli ovociti fecondati vengono quindi trasferiti in piastre di coltura contenenti mezzo di coltura fresco (ISM1 Medicult Origio). Si contrassegnano le piastre di coltura con il nome e cognome della paziente ed il numero spermogramma e vengono trasferite nell'incubatore fino al giorno successivo.

Valutazione e trasferimento embrioni

1. dopo 24 ore di coltura, gli embrioni vengono osservati al microscopio. Per ogni embrione si annota il numero dei blastomeri, la loro dimensione e la presenza o meno di frammenti anucleati ed in base a queste caratteristiche sono classificati secondo 5 diversi gradi di valutazione, secondo lo standard corrente dei criteri morfologici usati nella valutazione della qualità embrionale (grading embrioni);

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

2. Gli embrioni vengono trasportati in sala transfer mediante il mini-incubatore K-System da trasporto con temperatura, % di CO₂ e umidità controllate;
3. Subito prima del transfert il Biologo effettua il riconoscimento della paziente (nome, cognome, data di nascita) che si sottoporrà al trasferimento embrionale;
4. Si trasferiscono gli embrioni su apposito catetere per embryo transfert e si consegna al medico;
5. una volta realizzato il transfert, per controllare che effettivamente gli embrioni siano stati trasferiti, sotto microscopio, si risciacqua più volte il catetere con terreno di coltura.

Lo score utilizzato è il seguente:

Grado I: blastomeri di uguale dimensione, assenza di frammenti;

Grado II: blastomeri di uguale dimensione con presenza di frammenti anucleati occupanti <20% del volume totale;

Grado III: blastomeri ineguali, con frammentazione compresa tra il 25% ed il 50%;

Grado IV: blastomeri ineguali con frammentazione compresa tra il 55% ed il 70%;

Grado V: blastomeri ineguali con frammentazione compresa tra il 75% ed il 90%.

Esiste la possibilità di criocongelare i prozigoti/embrioni (vedi paragrafo "Crioconservazione prozigoti/embrioni").

N.B. Le seguenti fasi:

liquido seminale: accettazione del campione biologico, spostamento del campione dal contenitore sterile tappo rosso alla provetta con il doppio gradiente, spostamento del campione dalla prima provetta alla seconda (lavaggio);

decoronizzazione ovocitaria: scelta dall'incubatore della piastra Nunc;

iniezione ovocitaria: scelta dall'incubatore del campione seminale e della piastra Nunc contenente gli ovociti;

trasferimento embrionario: scelta dall'incubatore della piastra Nunc;

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

essendo punti critici, vengono eseguite con il controllo dei dati della coppia, da parte di due operatori.

PROCEDURA CONGELAMENTO LENTO OVOCITI

Previo consenso informato firmato dalla paziente, si procede alla crioconservazione degli ovociti

- sovrannumerari (minimo tre) ed idonei alla crioconservazione (maturazione nucleare MII e caratteristiche morfologiche ideali): pazienti sottoposte ad un trattamento di PMA;
- ogni stadio maturativo: pazienti oncologiche sottoposte a trattamento per la preservazione della fertilità.

1) Decoronizzazione ovociti

- a. Preparazione piastra Nunc a 4 pozzetti contenenti, rispettivamente, enzima cumulasi (ICSI Cumulasi Medicult Origio) e terreno SPM (Sperm Preparation Medium Medicult Origio) negli altri tre;
- b. passaggio dei OCC nel primo pozzetto per la disgregazione enzimatica delle cellule del cumulo;
- c. passaggio degli ovociti nel secondo pozzetto per la disgregazione meccanica, utilizzando capillari di polivinile di differenti diametri (rispettivamente 175, 150 e talvolta 135 micron);
- d. passaggio degli ovociti nel terzo e quarto pozzetto per risciacquo degli ovociti.

2) Osservazione al microscopio invertito 20x per la determinazione dello stadio maturativo degli ovociti

3) Piastra Nunc 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio): suddivisione degli ovociti in differenti pozzetti in base al loro stadio maturativo e posizionamento della



Manuale laboratorio PMA

piastra in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) ed umidità al 95%.

- 4) Preparazione della piastra Nunc a 4 pozzetti con le concentrazioni seriali del kit per la crioconservazione degli ovociti (Oocyte Freeze Pack Medicult Origio)
- 5) Passaggio degli ovociti nei 4 diversi pozzetti seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit
- 6) Caricamento degli ovociti nelle paillettes ad elevata sicurezza (CBS BioSystem) 0,3 ml
 - a. Inserimento in paillettes del jonc identificativo;
 - b. Saldatura della paillettes utilizzando la saldatrice (SYMS CBS BioSystem);
 - c. Applicazione sulla paillettes di un'etichetta identificativa con nome, cognome e data di nascita della paziente, numero ovociti e la data di crioconservazione;
- 7) Posizionamento delle paillettes all'interno del Minicooler Air Liquide; programma n° 1 (vedi paragrafo "Protocollo Minicooler Air Liquide");
- 8) Alla fine del programma di criocongelamento, al raggiungimento della temperatura dell'azoto liquido (-196°C), si procede al posizionamento del materiale criocongelato all'interno di uno dei contenitori criogenici in una determinata posizione (rispettivamente: n° del contenitore criogenico, n° del cannister e n° del tubo);
- 9) Registrazione della procedura di crioconservazione ovociti
 - a. Registro cartaceo: vengono annotati
 - nome, cognome, data di nascita della paziente;
 - data della crioconservazione e tipo di materiale biologico crioconservato;

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

- tipo di tecnica di crioconservazione (congelamento lento o vitrificazione);
- modalità stoccaggio (n° paillettes, n° ovociti per paillettes, colore jonc);
- posizionamento all'interno della criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
- ora e operatore che ha eseguito la procedura.
- secondo operatore per controllo.

b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più

- lotto del kit utilizzato per la crioconservazione (Oocyte Freeze Pack Medicult Origio)
- lotto della paillettes nella quale sono stati caricati gli ovociti crioconservati (CBS BioSystem).

10) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.

PROCEDURA DECONGELAMENTO RAPIDO OVOCITI

Previo consenso informato firmato dalla paziente, si procede al decongelamento degli ovociti

- 1) Preparazione della piastra Nunc a 4 pozzetti con le concentrazioni seriali del kit per il decongelamento degli ovociti (Oocyte Thaw Pack Medicult Origio);
- 2) Passaggio degli ovociti nei 4 diversi pozzetti seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 3) Osservazione degli ovociti al microscopio invertito
 - a. Ovociti lisati: scartati;
 - b. Ovociti che hanno superato il decongelamento: posizionamento all'interno di piastra Nunc a 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio) e



Manuale laboratorio PMA

posizionamento in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) fino al momento della ICSI (vedi procedura ICSI).

4) Registrazione della procedura di scongelamento ovociti

a. Registro cartaceo: vengono annotati

- nome, cognome, data di nascita della paziente;
- data del scongelamento e tipo di materiale biologico scongelato;
- tipo di paillettes (con relativo jonk) scongelata;
- resto di eventuale materiale biologico crioconservato nello stessa posizione (all'interno della criobanca - in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo-) dalla quale abbiamo prelevato il materiale biologico scongelato;
- ora e operatore che ha eseguito la procedura;
- secondo operatore per controllo.

b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più il lotto del kit utilizzato per il scongelamento (Oocyte Thaw Pack Medicult Origio);

5) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA VITRIFICAZIONE OVOCITI

Previo consenso informato firmato dalla paziente, si procede alla crioconservazione degli ovociti

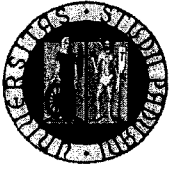
- sovrannumerari (minimo tre) ed idonei alla crioconservazione (maturazione nucleare MII e caratteristiche morfologiche ideali): pazienti sottoposte ad un trattamento di PMA;
- ogni stadio maturativo: pazienti oncologiche sottoposte a trattamento per la preservazione della fertilità.

1) Decoronizzazione ovociti

- a. Preparazione piastra Nunc a 4 pozzetti contenenti, rispettivamente, enzima cumulasi (ICSI Cumulasi Medicult Origio) e terreno SPM (Sperm Preparation Medium Medicult Origio) negli altri tre;
- b. passaggio dei OCC nel primo pozzetto per la disgregazione enzimatica delle cellule del cumulo;
- c. passaggio degli ovociti nel secondo pozzetto per la disgregazione meccanica, utilizzando capillari di polivinile di differenti diametri (rispettivamente 175, 150 e talvolta 135 micron);
- d. passaggio degli ovociti nel terzo e quarto pozzetto per risciacquo degli ovociti.

2) Osservazione al microscopio invertito 20x per la determinazione dello stadio maturativo degli ovociti;

3) Piastra Nunc 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio): suddivisione degli ovociti in differenti pozzetti in base al loro stadio maturativo e posizionamento della piastra in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) ed umidità al 95%;



Manuale laboratorio PMA

- 4) Deposizione, in una piastra Petri, di una goccia di *equilibration medium* e di una goccia di *vitrification medium* (Medicult Vitrifaction Cooling);
- 5) Passaggio degli ovociti nelle due diverse gocce, seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 6) Caricamento degli ovociti nelle paillettes ad elevata sicurezza per la vitrificazione (CBS BioSystem – HSV High Security Vitrifaction kit – le paillettes in questione, per la loro identificazione, sono colorate, e sono presenti in commercio differenti colorazioni);
 - a. Saldatura della paillettes utilizzando la saldatrice (SYMS CBS BioSystem);
 - b. Applicazione sulla paillettes di un'etichetta identificativa con nome, cognome e data di nascita della paziente, numero ovociti e la data di crioconservazione;
- 7) Posizionamento delle paillettes direttamente in azoto liquido posto all'interno di un apposito contenitore;
- 8) Posizionamento del materiale vitrificato all'interno di uno dei contenitori criogenici in una determinata posizione (rispettivamente: n° del contenitore criogenico, n° del cannister e n° del tubo);
- 9) Registrazione della procedura di crioconservazione ovociti
 - a. Registro cartaceo: vengono annotati
 - nome, cognome, data di nascita della paziente;
 - data della crioconservazione e tipo di materiale biologico crioconservato;
 - tipo di tecnica di crioconservazione (congelamento lento o vitrificazione);
 - modalità stoccaggio (n° e colore paillettes, n° ovociti per paillettes);
 - posizionamento all'interno della criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
 - ora e operatore che ha eseguito la procedura.



Manuale laboratorio PMA

- secondo operatore per controllo.

b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più

- lotto del kit utilizzato per la crioconservazione (Medicult Vitrification Cooling)

- lotto della paillettes nella quale sono stati caricati gli ovociti crioconservati
(CBS BioSystem – HSV High Security Vitrification kit -);

10) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.

PROCEDURA DECONGELAMENTO OVOCITI CRIOCONSERVATI MEDIANTE VITRIFICAZIONE

Previo consenso informato firmato dalla paziente, si procede al decongelamento degli ovociti

- 1) Deposizione, in una piastra Petri, di 4 gocce del kit per il decongelamento dopo vitrificazione (Medicult Vitrification Warming): *warming medium*, *dilution medium 1 e 2*, e *washing medium*;
- 2) Passaggio degli ovociti nelle 4 diverse gocce seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 3) Osservazione degli ovociti al microscopio invertito
 - a. Ovociti lisati: scartati;
 - b. Ovociti che hanno superato il decongelamento: posizionamento all'interno di piastra Nunc a 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio) e posizionamento in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) fino al momento della ICSI (vedi procedura ICSI).
- 4) Registrazione della procedura di decongelamento ovociti;

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

c. Registro cartaceo: vengono annotati

- nome, cognome, data di nascita della paziente;
- data del scongelamento e tipo di materiale biologico scongelato;
- numero e colore di paillettes scongelata;
- resto di eventuale materiale biologico crioconservato nello stessa posizione (all'interno della criobanca - in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo-) dalla quale abbiamo prelevato il materiale biologico scongelato;
- ora e operatore che ha eseguito la procedura;
- secondo operatore per controllo.

d. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più il lotto del kit utilizzato per il scongelamento (Medicult Vitrifaction Warming);

5) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA CONGELAMENTO LENTO PROZIGOTI/EMBRIONI

Previo consenso informato firmato dalla coppia, si procede alla crioconservazione di prozigoti/embrioni ottenuti a seguito di trattamento di PMA

- 1) Preparazione della piastra Nunc a 4 pozzetti con le concentrazioni seriali del kit per la crioconservazione di prozigoti/embrioni (Embryo Freezing Pack Medicult Origio);
- 2) Passaggio dei prozigoti/embrioni nei 4 diversi pozzetti seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 3) Caricamento dei prozigoti/embrioni nelle paillettes ad elevata sicurezza (CBS BioSystem);
 - a. Inserimento in paillettes del jonc identificativo
 - b. Saldatura della paillettes utilizzando la saldatrice (SYMS CBS BioSystem)
 - c. Applicazione di un'etichetta identificativa sulla paillettes: nome, cognome, data di nascita della paziente, numero spermogramma coppia, dicitura "embrioni" o "prozigoti", numero e data di crioconservazione.
- 4) Posizionamento delle paillettes all'interno del Minicooler Air Liquide; programma n° 1 (vedi paragrafo "Protocollo Minicooler Air Liquide");
- 5) Alla fine del programma di criocongelamento, al raggiungimento della temperatura dell'azoto liquido (-196°C), si procede al posizionamento del materiale criocongelato all'interno di uno dei contenitori criogenici in una determinata posizione (rispettivamente: n° del contenitore criogenico, n° del canister e n° del tubo);
- 6) Registrazione della procedura di crioconservazione di prozigoti/embrioni;



Manuale laboratorio PMA

a. Registro cartaceo: vengono annotati

- nome, cognome, data di nascita della paziente e del coniuge e numero spermioγραμμα della coppia;
- data della crioconservazione, tipo e grading del materiale biologico crioconservato;
- modalità stoccaggio (n° paillettes, n° prozigoti/embrioni per paillettes, colore jonc);
- posizionamento all'interno della criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
- ora e operatore che ha eseguito la procedura;
- secondo operatore per controllo;

b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più

- lotto del kit utilizzato per la crioconservazione (Embryo Freezing Pack Medicult Origio)
- lotto della paillettes nella quale sono stati caricati gli ovociti crioconservati (CBS BioSystem 0,3 ml).

7) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA DECONGELAMENTO RAPIDO

PROZIGOTI/EMBRIONI

Previo consenso informato firmato dalla paziente, si procede al decongelamento di prozigoti/embrioni ottenuti a seguito di un precedente trattamento di PMA

- 1) Preparazione della piastra Nunc a 4 pozzetti con le concentrazioni seriali del kit per il decongelamento di prozigoti/embrioni (Embryo Thawing Pack Medicult Origio);
- 2) Passaggio dei prozigoti/embrioni nei 4 diversi pozzetti seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 3) Piastra Nunc 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio): osservazione dei prozigoti/embrioni al microscopio invertito 20x per evidenziare quali hanno superato il processo di decongelamento. Eliminazione dei prozigoti/embrioni che risultano lisati e passaggio degli altri all'interno di un pozzetto di una piastra Nunc e posizionamento in incubatore con temperatura, umidità al 95%, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) fino al momento dell'embryo-transfer (vedi procedura embryo-transfer);
- 4) Registrazione della procedura di decongelamento prozigoti/embrioni
 - a. Registro cartaceo:
 - nome, cognome, data di nascita della paziente e del coniuge;
 - data del decongelamento, tipo e grading del materiale biologico decongelato;
 - tipo di paillettes (con relativo jonk) decongelata;
 - resto di eventuale materiale biologico crioconservato nello stessa posizione (all'interno della criobanca - in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo-) dalla quale abbiamo prelevato il materiale biologico decongelato;

MAN-LAB-PMA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

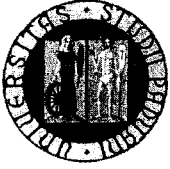
S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



Manuale laboratorio PMA

- ora e operatore che ha eseguito la procedura
 - secondo operatore per controllo.
- b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più il lotto del kit utilizzato per il congelamento (Embryo Thawing Pack Medicult Origio);
- 5) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA VITRIFICAZIONE PROZIGOTI/EMBRIONI

Previo consenso informato firmato dalla coppia, si procede alla crioconservazione dei prozigoti/embrioni che, per differenti decisioni mediche, non vengono trasferiti al termine del trattamento a fresco.

- 1) Osservazione al microscopio invertito 20x per la determinazione dello stadio di accrescimento dei prozigoti/embrioni;
- 2) Posizionamento in piastra Nunc 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio): suddivisione in differenti pozzetti in base al loro stadio di accrescimento e posizionamento della piastra in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) ed umidità al 95%;
- 3) Deposizione, in una piastra Petri, di una goccia di *equilibration medium* e di una goccia di *vitrification medium* (Medicult Vitrifcation Cooling);
- 4) Passaggio dei prozigoti/embrioni nelle due diverse gocce, seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 5) Caricamento dei prozigoti/embrioni nelle paillettes ad elevata sicurezza per la vitrificazione (CBS BioSystem – HSV High Security Vitrifcation kit – le paillettes in questione, per la loro identificazione, sono colorate, e sono presenti in commercio differenti colorazioni);
 - a. Saldatura della paillettes utilizzando la saldatrice (SYMS CBS BioSystem);
 - b. Applicazione sulla paillettes di un'etichetta identificativa con nome, cognome e data di nascita della paziente, numero prozigoti/embrioni, numero spermogramma coppia e la data di crioconservazione;



Manuale laboratorio PMA

- 6) Posizionamento delle paillettes direttamente in azoto liquido posto all'interno di un apposito contenitore;
- 7) Posizionamento del materiale vitrificato all'interno di uno dei contenitori criogenici in una determinata posizione (rispettivamente: n° del contenitore criogenico, n° del cannister e n° del tubo);
- 8) Registrazione della procedura di crioconservazione prozigoti/embrioni
 - a. Registro cartaceo: vengono annotati
 - nome, cognome, data di nascita della coppia;
 - data della crioconservazione e tipo di materiale biologico crioconservato;
 - tipo di tecnica di crioconservazione (congelamento lento o vitrificazione);
 - modalità stoccaggio (n° e colore paillettes, n° prozigoti/embrioni per paillettes);
 - posizionamento all'interno della criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
 - ora e operatore che ha eseguito la procedura.
 - secondo operatore per controllo.
 - b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più
 - lotto del kit utilizzato per la crioconservazione (Medicult Vitrification Cooling)
 - lotto della paillettes nella quale sono stati caricati i prozigoti/embrioni crioconservati (CBS BioSystem – HSV High Security Vitrification kit -);
- 9) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA DECONGELAMENTO PROZIGOTI/EMBRIONI CRIOCONSERVATI MEDIANTE VITRIFICAZIONE

Previo consenso informato firmato dalla paziente, si procede al decongelamento dei prozigoti/embrioni.

- 1) Deposizione, in una piastra Petri, di 4 gocce del kit per il decongelamento dopo vitrificazione (Medicult Vitrification Warming): *warming medium*, *dilution medium 1 e 2*, e *washing medium*.
- 2) Passaggio dei prozigoti/embrioni nelle 4 diverse gocce seguendo accuratamente il protocollo fornito con il kit;
- 3) Osservazione dei prozigoti/embrioni al microscopio invertito
 - a. Prozigoti/embrioni con tutti i blastomeri lisati: scartati;
 - b. Prozigoti/embrioni che hanno superato il decongelamento (almeno il 70% dei blastomeri sopravvissuti): posizionamento all'interno di piastra Nunc a 4 pozzetti con terreno IVF (In Vitro Fertilization Medicult Origio) e posizionamento in incubatore con temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) fino al momento della ICSI (vedi procedura ICSI).
- 4) Registrazione della procedura di decongelamento prozigoti/embrioni:
 - a. Registro cartaceo: vengono annotati
 - nome, cognome, data di nascita della coppia;
 - data del decongelamento e tipo di materiale biologico decongelato;
 - numero e colore di paillettes decongelata;
 - resto di eventuale materiale biologico crioconservato nello stessa posizione (all'interno della criobanca - in quale criocontenitore, in quale

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

cannister ed il n° del tubo-) dalla quale abbiamo prelevato il materiale biologico decongelato;

- ora e operatore che ha eseguito la procedura;

- secondo operatore per controllo.

- b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più il lotto del kit utilizzato per il decongelamento (Medicult Vitrifaction Warming);

5) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.

PROCEDURA CONGELAMENTO LIQUIDO SEMINALE

Il partner di una paziente in trattamento che, per motivi di ansia o per criptozoospermia, deve essere sottoposto alla crioconservazione del proprio liquido seminale, effettuerà la donazione presso i locali del Laboratorio (in caso raro ed eccezionale potrà produrre il materiale biologico in locali esterni a quelli del Laboratorio e, al momento della consegna del campione, firmerà un' opportuna autocertificazione)

1. Accettazione:

- a. controllo dati anagrafici della coppia (nome,cognome,data di nascita, C.F.)
b. contrassegno con nome, cognome e data di nascita del paziente e numero spermioγραμμα, del contenitore sterile (barattolo sterile con tappo rosso) utilizzato per la raccolta del liquido seminale;

2. La raccolta avviene per ipsazione. Il campione raccolto, in attesa di essere processato, viene mantenuto in termostato a 37°C.

La procedura consiste in:

- fluidificazione del campione nativo
- diluizione dello stesso con Freezing Medium Test Yolk Buffer (Irvine Scientific) in un rapporto 1:1



Manuale laboratorio PMA

- caricamento del campione nelle paillettes ad elevata sicurezza (CBS BioSystem); ogni paillette ha una capacità di 0,3 ml, a seconda del volume del campione crioconserveremo un determinato numero di paillettes
- inserimento in paillettes del jonc identificativo
- saldatura della paillettes utilizzando la saldatrice (SYMS CBS BioSystem)
- etichettatura della paillettes con nome, cognome, data di nascita, data crioconservazione.

A questo punto il congelamento può essere fatto, a seconda delle esigenze del Laboratorio, o utilizzando un congelatore programmabile oppure manualmente, utilizzando una miscela di vapori di azoto.

Congelatore programmabile:

- posizionamento delle paillettes all'interno del Minicooler Air Liquide; programma n° 2 (vedi paragrafo "Protocollo Minicooler Air Liquide");
- alla fine del programma di criocongelamento, al raggiungimento della temperatura dell'azoto liquido (-196°C), si procede al posizionamento del materiale criocongelato all'interno di uno dei contenitori criogenici in una determinata posizione (rispettivamente: n° del contenitore criogenico, n° del cannister e n° del tubo);

Criocongelamento manuale (miscela di vapori di azoto):

- preparare un contenitore a bocca larga contenente azoto liquido ed aria
- posizionare un rack 10-20 cm sopra l'azoto liquido
- posizionare sopra il rack le paillettes preparate
- lasciare passare 60 minuti per creare un gradiente di temperatura sopra il livello di azoto
- posizionamento del materiale criocongelato all'interno di uno dei contenitori criogenici in una determinata posizione (rispettivamente: n° del contenitore criogenico, n° del cannister e n° del tubo);



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



Manuale laboratorio PMA

Registrazione della procedura di crioconservazione liquido seminale

a. Registro cartaceo: vengono annotati

- nome, cognome, data di nascita del paziente;
- data della crioconservazione e tipo di materiale biologico crioconservato;
- modalità stoccaggio (n° paillettes e colore jonc);
- posizionamento all'interno della criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
- ora e operatore che ha eseguito la procedura.
- secondo operatore per controllo.

b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più

- lotto del kit utilizzato per la crioconservazione (Freezing Medium Test Yolk Buffer, Irvine Scientific)
- lotto delle paillettes nelle quali è stato caricato il materiale crioconservato (CBS BioSystem).

Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA DECONGELAMENTO LIQUIDO SEMINALE

La procedura consiste nel:

- controllo nella cartella della coppia, nel registro cartaceo ed informatizzato della posizione del materiale da decongelare;
- prelievo del materiale da decongelare dalla posizione indicata (criocontenitore, cannister e tubo);
- controllo di nome, cognome e data di nascita indicata nel tubo;
- controllo di nome, cognome e data di nascita indicata nell'etichetta sulla paillettes;
- rimozione della/e paillettes dal bidone criogenetico e posizionamento su carta assorbente per 10 minuti a temperatura ambiente (22°C);
- entro 10 minuti apertura della paillettes utilizzando apposite forbici sterili;
- posizionamento del liquido seminale all'interno di una provetta precedentemente identificata con nome e cognome della coppia e numero spermioγραμμα coppia;
- lavaggio con un 1 ml di terreno
 - o Sperm Preparation Medium (Medicult Origio) in caso un trattamento PMA di I livello
 - o IVF (Medicult Origio) in caso di un trattamento PMA di II livello
- Centrifugazione del campione per 5 minuti a 1200 rpm;
- Risospensione del pellets in 1 ml di terreno Sperm Preparation Medium (Medicult Origio) o IVF (Medicult Origio) a seconda del trattamento di PMA a cui sarà destinato.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangeni



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA PRELIEVO TESA/PESA

Con la collaborazione dello Specialista Andrologo la procedura viene eseguita ambulatorialmente il giorno del *pick-up*, dopo aver recuperato i cumuli oocitari della *partner* femminile.

La procedura consiste nella preparazione di 2-5 provette da 5 ml contenenti Sperm Preparation Medium (Medicult Origio) precedentemente riscaldato a 37°C. In ambulatorio si procede al prelievo mediante aspirazione del campione da uno o entrambi gli epididimi/testicoli. Successivamente il campione biologico viene trasferito nelle provette con il terreno. In sala biologica si procede alla risospensione del materiale biologico con SPM; 0,05 ml di campione vengono posti in capsula Petri 3.5 cm, ricoperti di Paraffin Oil (Medicult Origio) ed analizzati al microscopio invertito 20x.

Si verifica la presenza di spermatozoi nel campione; nel caso di esito positivo del prelievo, sufficiente presenza di spermatozoi, le provette opportunamente diluite verranno poste in incubatore a temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) per essere poi utilizzate per procedura ICSI.

Nel caso invece di assenza degli spermatozoi, si procede ad altre agoaspirazioni fino alla riuscita del recupero dei gameti maschili.

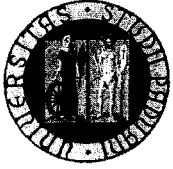


Manuale laboratorio PMA

DECONGELAMENTO TESE/TESA/PESA

La procedura consiste nel:

- Controllo nella cartella della coppia, nel registro cartaceo ed informatizzato della posizione del materiale da scongelare
- Prelievo del materiale da scongelare dalla posizione indicata (criocontenitore, cannister e tubo)
- Controllo di nome, cognome e data di nascita indicata nel tubo
- Controllo di nome, cognome e data di nascita indicata nelle paillettes
- rimozione della/e paillettes dal bidone criogenetico e posizionamento su carta assorbente per 10 minuti a temperatura ambiente (22°C);
- Apertura della paillettes utilizzando apposite forbici sterili
- Posizionamento del campione biologico all'interno di una provetta precedentemente identificata con nome, cognome e data di nascita della coppia e numero spermioγραμμα coppia
- Lavaggio con terreno IVF (Medicult Origio)
- Centrifugazione del campione per 5 minuti a 1200 rpm
- Risospensione del pellets in 1 ml di terreno IVF (Medicult Origio)
- Posizionamento del campione in incubatore a temperatura, ossigeno ed anidride carbonica controllate (rispettivamente 37°C, 5% e 5%) fino al momento dell'utilizzo.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA TRASFERIMENTO VERSO IL NOSTRO CENTRO DI MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO

Attivazione della procedura:

invio, tramite fax, della richiesta, firmata dal Responsabile del nostro Centro, di movimentazione del materiale biologico crioconservato, indirizzata al Responsabile del Centro che lo ha in consegna.

Nella richiesta verranno indicati:

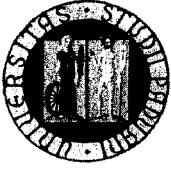
- a. Il Responsabile del Centro che ha in consegna il materiale biologico
- b. il nome e cognome della coppia per cui si richiede il materiale
- c. la descrizione del materiale biologico richiesto
- d. il nome del trasportatore (cioè chi fisicamente eseguirà il trasporto specificando i dati anagrafici che consentiranno la sua certa identificazione).

Una volta avviata la procedura, è compito della coppia mettersi in contatto con il Centro che ha in consegna il proprio materiale biologico per individuare il giorno più opportuno per l'effettivo trasporto.

Una volta individuato il giorno per il trasporto, la coppia dovrà comunicarlo al nostro Centro, con almeno 24 ore di anticipo.

Referente del trasporto:

è importante identificare un referente del trasporto che si occuperà dell'accettazione del suddetto materiale biologico. Questa persona sarà responsabile del percorso del trasporto fino al completamento della procedura.



Manuale laboratorio PMA

Accettazione materiale:

Il referente accettatore, il giorno della consegna del materiale biologico, esegue l'identificazione del trasportatore, ed il controllo del materiale in oggetto, verificando la completezza e la conformità della documentazione allegata

- consenso alla crioconservazione del materiale biologico;
- indicazioni precise sul materiale biologico: tipo, numero o concentrazione, modalità di stoccaggio, modalità di suddivisione all'interno dei dispositivi;
- metodica di crioconservazione;
- informazioni cliniche e di laboratorio: esami infettivologici (anticorpi anti-HIV-1,2, anticorpi anti epatite B (HBsAg), anticorpi anti core (HBcAb), anticorpi anti epatite C) risalenti alla data della crioconservazione o successivi;
- tracciabilità del materiale biologico dei terreni e dei dispositivi utilizzati.

Inoltre, sarà compito del referente del trasporto, verificare il corretto mantenimento delle condizioni di trasporto.

Registrazione e stoccaggio del materiale biologico ricevuto:

- a. Registro cartaceo: vengono annotati
 - nome, cognome, data di nascita del/lla paziente (entrambi nel caso di ricevimento di prozigoti/embrioni);
 - data del congelamento;
 - struttura presso la quale è stata effettuata la crioconservazione;
 - tipo di materiale biologico stoccato;
 - numero e colore paillettes stoccate;
 - posizionamento all'interno della criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
 - ora e operatore che ha eseguito la procedura;
 - secondo operatore per controllo.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



Manuale laboratorio PMA

- b. Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più il nome e lotto del kit utilizzato per il congelamento e metodica da seguire per il decongelamento;
- c. Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.

Conclusione della procedura:

una volta verificata la conformità dello stato del contenitore di trasporto, del livello di azoto al suo interno, della documentazione di accompagnamento, della corrispondenza tra documentazione ricevuta e materiale inviato, si invia un fax di avvenuta accettazione del materiale crioconservato, al Centro inviante.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA TRASFERIMENTO MATERIALE BIOLOGICO CRIOCONSERVATO DAL NOSTRO CENTRO VERSO ALTRI CENTRI

Richiesta di movimentazione materiale biologico:

all'arrivo della richiesta della movimentazione di materiale biologico, da parte di un altro Centro, si prende visione della cartella clinica relativa alla coppia in questione per preparare la relativa documentazione:

- consenso alla crioconservazione del materiale biologico;
- indicazioni precise sul materiale biologico: tipo, numero o concentrazione, modalità di stoccaggio, modalità di suddivisione all'interno dei dispositivi;
- metodica di crioconservazione;
- informazioni cliniche e di laboratorio: esami infettivologici (anticorpi anti-HIV-1,2, anticorpi anti epatite B (HBsAg), anticorpi anti core (HBcAb), anticorpi anti epatite C) risalenti alla data della crioconservazione o successivi;
- tracciabilità del materiale biologico dei terreni e dei dispositivi utilizzati.

Accordo con la coppia per i tempi e le modalità di trasferimento del loro materiale biologico e per l'acquisizione del contenitore criogenico di trasporto.

Movimentazione materiale biologico:

- 1) controllo e verifica del corretto condizionamento del contenitore criogenico di trasporto
- 2) apposizione sul contenitore criogenico di trasporto, di un foglio identificativo di accompagnamento con le seguenti informazioni:



Manuale laboratorio PMA

- a. Centro ricevente: nome, indirizzo, telefono personale referente, Direttore Sanitario
 - b. Centro inviante: nome, indirizzo, telefono personale referente, Direttore Sanitario
 - c. Data ed ora inizio trasporto
 - d. Presenza o meno di rischio biologico
 - e. Indicazioni sul fatto che il contenitore non deve subire urti, non deve essere irradiato, e deve essere mantenuto in posizione verticale e in luogo fresco
 - f. Indicazioni sul fatto che il criocontenitore deve essere aperto solo in presenza di operatori qualificati dai Centri sopraindicati
- 3) Posizionamento, all'interno del contenitore criogenetico, del materiale da inviare
- 4) Consegna al trasportatore della documentazione da allegare al materiale stesso che dovrà viaggiare insieme al materiale biologico stesso
- 5) Compilazione e firma, in doppia copia, da parte del trasportatore, che deve coincidere con il proprietario del materiale biologico richiesto, di un consenso al ritiro del materiale biologico crioconservato presso il nostro Centro
- 6) Registro cartaceo: vengono annotati
- nome, cognome, data di nascita del/lla paziente (entrambi nel caso di movimentazione di prozigoti/embrioni);
 - data del congelamento;
 - struttura presso la quale è stata effettuata la crioconservazione;
 - tipo di materiale biologico movimentato;
 - numero e colore paillettes movimentate;
 - scarico del materiale dalla criobanca (in quale criocontenitore, in quale cannister ed il n° del tubo);
 - ora e operatore che ha eseguito la procedura;
 - secondo operatore per controllo.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi



Manuale laboratorio PMA

- 7) Registro informatizzato: vengono annotati gli stessi dati del registro cartaceo più il nome e lotto del kit utilizzato per il congelamento e metodica da seguire per il congelamento;
- 8) Inserimento in cartella di una stampa del registro informatizzato.

Chiusura della procedura:

La procedura si riterrà conclusa con l'arrivo, al nostro Centro, del fax di accettazione del materiale crioconservato, inviato dal Centro ricevente.



Manuale laboratorio PMA

MANUALE DI STRUMENTAZIONE

ALLINEAMENTO KOELLER – HOFFMANN

La seguente procedura viene effettuata **settimanalmente** dal personale di laboratorio.

a) ILLUMINAZIONE DI KOELLER

Il settaggio dell'*illuminazione di Koeller*, viene effettuato sul microscopio invertito al fine di verificare la *centatura dell'asse ottico*. Tutte le parti ottiche che costituiscono il microscopio devono trovarsi sullo stesso piano ottico/focale. In tal modo si va ad annullare la presenza di diffrazioni e di riflessioni dell'immagine, aumentando in questo modo la *risoluzione ottica* della stessa. Il settaggio è consigliabile effettuarlo 1 volta alla settimana.

Come procedere

1. Incidere disegnando una X, con un taglierino, il fondo di una piastrina utilizzata normalmente per ICSI;
2. Mettere a fuoco la X con l'obbiettivo **10X**; (N.B. Non toccare più il fuoco)
3. Mettere il revolver su **O**;
4. Mettere il condensatore sul modulo **A**;
5. Aprire il diaframma di apertura posto sopra il condensatore;
6. Chiudere il diaframma di campo F, posto sopra l'illuminatore; (leva in giù)
7. Al microscopio vedo un fascio di luce (cerchio sfuocato) sulla X. Utilizzare i pomelli di messa a fuoco laterali del condensatore per visualizzare il poligono di luce;



Manuale laboratorio PMA

8. Aprire il diaframma di campo F fino a toccare il cerchio del campo visivo con almeno uno spigolo del poligono;
9. Così facendo il fascio di luce tende a sfuocarsi; lo si rimette a fuoco utilizzando sempre i pomelli laterali;
10. Si proceda continuando ad aprire il diaframma di campo F e mettendo a fuoco il poligono, finché non si arrivi ad un livello di centratura e definizione del poligono buone;
11. Si apra del tutto il diaframma di campo F.
12. Terminata la procedura, l'altezza del condensatore non deve essere cambiata.

b) ALLINEAMENTO DEL CONTRASTO DI FASE

L'allineamento del *Contrasto di fase* deve essere effettuato sempre dopo il settaggio dell'illuminazione di Koeller.

Come procedere

1. Incidere disegnando una X, con un taglierino, il fondo di una piastrina utilizzata normalmente per ICSI;
2. Mettere a fuoco la X con l'obiettivo **10X**; (N.B. Non toccare più il fuoco)
3. Mettere il revolver sul modulo **B** (lente di Bertrand, per tutti i piani focali);
4. Al microscopio si visualizzano 2 cerchi concentrici: per metterli a fuoco si utilizzi la vite a lato del revolver, posizionato sotto gli oculari;
5. Si passi dal modulo A al modulo **Ph1** del condensatore;
6. Al microscopio si visualizzano 2 cerchi concentrici: si utilizzino gli appositi cacciaviti per mettere a fuoco e centrare i cerchi, avvitando o svitando le viti poste in prossimità della targhetta Ph1 sul condensatore. (N.B. il filtro D diffusore deve essere sempre dentro tutto a destra).



Manuale laboratorio PMA

c) CONTRASTO DI HOFFMANN

Si effettua il settaggio del *Contrasto di Hoffmann* per regolare la visione tridimensionale del materiale biologico in osservazione al microscopio. Deve essere effettuato sempre dopo il settaggio dell'illuminazione di Koeller.

Come procedere

1. Incidere disegnando una X, con un taglierino, il fondo di una piastrina utilizzata normalmente per ICSI;
2. Mettere a fuoco la X con l'obiettivo **20X**; (N.B. Non toccare più il fuoco)
3. Mettere il revolver sul modulo **B** (lente di Bertrand, per tutti i piani focali);
4. Al microscopio si visualizza 1 cerchio con 2 fasce poste in alto sulla sinistra
5. Si passi dal modulo A al modulo **MC2** del condensatore;
6. Si utilizzi la rotellina alla destra della targhetta MC2 per sistemare la posizione della finestra di luce.
7. Si utilizzino gli appositi cacciaviti per regolare la definizione delle finestre di luce;
8. Riposizionare il revolver su O, sistemare il fuoco con la micrometrica e con il polarizzatore.

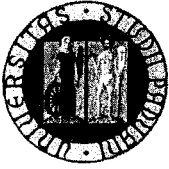
PULIZIA MICROSCOPI E STEREOMICROSCOPI

(Nikon Eclipse TE200; Nikon TE2000 – S; Stereoscopic Zoom microscope SMZ1000/SMZ800; Leica wild MZ8; Nikon C-C Phase Contrast Turrent Condenser E 400)

A scadenza giornaliera dal personale di Laboratorio

La procedura consiste nel:

- Rimozione della polvere accumulata sulle lenti con un pennello molto morbido;
- Pulizia della superficie del tavolino traslatore, servendosi di un panno antirilascio, imbibito di soluzione disinfettante;



Manuale laboratorio PMA

- Quando lo/il stereomicroscopio/microscopio non è in uso, proteggerlo dalla deposizione della polvere utilizzando l'apposita copertura di plastica in dotazione.

A scadenza mensile dal personale di Laboratorio

La procedura consiste nel:

- smontaggio e pulizia accurata del **piano** e della **piastra** riscaldata con detergente neutro;
- smontaggio e pulizia accurata degli **obiettivi** con appositi bastoncini di legno avvolti con carta di riso imbibita di alcool al 70%;
- smontaggio e pulizia accurata delle **lenti** appositi bastoncini di legno avvolti con carta di riso imbibita di alcool al 70%.
- registrare l'avvenuta manutenzione nel modulo MOD-09 MPO-PMA.

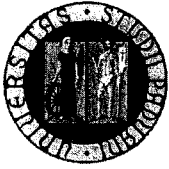
MANUTENZIONE MICROSCOPI E STEREOMICROSCOPI

(Nikon Eclipse TE200; Nikon TE2000 – S; Stereoscopic Zoom microscope SMZ1000/SMZ800; Leica wild MZ8; Nikon C-C Phase Contrast Turrent Condenser E 400)

A scadenza mensile dal personale del Laboratorio.

La procedura consiste nel:

- allineamento Koeller-Hoffman
- registrazione dell'avvenuta manutenzione nel modulo MOD-09 MPO-PMA.



Manuale laboratorio PMA

PULIZIA MICROMANIPOLATORE

(Nikon Narishige)

A scadenza **giornaliera** dal personale del Laboratorio

La procedura consiste nella rimozione della polvere, utilizzando un panno morbido antirilascio imbibito di soluzione disinfettante, per rimuovere l'eventuale polvere che potrebbe essersi depositata sulla superficie delle pompe, dei micromanipolatori, dei microiniettori, delle siringhe di vetro e dei fili elettrici.

MANUTENZIONE MICROMANIPOLATORE

(Nikon Narishige)

A scadenza **giornaliera** dal personale di Laboratorio

La procedura consiste nel:

- verifica del corretto funzionamento dei microiniettori Narishige;
- verifica del livello dell'olio all'interno della siringa di vetro;
- verifica dell'assenza di bolle d'aria all'interno del sistema di connessione;
- si procede alla ricarica nel caso in cui il livello dell'olio sia inferiore a 0,1 cm;
- registrare l'avvenuta manutenzione nel modulo MOD-09 MPO-PMA.

In caso di manutenzione **straordinaria** si richiede l'intervento della Ditta fornitrice che provvederà a:

- verificare l'assenza di anomalie nei micromanipolatori;
- controllare l'ottica;
- varie ed eventuali.



Manuale laboratorio PMA

PULIZIA CENTRIFUGHE

(Labofuge 400R Function Line, Heraeus; ALC4218)

A scadenza **trimestrale** dal personale di Laboratorio

La procedura consiste nel:

- indossare guanti monouso;
- scollegamento dall'alimentazione elettrica;
- pulizia e decontaminazione con clorexidina al 4%:
 - o smontaggio e pulizia cestelli portaprovette;
 - o decontaminazione rotore e camera.
- ripristino cestelli;
- ripristino collegamento all'alimentazione elettrica.
- registrazione dell'avvenuta procedura su modulo MOD-09 MPO-PMA.

MANUTENZIONE CENTRIFUGA

Labofuge 400R Function Line - Heraeus

A scadenza **semestrale** dalla Ditta Sanaco s.r.l.

La procedura consiste nel:

- controllo struttura esterna e stabilità;
- controllo e lubrificazione rotore e bascule;
- verifica tensioni principali di alimentazione;
- controllo ed eventuale regolazione della chiusura del coperchio;
- ispezione albero, cuscinetti motore e flangia in gomma;
- ispezione ammortizzatori e punti di fissaggio;

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

- verifica cablaggi di linea e di potenza interni;
- controllo ed eventuale regolazione del sistema antisbilanciamento;
- controllo delle funzioni della pulsantiera e/o pannello di controllo;
- prova di frenata;
- pulizia condensatore gruppo frigo;
- controllo sonda temperatura;
- prova di raffreddamento;
- verifica blocco sicurezza apertura coperchio;
- verifica sicurezza elettrica 66/5;
- prova di velocità rpm;
- compilazione da parte della Ditta di apposito modulo di avvenuta manutenzione.

MANUTENZIONE CENTRIFUGA

ALC4218

A scadenza **annuale** dalla Ditta Sanaco s.r.l.

La procedura consiste nel:

- controllo struttura esterna e stabilità;
- controllo e lubrificazione rotore e bascule;
- verifica tensioni principali di alimentazione;
- controllo ed eventuale regolazione della chiusura del coperchio;
- ispezione albero, cuscinetti motore e flangia in gomma;
- ispezione ammortizzatori e punti di fissaggio;
- verifica cablaggi di linea e di potenza interni;
- controllo ed eventuale regolazione del sistema antisbilanciamento;
- controllo delle funzioni della pulsantiera e/o pannello di controllo;
- prova di frenata;

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

- pulizia condensatore gruppo frigo;
- controllo sonda temperatura;
- prova di raffreddamento;
- verifica blocco sicurezza apertura coperchio;
- verifica sicurezza elettrica 66/5;
- prova di velocità rpm;
- compilazione da parte della Ditta di apposito modulo di avvenuta manutenzione.

PULIZIA FRIGORIFERO/CONGELATORE

(Liebherr Profi Line, Frigomeccanica S. Andreaus & C. s.n.c.; Ocean FR235 2TC)

A scadenza annuale dal personale di Laboratorio

La procedura consiste nel:

- indossare guanti monouso;
- movimentazione dei prodotti in un altro frigorifero;
- scollegamento dall'alimentazione elettrica;
- sbrinamento;
- pulizia con acqua;
- pulizia con soluzione disinfettante (clorexidina 4%);
- rimovimentazione di prodotti;
- registrazione dell'avvenuta decontaminazione su modulo MOD-09 MPO-PMA.



Manuale laboratorio PMA

MANUTENZIONE FRIGORIFERO/CONGELATORE

(Liebherr Profi Line, Frigomeccanica S. Andreaus & C. s.n.c.; Ocean FR235 2TC)

A scadenza **giornaliera** dal personale di Laboratorio:

La procedura consiste nel:

- verifica della temperatura visualizzata sul display del frigorifero
- registrazione del dato su modulo MOD-09 MPO-PMA
- controllo della registrazione sul dischetto che viene cambiato settimanalmente

PULIZIA DELLE CAPPE

(K-SYSTEMS WORKSTATION L124 / L126; Steril – HELIOS 48; Teistar BIOII-A)

A scadenza **giornaliera** dal personale di Laboratorio

La procedura consiste in:

- pulizia del piano di lavoro con l'utilizzo di acqua e alcool al 70%.

Procedura eseguita più volte al giorno, ad ogni utilizzo della cappa (es. tra un passaggio processuale ed un altro e/o tra il processamento del campione biologico di un paziente ed un altro).

A fine giornata lavorativa:

- pulizia del piano di lavoro, delle pareti interne ed esterne del vetro, utilizzando garze sterili imbibite di disinfettante Oosafe – sparMED;
- pulizie e decontaminazione di tutti gli attrezzi posizionati sotto cappa;
- risciacquare il tutto con garze sterili imbibite di acqua distillata sterile.

A scadenza **semestrale** dal personale di Laboratorio

- Controllo microbiologico: esecuzione di tamponi; in caso di risultato positivo si procede con una disinfezione straordinaria con prodotti a base di ammonio quaternario.



Manuale laboratorio PMA

- Procedura di pulizia:

- scollegare la cappa dall'alimentazione elettrica;
- lavare accuratamente con disinfettante apposito Oosafe Non-toxic Disinfectant/OODIH-1000
- sciacquare con acqua sterile il piano della cappa
- ricollegare la cappa all'alimentazione elettrica

MANUTENZIONE CAPPE

(K-SYSTEMS WORKSTATION L124 / L126; Steril – HELIOS 48; Teistar BIOII-A)

A scadenza **semestrale** dalla ditta Andreaus s.r.l. Frigomeccanica

La procedura di manutenzione consiste nel:

- verifica generale e controllo allarmi;
- verifica dei filtri Hepa;
- conta particellare;
- verifica velocità del flusso d'aria e barriera frontale;
- smoke test.
- compilazione da parte della Ditta di un loro apposito modulo di avvenuta manutenzione.

A scadenza **bimensile** dal personale del Laboratorio

- Sostituzione dei prefiltri
- Compilazione del modulo MOD-09 MPO-PMA



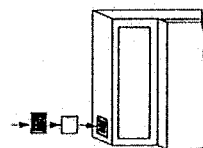
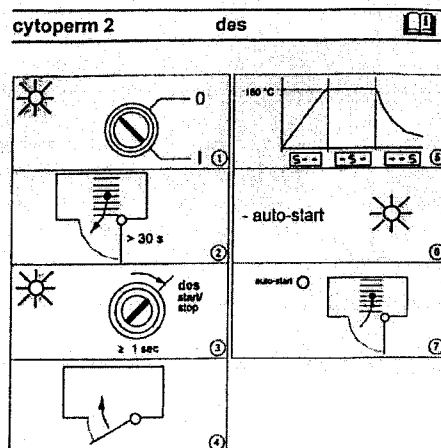
Manuale laboratorio PMA

Pulizia incubatori Heraeus Cytoperm 2

A scadenza mensile dal personale del Laboratorio

La procedura consiste nel:

- eventuale movimentazione dei prodotti in un altro incubatore;
- rimozione dei ripiani in metallo;
- pulizia con soluzione disinfettante Oosafe Non-toxic Disinfectant/OODIH-1000 delle parti interne dell'incubatore;
- pulizia con soluzione disinfettante Oosafe Non-toxic Disinfectant/OODIH-1000 dei ripiani rimossi dall'incubatore;
- rimontaggio dei ripiani dell'incubatore;
- procedura di sterilizzazione mediante calore umido, seguendo il manuale fornito dal produttore



November, 1995

50 046 772

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

PULIZIA INCUBATORI ASTEC

A scadenza **semestrale** dal personale del Laboratorio

Controllo microbiologico con l'esecuzione di tamponi; in caso di risultato positivo si procede con una disinfezione straordinaria con prodotti a base di ammonio quaternario.

A scadenza **mensile** dal personale del Laboratorio

- spegnere l'incubatore e sconnettere la spina di corrente dalla rete
- rimuovere tutti i ripiani, supporti e il contenitore dell'acqua
- strofinare con un panno morbido imbevuto di Oosafe disinfettante e asciugare accuratamente tutte le superfici. Fare attenzione che nessun liquido entri in contatto con le parti elettriche riassemble in ordine inverso prima di riaccendere l'incubatore.

A scadenza **settimanale** dal personale del Laboratorio

- pulizia di tutti i ripiani, supporti e della vaschetta dell'acqua con un panno morbido imbevuto di Oosafe disinfettante
- asciugatura accurata di tutte le superfici
- riempimento di due terzi della vaschetta con acqua distillata sterile a 37°C

MANUTENZIONE INCUBATORI CO₂/O₂

(Cytoperm 2, Heraeus , Astec AMP-30DR)

A scadenza **semestrale** da parte della ditta Sanaco (Cytoperm 2 Heraeus),
ditta Origio (Astec AMP-30DR)

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

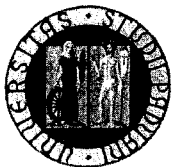
La procedura consiste nel:

- controllo struttura esterna
- controllo guarnizioni porta vetro e/o guarnizione magnetica esterna
- verifica interruttore porta aperta
- verifica riscaldamento porta
- controllo pareti interne
- controllo ventilatori
- verifica cablaggi e connessioni elettriche
- controllo perdite elettrovalvole
- controllo flusso pompa aria
- controllo ed eventuale sostituzione filtri sterili
- controllo sistema di regolazione della % di umidità
- controllo sistema di regolazione temperatura
- controllo sistema di regolazione della % di CO₂
- controllo sistema di regolazione della % di O₂
- controllo e reset registro allarmi
- verifica sicurezza elettrica 66/5
- compilazione da parte della ditta di apposita scheda tecnica

A scadenza **settimanale** dal personale del Laboratorio

La procedura consiste nel:

- Modello Heraeus Cytoperm2:
 - verificare i livelli di acqua distillata nel condotto interno;
 - rabboccare con acqua distillata il condotto interno fino alla tacchetta di livello massimo
- Modello Astec:
 - riempimento con acqua distillata sterile a 37°C fino a due terzi della capacità della vaschetta.



Manuale laboratorio PMA

A scadenza mensile dal personale del Laboratorio

- Controllo della temperatura
- verifica con Termometro certificato Greisinger GMH 3220 e registrazione sull'apposito modulo.
- Controllo della pressione della CO₂
- verifica con il rilevatore di CO₂ Geotech G100 certificato e registrazione del valore su apposito modulo.
- Controllo della pressione dell'O₂
- Verifica con il rilevatore di O₂ certificato Geotech G100 e registrazione del valore su apposito modulo.

Soluzioni di eventuali problemi incubatori modello Astec

1. Non si accende:
 - a. Verificare che il cavo di rete sia connesso alla presa di corrente
 - b. Verificare l'interruttore generale
 - c. Se si tratta di un fusibile saltato, premere il pulsante del fusibile ed accendere nuovamente lo strumento. Attenzione! → ci sono due fusibili ripristinabili: uno nel box sul retro, ed un secondo in alto, sul retro, accanto all'interruttore principale. Controllarli entrambi.
2. Il fusibile si sgancia continuamente:
 - a. c'è del liquido dentro l'incubatore? Scollegare la spina immediatamente e contattare Ditta Origio – Ing. Berti 335/330836. Continuare ad usare l'incubatore, può causare danni maggiori.
3. La temperatura interna della camera non si stabilizza:
 - a. Il ventilatore della camera gira correttamente? Controllare che non sia mosso e non tocchi sui lati
 - b. Verificare che la porta di vetro sia correttamente chiusa

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

4. La temperatura interna della camera non raggiunge il valore impostato?
 - a. Verificare che la temperatura impostata sia più di 5°C sopra la temperatura ambiente
5. La concentrazione di CO₂ non si stabilizza?
 - a. Controllare che il ventilatore nella camera giri correttamente, non sia mosso e non tocchi sui lati
 - b. Verificare che i piani siano posizionati correttamente
 - c. Verificare che l'acqua per l'umidificazione sia sufficiente
6. La concentrazione di CO₂ non raggiunge il valore impostato?
 - a. Verificare che ci sia gas nella bombola
 - b. Il regolatore della pressione della CO₂ è tra 0,3-0,5 bar; regolare la pressione se troppo bassa
 - c. Verificare che il rubinetto del regolatore sia completamente aperto
 - d. Verificare le connessioni dei tubi
 - e. Verificare che i tubi non siano né piegati né schiacciati
7. Suona allarme acustico per CO₂?
 - a. Verificare che ci sia sufficiente gas nella bombola
 - b. Il regolatore della pressione della CO₂ è tra 0,3-0,5 bar; regolare la pressione se troppo bassa
 - c. Verificare che il rubinetto del regolatore sia completamente aperto
 - d. Verificare le connessioni dei tubi
 - e. Verificare che i tubi non siano né piegati né schiacciati
8. Suona allarme acustico "ADD WATER"?
 - a. Il livello dell'acqua nella camicia è basso: aggiungere acqua distillata



Manuale laboratorio PMA

Qualora queste indicazioni non andassero a buon fine, contattare la Ditta Origio Italia S.p.A. via Luca Giordano 7/B/C/D/ 50132 Firenze tel. 055/571476 fax 055/5000889 email origioitalia@origio.com – Ing. Berti 335/330836.

Soluzioni di eventuali problemi incubatori modello Cytoperm 2:

Essendo l'apparecchio dotato di un sistema di diagnosi degli errori, possiamo, mediante un determinato codice, rilevare e valutare un guasto durante l'esercizio.

Premendo il tasto "i" viene indicato l'errore rilevato dal sistema di diagnosi;

- errore 88: errore durante l'auto.start, ripetere auto-start
- errore 99: porte dell'apparecchiatura aperte, chiudere le porte dell'apparecchio che sono rimaste aperte per troppo tempo
- errore 100: temperatura sotto il valore nominale, controllare le regolazioni del regolatore e del TWW
- errore 101: temperatura sopra il valore nominale, temperatura ambiente troppo alta, controllare lo stato di attivazione del riscaldamento e della porta
- errore 104: rottura sonda termica, contattare il service
- errore 200: CO₂ sotto valore nominale, controllare l'alimentazione del gas, circa il contenuto della bombola, la pressione in entrata, condutture ed attacco dell'apparecchiatura
- errore 201: CO₂ sopra il valore nominale, controllare la pressione del gas
- errore 204: rottura sensore CO₂, contattare il service
- errore 300: azoto sotto valore nominale, controllare l'alimentazione del gas, circa il contenuto della bombola, la pressione in entrata, condutture ed attacco dell'apparecchiatura
- errore 301: azoto sopra valore nominale, controllare la pressione del gas
- errore 302: ossigeno sotto valore nominale, controllare l'alimentazione del gas, circa il contenuto della bombola, la pressione in entrata, condutture ed attacco dell'apparecchiatura

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

- errore 303: ossigeno sopra il valore nominale, controllare la pressione del gas
- errore 304: sensore dell'ossigeno difettoso, contattare il service
- errore 400: umidità relativa sotto il valore nominale, controllare il serbatoio dell'acqua ed eventualmente contattare il service
- errore 404: sensore dell'umidità relativa difettoso, contattare il service
- errore 405: vaporizzatore difettoso, contattare il service
- errore 500: temperatura "des" sotto il valore nominale, ripetere il procedimento di disinfezione, eventualmente contattare il service
- errore 501: temperatura "des" sopra il valore nominale, contattare il service
- errore 502: errore di disinfezione, attivando l'interruttore DES, resettare l'errore e ripetere la disinfezione, verificare se manca la corrente.

Qualora queste indicazioni non andassero a buon fine, contattare la Ditta Sanaco S.R.L. via Brennero 71/A 37026 Pescantina (Ve) tel. 045/7157366 fax 045/7157387 email info@sanaco.it – Sig. Ruffoli 335/6060437 - , per comunicare il tipo di errore e ricevere le indicazioni su come procedere.

PULIZIA SISTEMA C.A.S.A.

A scadenza **semestrale** dal personale del Laboratorio.

La procedura consiste nel:

- pulizia delle parti esterne con apposito panno imbibito di detergente neutro
- pulizia delle parti interne (oculare, carrellino porta-vetrino) con apposito panno imbibito di detergente neutro e di disinfettante Oosafe.



Manuale laboratorio PMA

MANUTENZIONE SISTEMA C.A.S.A.

(Computer Assisted Sperm Analyzers)

A scadenza **semestrale** da parte della ditta Origio Medicult – Ing. Berti 335/330836

La procedura consiste nel:

- controllo funzionale mediante analisi di un campione di prova
- test di memoria e funzionale dell'hard disk
- verifica mantenimento calibrazione

calibrazione dei parametri misurati dal Software.

Sanificazione e manutenzione INCUBATORE K SYSTEM da trasporto

- Verifica annuale della temperatura con termometro certificato Greisinger GMH 3220
- Pulizia settimanale con Oosafe disinfettante

Sanificazione e manutenzione termostati ad aria Heraeus B15 e Heraeus B6

- Verifica annuale della temperatura con termometro certificato Greisinger GMH 3220
- Pulizia semestrale con Oosafe disinfettante

MANUTENZIONE TERMOMETRO GREISINGER GMH 3220

A scadenza **annuale** da parte di enti abilitati.

La procedura consiste nella:

- conferma metrologica presso laboratori la cui valenza tecnica e la riferibilità ai campioni nazionali è riconosciuta da enti abilitati;
- se la conferma metrologica dovesse superare il limite di accettabilità definito si provvederà alla sostituzione o taratura dello strumento.

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

MANUTENZIONE GAS ANALIZZATORE GEOTECH G100

A scadenza **annuale** da parte di enti abilitati.

La procedura consiste nella:

- conferma metrologica presso laboratori la cui valenza tecnica e la riferibilità ai campioni nazionali è riconosciuta da enti abilitati;
- se la conferma metrologica dovesse superare il limite di accettabilità definito si provvederà alla sostituzione o taratura dello strumento.

AZOTO LIQUIDO

Prodotto classificato pericoloso ai sensi dalla norma vigente (Classificazione sec. Dir. 67/548/CEE:). Indicazione del pericolo H: H281: "Contiene gas refrigerato, può provocare ustioni o lesioni criogeniche".

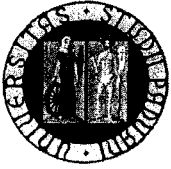
Consigli di prudenza P:

- P282: Utilizzare guanti termici/schermo facciale/proteggere gli occhi;
- P336+P315: Sgelare le parti congelate usando acqua tiepida. Non sfregare la parte interessata. Consultare immediatamente un medico;
- P403: Conservare in luogo ben ventilato;

In alta concentrazione può provocare asfissia, i sintomi possono includere perdita di mobilità e/o conoscenza, le vittime possono non rendersi conto dell'asfissia;

Misure in caso di rilascio accidentale

- Precauzioni personali, DPI e procedure in caso di emergenza:
 - Evacuare l'area interessata;
 - assicurare adeguata ventilazione;
 - intervenire nella zona interessata con l'autorespiratore se non è provato che l'atmosfera sia respirabile;
- Precauzioni ambientali:



Manuale laboratorio PMA

- tentare di arrestare la fuoriuscita;
- evitare l'ingresso in fognature, scantinati o scavi in cui l'accumulo può risultare pericoloso;
- Metodi e materiali per il contenimento e la bonifica: se la perdita interessa un contenitore mobile e non può essere arrestata,
 - mantenere la zona sgombra finchè tutto il liquido sia evaporato
 - allontanare tutto il personale utilizzando la via d'uscita anti incendio



Manuale laboratorio PMA

PULIZIA STANZA BIOLOGICA

A scadenza quotidiana dal personale del Laboratorio:

La procedura consiste nel:

- rimozione della polvere dalle superfici (ripiani dei carrelli porta strumenti, parte superiore degli incubatori, ripiani dei banconi di lavoro) con apposito panno anti-statico imbibito di soluzione disinfettante con ammonio quaternario (Umonium 38 - 0,5%, Neutralis);
- rimozione della polvere dalla superficie calpestabile con apposito panno anti-statico;
- lavaggio della superficie calpestabile con apposito panno imbibito di detergente disinfettante (Umonium 38 – 2,5%, Neutralis)
- lavaggio delle rotelle delle sedie con apposito panno imbibito di detergente disinfettante (Umonium 38 – 2,5%, Neutralis)

Procedura straordinaria **semestrale** dal personale del Laboratorio:

La procedura consiste nel:

- lavaggio con soluzione disinfettante (Umonium 38 – 2,5%, Neutralis) delle pareti lavabili della sala biologica;
- rimozione della polvere dalle superfici (ripiani dei carrelli porta strumenti, parte superiore degli incubatori, ripiani dei banconi di lavoro) con apposito panno anti-statico;
- rimozione della polvere dalla superficie calpestabile con apposito panni anti-statico;
- rimozione della polvere dalle superfici (ripiani dei carrelli porta strumenti, parte superiore degli incubatori, ripiani dei banconi di lavoro) con apposito panno imbibito di detergente (Umonium 38 – 2,5%, Neutralis);
- lavaggio della superficie calpestabile con apposito panno imbibito di detergente disinfettante (Umonium 38 – 2,5%, Neutralis).



Manuale laboratorio PMA

A scadenza giornaliera dal personale del Laboratorio

- tutti i contenitori destinati ai rifiuti speciali, prodotti all'interno del Laboratorio, devono essere chiusi ed allontanati dallo stesso, indicando data e luogo di provenienza sul contenitore.

PROGRAMMI MINICOOL 40 PC AIR LIQUIDE

La finalità di un programma di crioconservazione è quella di portare il materiale biologico alla temperatura di stoccaggio (in azoto liquido, -196°C) in modo graduale, evitando la formazione dei cristalli di ghiaccio, deleteri per la sopravvivenza delle cellule.

Programma n° 1 per la crioconservazione di prozigoti/embrioni ed ovociti, durata 90 min.

Fase 1: il raffreddamento della cellula inizia applicando un gradiente di temperatura piuttosto elevato ($2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) fino a raggiungere una temperatura leggermente inferiore al punto di congelamento (tra i -4 ed i -7°C)

Fase di *seeding manuale*: a questo punto si induce manualmente la formazione di un nucleo di ghiaccio nella soluzione extracellulare, il cosiddetto *seeding*, cominciando dai $-4/-7^{\circ}\text{C}$ ed applicando un gradiente di diminuzione della temperatura molto più basso rispetto al precedente ($-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min.}$)

Fase 2: In tal modo la formazione di ghiaccio extracellulare avviene molto lentamente mentre, man mano che si verifica l'incorporazione dell'acqua nel ghiaccio che si forma, aumenta gradualmente la concentrazione dei soluti nella frazione non congelata. Si forma così un ulteriore gradiente osmotico che porta alla fuoriuscita di acqua dalla cellula e ad una ulteriore deidratazione. Se il congelamento si verifica con sufficiente lentezza, gran parte dell'acqua intracellulare fuoriesce e non si viene a formare ghiaccio: tutto ciò accade



Manuale laboratorio PMA

finchè non si raggiunge una temperatura compresa tra -30 e -80°C e prima di trasferire i campioni in azoto liquido (-196°C).

Fase 3: da -30°C a -150°C ($-50^{\circ}\text{C}/\text{min.}$)

Fine: raggiungimento della temperatura dell'azoto liquido, -196°C

Programma n° 2 per la crioconservazione del liquido seminale, durata 40 minuti.

La temperatura diminuisce di $1,5^{\circ}\text{C}$ ogni minuto, fino al raggiungimento della temperatura dell'azoto liquido (-196°C).

PULIZIA MINICOOL 40

A scadenza **trimestrale** dal personale del laboratorio pulizia della vasca interna con disinfettante Oosafe e pulizia esterna con detergente neutro.

MODALITA' DI ACCESSO

LIMITAZIONI

L'accesso al laboratorio è limitato alle sole persone direttamente coinvolte nell'attività. Qualora ci sia la necessità di far accedere personale o persone esterne, vengono messe in atto tutte quelle procedure che limitino il più possibile l'eventualità di introdurre, anche se involontariamente, perturbazioni esterne di tipo contaminante o che influiscano sul processo lavorativo (introduzione di patogeni, perturbazione dei flussi di aria, urto con strumentazioni o personale che maneggia gameti o embrioni).

MAN-LAB-PMA



Manuale laboratorio PMA

Durante l'attività clinica è frequente che il personale medico debba accedere al laboratorio. Quando questo avviene è importante che l'abbigliamento del personale sia conforme alle richieste dell'ambiente di laboratorio.

Limitazioni severe vengono stabilite per l'ingresso dei materiali nell'area di laboratorio. Posto che il laboratorio è dotato di arredi consoni ed in linea con le esigenze di qualità ambientale e sanificazione dei locali, all'interno del laboratorio giungono le confezioni di materiali necessari alla routine di breve periodo. Lo stoccaggio delle scorte avviene in un armadio collocato fuori dall'area di laboratorio. Le confezioni che giungono direttamente dalle spedizioni (imballi di cartone, plastica rigida e polistirolo – con o senza elementi raffreddanti all'interno) non vengono introdotti all'interno del laboratorio. Il carico/scarico delle quantità a magazzino è effettuato in questa fase esternamente all'area laboratorio o successivamente solo registrando le bolle di consegna.

All'interno del laboratorio (eccetto i contenitori "ECO" per i materiali di scarto dell'attività di PMA) sono ridotti al minimo i cestini generici per la raccolta della carta o degli imballi della plastiche.

ABBIGLIAMENTO

Al laboratorio si accede in divisa ospedaliera/da laboratorio con manica lunga e pantalone di lunghezza adeguata. In caso di utilizzo di divisa ospedaliera a manica corta, si indossa sopra un camice monouso in tessuto non tessuto a manica lunga. La divisa non deve avere alcun elemento di sporgenza (es. tasche voluminose o asole) per evitare l'involontario aggancio e deve essere realizzata in tessuto liscio a basso rilascio di fibre.

Nel caso si verifichi una contaminazione accidentale dell'abbigliamento l'operatore provvede subito al cambio della divisa.

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



Manuale laboratorio PMA

CALZATURE

E' evidente come le calzature rientrino tra i maggiori veicoli di introduzione di patogeni e più in generale di contaminanti in qualunque ambiente. Tuttavia la letteratura ha altresì dimostrato come anche l'utilizzo di calzature dedicate in sala operatoria non garantisca affatto l'eliminazione del rischio infettivo (Amirfeyz et al. 2007). Un dato consolidato della letteratura invece stigmatizza l'utilizzo delle sovrascarpe ritenendole addirittura inutili (Weightman and Banfield 1994). Di fatto le sovrascarpe sono da destinarsi ad eventuali ingressi sporadici o per i visitatori occasionali ma non possono ritenersi idonee al permanere nella routine lavorativa sia per il loro rapido deteriorarsi sia per il discomfort dell'operatore legato alla mancata traspirazione ed al rischio di inciampo. Infine le sovrascarpe sono sconsigliate all'interno del laboratorio di criopreservazione per il rischio connesso alle manovre di manipolazione dell'azoto.

Pertanto all'interno del laboratorio, come per la sala operatoria, si prediligono calzature dedicate costituite da materiali che possano supportare cicli di sterilizzazione (autoclavabili) e che siano confortevoli. L'area di cambio calzatura è adiacente all'ingresso del laboratorio dove si trovano anche gli altri presidi.

CUFFIE

E' fondamentale mantenere sempre coperta la capigliatura durante le attività che si svolgono nel laboratorio di PMA. E' opportuno servirsi delle cuffie di carta/"tessuto non tessuto" tipicamente in uso nelle aree chirurgiche.

MASCHERINE

La mascherina va sempre indossata durante tutte le fasi delle procedure al fine di evitare la dispersione aerea di possibili contaminanti. La mascherina va indossata coprendo il naso e va allacciata sopra il copricapo/cuffia. Si può derogare dall'utilizzo della mascherina solo durante



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



Manuale laboratorio PMA

l'esecuzione delle micromanipolazioni ICSI poiché si lavora comunque fuori cappa e sott'olio. La mascherina viene rinnovata spesso.

GUANTI

I guanti vengono 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 arrivare a metà avambraccio. I guanti vengono cambiati frequentemente e comunque ad ogni inizio e fine procedura e ogni qual volta vengano in contatto diretto con il materiale biologico (sangue/sperma/fluido follicolare) per evitare il rischio di contaminare oggetti o superfici.

IGIENE e COSMESI del PERSONALE

Un trucco eccessivamente pesante, che comporti il rischio di caduta o deposito di polvere di ombretto, mascara o matita sul piano di lavoro e sugli oculari del microscopio deve essere evitato, così come vanno evitate dosi eccessive di profumo che possono disturbare i colleghi ed i pazienti anche in considerazione degli spazi ristretti nei quali spesso si opera. Un capitolo a sé va invece riservato alle unghie in senso più generale. Per la sicurezza del materiale manipolato e della propria igiene le unghie in laboratorio devono essere mantenute corte e pulite. Lo spazio sub-ungueale costituisce infatti un ricettacolo di patogeni. Il lavaggio delle mani deve avvenire con prodotti adeguati che oltre alla detersione offrano anche un'attività batteriostatica. Il lavaggio deve essere frequente nel proprio ed altrui interesse e comunque al biologo di laboratorio non è richiesto il lavaggio chirurgico delle mani inteso in senso stretto.

Durante l'attività è necessario togliere i monili dalle mani e dai polsi (anelli e bracciali); sarebbe preferibilmente eliminare anche l'orologio. I pendenti alle orecchie dovrebbero essere tolti o coperti dalla cuffia mentre non ci sono restrizioni ad indossare girocolli.

I monili in generale costituiscono una fonte di incorporazione di patogeni che poi vengono trasportati sulle superfici ed all'interno degli incubatori ed infine possono costituire un vettore infettivo che l'operatore si porta fino a casa.

MAN-LAB-PMA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



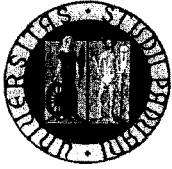
Manuale laboratorio PMA

COMPORAMENTO in ambiente A+D

Per le attività che attengono alla PMA non è necessario indossare un camice sterile poiché non si effettua una vera strumentazione chirurgica né si manipola con requisiti di sterilità assoluta, tuttavia sotto cappa occorre mantenere una pulizia adeguata di mani e braccia (ove richiesto guanti) e va scoraggiato l'utilizzo di qualsiasi altro indumento che non siano la divisa a maniche corte (che presuppone comunque l'utilizzo lavorando sotto cappa di guanti lunghi) o il camice monouso a maniche lunghe. Non è ammissibile indossare nel laboratorio il camice medico o giacche tipo "felpe". Inoltre le maniche (eccetto quelle strette a polso) costituiscono un rischio di intralcio o involontario urto del materiale sotto cappa. Tutti i movimenti sotto cappa devono svolgersi con pacatezza evitando spostamenti bruschi ed alzate improvvise. Quando dalla cappa ci si sposta portando con sé piastre e provette è necessario verificare che nessuno stia passando alla spalle, spostare prima la seduta e solo successivamente alzarsi.

Quanto ai materiali (provette, piastre, pipette...etc), questi devono essere macroscopicamente puliti ma non è richiesta una disinfezione esterna delle confezioni che devono comunque essere introdotte in laboratorio già tolte dall'imballo e prive di residui esterni di trasporto. Una cura particolare va posta al pipettatore automatico che, quando viene introdotto sotto cappa, deve essere dotato di batteria autonoma in modo da non portare nello spazio protetto di lavoro in flusso laminare il filo di alimentazione.

MAN-LAB-PMA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli

S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURA VESTIZIONE

Il personale autorizzato all'accesso al Laboratorio si cambia d'abito ed indossa l'apposita divisa e le calzature nella stanza adiacente al Laboratorio. In prossimità della porta di accesso al Laboratorio si cambia le calzature, indossa il camice monouso, il copricapo e la cuffietta.

Per quanto riguarda i *visitatori* ed i *tecnici* autorizzati dal Responsabile di Laboratorio, la procedura è la seguente:

- Utilizzo dei calzari monouso;
- Utilizzo dei camici monouso;
- Utilizzo del copricapo.



Manuale laboratorio PMA

PROCEDURE PER ORDINI MATERIALE

1. Tramite buono CSS2650 inviato al fax numero 4608 (farmacia) dal 1 al 15 di ogni mese

✚ Terreni di coltura

- Flushing con eparina: DZVF001
- IVF: D2VI001
- ISM1: D2VI002
- UTM: D2VU001
- SPM: D2VS005
- Isolate: D6SI001
- ICSI Cumulasi: D2VI003
- PVP: D2VP001
- Olio di paraffina: D2VO004

✚ Terreni di crioconservazione

- Oocyte freeze: D2VO001
- Embryo freezing: D2VF002
- Freezing Medium Test Yolk Buffer: D6SF010
- Oocyte thaw: D2VO002
- Embryo thawing: D2VT002
- Vittrificazione cooling: PAV2821
- Vittrificazione warming: PAV2822

✚ Vetrini precolorati per morfologia: DABV001

2. Tramite buono giallo CSA0210 inviato al fax numero 6088 (ufficio approvvigionamento)

- ✚ Cateteri per IUI: PIT1976
- ✚ Cateteri per ET: PIT1971



Manuale laboratorio PMA

- ✚ paillettes ad elevata sicurezza per crioconservazione: DZF0004
- ✚ jonc identificativi: DZF0003
- ✚ inject per ICSI: DZF4871
- ✚ holding: DZF4872
- ✚ inject per estrazione testicolare DZF4873
- ✚ pasteur cotonata di vetro: DZF4982
- ✚ vetrino Cell Vision CASA: DZG3607
- ✚ siringa 1 ml per ET: DZG4956
- ✚ scatola a 4 pozzetti Nunc: DZG5118
- ✚ capillari 135 micron: DZG5214
- ✚ capillari 150 micron: DZG5217
- ✚ capillari 175 micron: DZG5218
- ✚ pasteur 3 ml plastica: DZGF259
- ✚ provetta 6 ml fondo tondo tappo doppio scatto: DZGF302
- ✚ provetta 14 ml fondo tondo tappo doppio scatto: DZGF301

3. Tramite il servizio SCI-EURO-AZ, presente nel pc della Segreteria PMA, ordinando al magazzino generale

- ✚ Pipette sierologiche volume 1 ml: DZG5310
- ✚ Pipette sierologiche volume 10 ml: DZG5316
- ✚ Provetta 15 ml fondo conico tappo blu: DZG6059
- ✚ Piastra Petri piccola: DE7P500
- ✚ Piastra Petri media: DZGC405
- ✚ Piastra Petri grande: DZGC412
- ✚ Vetrino portaoggetto Menzel-Glaser: DZF9860
- ✚ Vetrino tedesco banda smerigliata: DZF9851
- ✚ Coprioggetto per vetrino: DZF9894



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore : Prof. Giovanni Franco Zanon
U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Direttore : Prof. Giovanni B. Nardelli
S.S. di Fisiopatologia della Riproduzione - Responsabile: Prof. Michele Gangemi

AZIENDA OSPEDALIERA
DI PADOVA



Manuale laboratorio PMA

- ✚ Contenitore polipropilene urine: DZG1560
- ✚ Acqua per soluzioni iniettabili: F46A016
- ✚ Farvicett clorexidina/Cetrimide: F48I313
- ✚ Ago ipodermico G 18: PIA1818
- ✚ Siringa 5 ml senza ago: PIA6171
- ✚ Guanto vinile non sterile misura S: PIG353E
- ✚ Guanto vinile non sterile misura M: PIG353F
- ✚ Guanto vinile non sterile misura L: PIG353G
- ✚ Garza sterile di cotone 10x10 cm: PMC2022
- ✚ Garza sterile di cotone 36x40 cm: PMC2024
- ✚ Tamponi garza 40 mm:
- ✚ Eppendorf: DZG3814
- ✚ TUBI COPRISTECCA IN CARTONE PAV1625

MAN-LAB-PMA