



## **RACCOMANDAZIONI DI BUONA PRATICA PER LA PREDISPOSIZIONE E L'ORGANIZZAZIONE DI LABORATORI DI EMBRIOLOGIA CLINICA E GENETICA MEDICA CHE ESEGUONO TEST GENETICI PREIMPIANTO**

### **A cura di:**

**SIERR:** Laura Albricci, Attilio Anastasi, Francesca Benini, Greta Cermisoni, Danilo Cimadomo, Christian Simon Ottolini, Valerio Pisaturo, Laura Sosa Fernandez, Catello Scarica.

**SIGU:** Antonio Capalbo, Domenico Dell'Edera, Laura Girardi, Clementina Radio, Alessandra Renieri, Daniela Zuccarello (a nome del GdL SIGU Citogenomica, Genetica prenatale e Riproduttiva).

La Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca (SIERR) e la Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) con questo documento mirano a definire le caratteristiche necessarie a garantire standard di qualità e sicurezza per i laboratori di Embriologia Clinica che offrono il servizio di biopsia del trofoectoderma, così come per i laboratori di Genetica Medica che eseguono test genetici preimpianto.

Le indicazioni contenute nel presente documento si basano su documenti tecnici di rilievo internazionale ed evidenze scientifiche valide. In assenza di queste ultime, si è scelto di avvalersi dell'esperienza maturata dai laboratori che eseguono grandi volumi di test genetici preimpianto.

# Indice

- 1. Il laboratorio di embriologia clinica che esegue biopsia embrionale**
  - 1.1 Requisiti strutturali, strumentazione e materiali**
    - 1.1.1 Requisiti strutturali
    - 1.1.2 Strumentazione
    - 1.1.3 Materiali
    - 1.1.4 Reagenti
  - 1.2 Counseling embriologico**
  - 1.3 Requisiti del personale, formazione e mantenimento delle competenze**
    - 1.3.1 Personale
    - 1.3.2 Formazione del personale
    - 1.3.3 Mantenimento delle competenze
  - 1.4 Controllo qualità, rintracciabilità e gestione del rischio**
    - 1.4.1 Identificazione del campione e tracciabilità
  
- 2. Il laboratorio di Genetica Medica che esegue Test genetici preimpianto (PGT)**
  - 2.1 Requisiti strutturali e strumentazione**
    - 2.1.1 Requisiti strutturali
    - 2.1.2 Strumentazione
  - 2.2 Counseling genetico**
  - 2.3 Requisiti del personale, formazione e mantenimento delle competenze**
    - 2.4.1 Personale
    - 2.4.2 Formazione del personale
  - 2.5 Certificazioni dei sistemi di gestione per la qualità e accreditamenti volontari**
    - 2.5.1 Sistemi di gestione per la Qualità secondo UNI EN ISO 9001
    - 2.5.2 Accreditamento secondo UNI EN ISO 15189
    - 2.4.3 Tracciabilità del campione
  
- 3. Bibliografia**

## Ringraziamenti

## Stakeholders

# 1. Il laboratorio di embriologia clinica che esegue biopsia embrionale

## 1.1 Requisiti strutturali, strumentazione e materiali

### 1.1.1 Requisiti strutturali

Il laboratorio di embriologia dovrebbe avere un'area spazialmente o temporalmente dedicata all'esecuzione della procedura. Questa area, come il resto del laboratorio, deve rispettare la normativa vigente in materia di qualità e sicurezza per i laboratori di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).

### 1.1.2 Strumentazione

La strumentazione per l'esecuzione della biopsia del trofoectoderma - da considerarsi aggiuntiva rispetto a quanto già necessario in un centro di PMA di II/III livello - include:

- Laser per biopsia (gestibile tramite mouse e/o pedaliera)
- Mini-centrifuga per tubi da PCR
- Sistema di stoccaggio adeguato in funzione delle indicazioni del laboratorio di genetica (es. frigorifero -20°C)

L'organizzazione del laboratorio e la disposizione della strumentazione dovrebbe favorire il flusso appropriato del personale e dei campioni all'interno dell'ambiente. I

In merito alla gestione della strumentazione far riferimento a quanto riportato all'interno dell'ultima edizione della *Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application* del European Directorate for the Quality of Medicines.

### 1.1.3 Materiali

I materiali da utilizzare durante la procedura, oltre a rispettare quanto stabilito dal Dlgs 16/2010, dovrebbero essere disponibili prima di iniziare una biopsia. Di seguito si riportano quelli strettamente necessari:

- Piastre da micromanipolazione
- Pipette per puntali 2-10µL
- Pipette per puntali 100 µL
- Puntali sterili priva di DNA e DNasi
- Micropipette per capillari
- Capillari privi di DNasi (diametro suggerito:  $\geq 270\mu\text{m}$  per la manipolazione della blastocisti;  $\leq 150\mu\text{m}$  per la procedura di tubing)
- Pipette da biopsia per micromanipolazione ( *Holding e Biopsy*)
- Provette sterili da PCR 200 µL
- PCR rack (refrigerato secondo le indicazioni del laboratorio di genetica)

### 1.1.4 Reagenti

---

Approvato dal CD:

10/11/2023

Data Pubblicazione:

05/02/2024

*Raccomandazioni di buona pratica per la predisposizione e l'organizzazione di laboratori di embriologia clinica e genetica medica che eseguono test genetici preimpianto*

Rev. 1

Pagina 3 / 26

- Terreno per l'esecuzione della biopsia (*HEPES, MOPS buffered* o altro)
- *Washing solution* (indicato/fornito dal laboratorio di genetica)
- *Loading solution* (indicato/fornito dal laboratorio di genetica)
- Olio minerale/paraffina
- PVP (opzionale)

Qualora si necessitasse di una maggiore stabilità della blastocisti durante la procedura è possibile utilizzare una pipetta *holding* con un diametro superiore rispetto a quanto utilizzato per l'ovocita (es. diametro interno 120  $\mu\text{m}$ ).

La pipetta per la biopsia del trofoectoderma può avere un diametro interno variabile (in generale intorno ai 25-37  $\mu\text{m}$ ). Per un controllo maggiore del flusso della pipetta potrebbe essere consigliabile utilizzare i calibri minori.

Quando possibile, tutte le soluzioni o i reagenti devono essere "pronti all'uso" e scelti in accordo con il laboratorio di genetica. Quando possibile, le soluzioni o i reagenti dovrebbero essere suddivisi in piccole aliquote e nessuna aliquota dovrebbe essere riutilizzata per un diverso caso clinico. Inoltre, è necessario garantire un'attenta conservazione di tutti i reagenti impiegati seguendo le raccomandazioni del produttore. Si raccomanda di evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo (se conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) o raffreddamento/riscaldamento (se conservati a  $4^{\circ}\text{C}$ ) di tutti i reagenti.

## 1.2 Counseling embriologico

Prima del trattamento, è essenziale fornire alla coppia una consulenza embriologica dettagliata e completa, condotta da un embriologo esperto nell'esecuzione della biopsia embrionale. Durante la consulenza, l'embriologo deve informare esaustivamente la coppia sul trattamento dei gameti e degli embrioni in laboratorio. Oltre a descrivere le fasi di laboratorio relative alla tecnica di inseminazione, alla coltura cellulare e all'esecuzione della biopsia, l'embriologo deve evidenziare le probabilità di successo, quali percentuale di fecondazione, blastulazione e sopravvivenza post biopsia, facendo riferimento alla letteratura scientifica e all'esperienza del centro.

La coppia deve essere consapevole dei potenziali rischi e limiti legati alla biopsia, inclusa la possibilità di una ri-biopsia dell'embrione, qualora risulti necessaria. La consulenza dovrebbe anche includere informazioni dettagliate sulla crioconservazione, riportando le percentuali di successo della letteratura e del centro.

## 1.3 Requisiti del personale, formazione e mantenimento delle competenze

### 1.3.1. Personale

Il personale di laboratorio che manipola gli embrioni deve essere un laureato abilitato all'esercizio delle professioni di biologo (Sezione A). Per dettagli sul percorso professionale e le responsabilità inerenti al ruolo dell'embriologo clinico, si rimanda al "Documento per la Definizione del Profilo Professionale dell'Embriologo

Clinico”, elaborato dalla Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca (SIERR) e approvato dall'Ordine Nazionale dei Biologi (ONB), inclusi eventuali aggiornamenti successivi.

Il numero di embriologi, adeguatamente qualificati e competenti nell'esecuzione delle biopsie del trofoectoderma, deve essere proporzionato al volume annuale di cicli di test preimpianto effettuati presso il centro di PMA. Tale numero deve tener conto anche delle attività di archiviazione dati e consensi, nonché della gestione della qualità e della tracciabilità correlate. È imperativo che più di un individuo sia formato per garantire la continuità operativa in caso di assenze del personale.

Si raccomanda che il personale di laboratorio che svolge l'attività clinica inerente ai cicli di diagnosi preimpianto sia competente e propriamente formato o supervisionato da una persona adeguatamente formata. Si enfatizza dunque l'opportunità di partecipare a programmi di formazione specifici (workshop, formazione pratica, formazione individuale) per le procedure di embriologia e biopsia del trofoectoderma. Tutto il personale deve documentare il proprio livello di competenza e/o relativo mantenimento delle competenze, come delineato nel paragrafo “1.5 Mantenimento delle Competenze”.

Un'indagine condotta dal Quality Interest Group di Asebir (*Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*) ha evidenziato l'importanza critica di disporre di un numero adeguato di operatori qualificati per garantire l'efficacia, l'efficienza e la sicurezza delle pratiche di laboratorio. A tal fine, è disponibile lo strumento di calcolo CASSANDRA sul sito web <https://asebir.com/cassandra-calculador-de-rrhh/> (Veiga et al., 'Recalculating the Staff Required to Run a Modern Assisted Reproductive Technology Laboratory', HR 2022).

### 1.3.2 Formazione del personale

Requisiti preliminari per la formazione su materiale biologico

Per acquisire le competenze di base necessarie all'esecuzione della biopsia del trofoectoderma, il personale in formazione deve possedere una solida comprensione dei seguenti aspetti:

- **Competenze Teoriche**

Le competenze teoriche da acquisire, che non richiedono la manipolazione diretta di materiale biologico, includono:

#### Biologia dell'Embrione e Tecniche Procedurali

- Comprensione dei vantaggi della biopsia del trofoectoderma rispetto alla biopsia del globulo polare e del blastomero.
- Conoscenza delle tecniche di biopsia specifiche, come 'pulling' e 'flicking'.

#### Risultati e Implicazioni Genetiche

- Comprensione dei possibili risultati genetici e delle loro implicazioni cliniche, inclusa la probabilità di gravidanza in caso di trasferimento di un embrione euploide o 'presunto mosaico cromosomico' (come indicato negli studi ESHRE).

## Normativa e Sicurezza

- Conoscenza della legislazione italiana relativa ai test genetici preimpianto.
- Comprensione dell'importanza della decontaminazione dell'ambiente circostante l'embrione e dell'uso di un ambiente privo di DNAsi per i test genetici preimpianto.

## Norme comportamentali per ridurre il rischio di contaminazione

- Rispetto delle norme di vestizione. Si raccomanda di indossare casacche che coprano gli avambracci fino ai polsi e l'uso continuo di guanti da cambiare frequentemente.
- Rispetto delle procedure di pulizia. Si raccomanda di pulire e decontaminare le superfici di lavoro, le attrezzature e le cappe con prodotti di provata compatibilità ed efficacia per l'uso in un laboratorio di embriologia (es. sali di ammonio quaternario) oppure, ove possibile, cicli di decontaminazione con lampade UV.
- Conoscenza degli aspetti procedurali atti a ridurre il rischio di contaminazione:
  - Evitare di toccare con le dita l'interno delle provette da PCR;
  - Evitare di toccare l'esterno o il coperchio delle provette da PCR con la punta della pipetta; qualora dovesse accadere, cambiare immediatamente il puntale;
  - Non tenere le provette da PCR aperte più del necessario;
  - Si consiglia di sostituire la pipetta per la biopsia dopo la biopsia di un embrione per evitare una possibile contaminazione tra i diversi campioni. In alternativa, è possibile optare per il risciacquo della pipetta, previa verifica della sua efficacia nel proprio setting di laboratorio.

## Altri Aspetti

- Conoscenza delle motivazioni che guidano la scelta di terreni e materiali di consumo.

È consigliabile fornire al personale in formazione materiale didattico visivo, come presentazioni grafiche contenenti fotografie e video, o offrire l'opportunità di osservare casi clinici in tempo reale. L'obiettivo è che il personale sia non solo a conoscenza delle procedure e delle tecniche, ma sia anche in grado di applicarle e interpretarle in contesti reali. In particolare, essi dovrebbero essere preparati a gestire le situazioni più comuni che è probabile incontreranno nell'esercizio delle loro funzioni come operatori specializzati in biopsia del trofoectoderma.

In conclusione, il personale in formazione deve dimostrare un'approfondita comprensione delle scelte tecniche e procedurali adottate nel laboratorio, al fine di garantire la massima sicurezza e salvaguardia dell'embrione durante l'intero processo.

- **Competenze Pratiche in assenza di materiale biologico**

Le competenze pratiche da acquisire, che non implicano la manipolazione diretta di materiale biologico, sono le seguenti:

Ambiente e Strumentazione

- Conoscenza delle procedure per lavorare efficacemente sotto una cappa a flusso verticale, garantendo un adeguato livello di decontaminazione.
- Familiarità con la strumentazione necessaria per la procedura di biopsia, inclusi i dettagli specifici di ogni apparecchio utilizzato.

Uso di Attrezzature Specifiche

- Capacità di montare e allineare correttamente le pipette da biopsia, sia holding che biopsy.
- Abilità nell'utilizzare il micromanipolatore, con una dimostrata competenza nel controllo dell'aspirazione.

Calibrazione e Impostazioni

- Conoscenza delle procedure per controllare le impostazioni e la calibrazione del laser. Il personale dovrebbe anche essere educato a calibrare il laser autonomamente, qualora fosse necessario.
- L'embriologo deve essere pienamente consapevole delle procedure da seguire in caso di malfunzionamenti o indisponibilità del laser. In tali circostanze, è imperativo che la biopsia dell'embrione non venga effettuata. Gli embrioni in questione dovrebbero essere immediatamente crioconservati, in modo da poter procedere con una biopsia in un momento successivo, qualora fosse necessario.

Standardizzazione in laboratorio

- Essere in grado di identificare il momento più opportuno per eseguire la biopsia, seguendo quanto definito nelle istruzioni operative del laboratorio. Utilizzare sia immagini statiche che video in time-lapse per valutare l'espansione della blastocisti e il numero di cellule del trofoectoderma, al fine di standardizzare le procedure tra diversi operatori all'interno dello stesso laboratorio.
- Essere in grado di preparare adeguatamente le piastre. Le gocce di terreno devono essere posizionate al centro del piatto e numerate in base al numero dell'embrione per garantire la tracciabilità. Se più embrioni sono collocati nella stessa piastra, il layout deve essere disegnato per minimizzare la possibilità di fusione tra le gocce che contengono gli embrioni.
- Essere formati sull'importanza della testimonianza (elettronica e/o umana), di come debba essere eseguita, e consapevoli di quali siano i passaggi critici della procedura al fine di assicurare la corretta identificazione dei campioni.

- **Competenze Pratiche su materiale biologico**

Dopo aver acquisito le competenze pratiche in assenza di materiale biologico, la fase successiva è la formazione pratica attraverso la manipolazione. Va notato che la risposta degli embrioni alla biopsia può variare significativamente. Per sviluppare sia competenza che sicurezza nella biopsia del trofoectoderma, è vantaggioso sottoporsi a sessioni intensive di biopsia su vari embrioni, preferibilmente nello stesso giorno o in un breve periodo di tempo. Questo approccio intensivo consente di:

- Acquisire abilità tecniche fondamentali
- Migliorare la rapidità e l'efficacia nell'esecuzione della procedura
- Avanzare lungo la curva di apprendimento

Data l'importanza di questa formazione pratica, è altamente consigliabile partecipare a workshop specializzati. Questi corsi, disponibili sia in Italia che all'estero, offrono l'opportunità di eseguire pratiche intensive su materiale biologico non utilizzato in ambito clinico.

Le blastocisti di topo di buona qualità rappresentano un valido modello per la formazione alla biopsia del trofoectoderma, poiché il comportamento delle cellule del trofoectoderma durante la biopsia è simile a quello riscontrato nelle blastocisti umane. Gli embrioni di topo sono facilmente reperibili, rendendo possibile la realizzazione di sessioni intensive di formazione pratica.

Il biologo, a conclusione della formazione intensiva, sotto la supervisione di un biologo senior, deve essere in grado di:

- Aver controllo e manualità per ruotare la blastocisti nella posizione ottimale per la biopsia in breve tempo
- Eseguire l'apertura della zona pellucida secondo le procedure operative del laboratorio (questo foro deve essere circa la metà del diametro della pipetta per biopsia)
- Mettere a fuoco correttamente la porzione di cellule che saranno interessate dalla biopsia per garantire l'accuratezza nell'utilizzo del laser
- Saper prelevare le cellule con la pipetta da biopsia mediante un'aspirazione controllata e delicata per evitare la lisi cellulare
- Applicare gli impulsi laser sulle giunzioni cellulari mentre applica la "tensione" sul tessuto aumentando leggermente l'aspirazione
- Ottenere il frammento con un numero minimo di impulsi laser
- Eseguire la biopsia del trofoectoderma secondo le indicazioni riportate nelle procedure operative di laboratorio
- Spostare l'embrione in una piastra di coltura, in presenza di un testimone fino alla sua crioconservazione
- Eseguire la procedura di tubing, in presenza di un testimone, secondo le procedure operative del laboratorio. La formazione in merito alla procedura del tubing dovrebbe essere validata da un tasso di campioni non diagnosticabili (dovuto fallimenti di amplificazione e risultati non interpretabili)  $\leq 5\%$  (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, 2020) e da una assenza di contaminazioni da DNA esogeno.



Secondo i dati pubblicati dai centri nazionali e internazionali con maggiore esperienza di PGT, il valore di benchmark in merito al tasso di campioni non diagnosticabili dovrebbe essere  $\leq 3\%$  (Cimadomo et al., HR, 2018).

### Progressione nei casi clinici

In seguito all'autorizzazione del responsabile di laboratorio, i biologi in formazione possono eseguire, sotto la supervisione continua di un biologo competente, le biopsie di alcuni casi clinici: per esempio, iniziando con blastocisti di minor qualità morfologica in cicli in cui siano stati già collezionati campioni di biopsia embrionaria da embrioni di buona qualità morfologica. Quando il supervisore avrà rilevato una buona padronanza della tecnica, i biologi in formazione potranno biopsiare una maggiore porzione della coorte embrionaria fino all'esecuzione di biopsie del trofoectoderma dell'intera coorte embrionaria di una coppia.

È altamente consigliato che il biologo in formazione effettui la biopsia del trofoectoderma di un embrione per volta. In generale, anche nel caso dell'esecuzione da parte di un biologo esperto nella procedura, è altamente sconsigliato eseguire la biopsia del trofoectoderma su più di quattro embrioni contemporaneamente in una piastra. Ciò consente un adeguato distanziamento tra gli embrioni nella piastra, e contiene il tempo in cui l'embrione permane fuori dall'incubatore.

In linea con quanto suggerito dall'ESHRE (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, 2020), si raccomanda un numero minimo di 50 procedure di biopsia e tubing per considerare conclusa la fase di formazione.

La biopsia del trofoectoderma richiede embriologi preparati e altamente specializzati. Attraverso questo percorso formativo, i biologi saranno in grado di acquisire esperienza all'interno di un programma attentamente monitorato, garantendo che la loro formazione non influisca negativamente sui risultati clinici dei cicli di PMA.

### *1.3.3 Mantenimento delle competenze*

Ciascun operatore formato e autorizzato ad eseguire la biopsia del trofoectoderma è tenuto a registrare un numero minimo di procedure all'anno nell'ottica della verifica e della valutazione della formazione, del mantenimento e del miglioramento delle competenze (il numero minimo adeguato al mantenimento delle stesse è stabilito dal responsabile di laboratorio sulla base del numero di cicli di biopsie del trofoectoderma eseguite nel proprio centro e delle raccomandazioni e linee guida nazionali e/o internazionali).

Si raccomanda di eseguire una convalida delle competenze al rientro di un operatore dopo un periodo prolungato di assenza. Questo percorso di reintegro nel team dell'operatore può essere realizzato attraverso diverse modalità, come la visione di video delle biopsie del trofoectoderma, l'affiancamento da parte di un operatore esperto con una quantità definita di procedure stabilite dal responsabile di laboratorio, e il monitoraggio regolare degli indicatori di performance per l'operatore.

Alcuni utili indicatori di performance da considerare sono:

- Tempo impiegato ad eseguire la procedura per embrione (Maggiulli et al., J Vis Exp, 2019)
- Tasso di di campioni non diagnosticabili: competence value  $\leq 5\%$  (ESHRE working group on embryo biopsy, Human Reproduction Open, 2020)
- Tasso di sopravvivenza della blastocisti allo scongelamento: competence value  $\approx 90\%$ ; benchmark  $\approx 99\%$  (Vienna Consensus, Reprod BioMed Online, 2017).
- Tasso di gravidanza clinica dopo trasferimento di un embrione euploide: competence value  $\approx 45\%$ ; benchmark  $\geq 60\%$  (Vaiarelli et al., JARG, 2023)
- Il tasso di aborto spontaneo dopo trasferimento di blastocisti euploide: competence  $\leq 15\%$ ; benchmark  $\leq 10\%$  (Vaiarelli et al., JARG, 2023).

E' bene inoltre tenere in considerazione che, mentre il tempo impiegato per eseguire la procedura dipende esclusivamente dall'operatore e dal numero di blastocisti da biopsiare per ogni procedura, tutti gli altri outcomes potrebbero essere influenzati da altri fattori confondenti, indipendenti dall'operatore della biopsia (per esempio, la tecnica e la qualità dell'analisi molecolare, la qualità morfologica della blastocisti, il giorno della biopsia). Questi possibili confondenti dovrebbero essere presi in considerazione per valutare correttamente le prestazioni dell'embriologo.

Nel caso in cui ci fossero degli indicatori di performance per operatore non ottimali si consiglia di suddividere la coorte di blastocisti per ogni caso clinico tra due embriologi con comprovata competenza. Se necessario, si consiglia, sotto indicazione del responsabile di laboratorio, di procedere con l'affiancamento di un altro operatore e/o con un percorso di formazione finalizzato a una riconvalida delle competenze.

La letteratura scientifica non fornisce al momento evidenze concrete riguardanti un numero minimo di procedure di biopsia del trofoectoderma necessarie a garantire un mantenimento adeguato della formazione. Per tale motivo si ritiene doveroso attenersi al monitoraggio degli indicatori di performance sopracitati.

#### **1.4 Controllo qualità, rintracciabilità e gestione del rischio**

I centri di Procreazione Medicalmente Assistita, essendo riconosciuti come istituti dei tessuti, sono tenuti a adottare un rigoroso sistema di gestione della qualità (SGQ) secondo i principi di buona prassi, come stabilito dal D. Lgs 191/2007. Nel caso di percorsi di PMA che includono trattamenti di PGT, avere un SGQ ben strutturato risulta più che mai fondamentale, data la complessità del percorso che vede coinvolte terze parti (laboratorio di genetica), e i diversi momenti critici che caratterizzano la fase specifica di trattamento. Per poter mappare e presidiare, secondo normativa, le aree critiche del processo di gestione delle cellule riproduttive fino alla salvaguardia dell'embrione, sarà necessario sviluppare un SGQ che definisca:

- la gestione delle risorse umane al fine di qualificare la correttezza delle fasi di addestramento e mantenimento delle competenze con le sinergie tra i vari profili professionali richiesti dalla normativa
- la gestione adeguata della documentazione necessaria ad attestare la presenza di un sistema qualità attivo e sinergico
- l'utilizzo di indicatori applicabili, coerenti con la normativa, atti a misurare l'andamento delle prestazioni del Centro

- esecuzione di audit
- la gestione delle non conformità tipiche dei Centri PMA e la modalità corretta di notifica degli eventi avversi e reazioni avverse gravi.
- L'utilizzo di strumenti per la gestione del rischio, sia in termini proattivi che reattivi.

Le raccomandazioni relative al controllo qualità e la valutazione dei rischi sono presenti nel manoscritto riguardante l'organizzazione logistica dei test preimpianto (ESHRE PGT Consortium Steering committee, 2020). Per gli aspetti generali inerenti il sistema di gestione della qualità si rimanda all'ultima revisione del "Manuale per la Gestione di un laboratorio di PMA" SIERR CNT e alla Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application - European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM) in vigore.

#### *1.4.1 Identificazione del campione e tracciabilità*

Gli aspetti inerenti all'identificazione del campione e la tracciabilità richiedono particolare attenzione nei trattamenti di PGT. Le raccomandazioni relative all'etichettatura e alla testimonianza sono presenti nel manoscritto riguardante l'organizzazione logistica dei test preimpianto (ESHRE PGT Consortium Steering committee, 2020). Si raccomanda di utilizzare un sistema di etichettatura adeguato, scritto o con codice a barre (elettronico), con identificatori univoci del paziente, del ciclo e del numero dell'embrione, per garantire la tracciabilità durante tutto il processo di coltura embrionaria e PGT fino alla comunicazione dei risultati finali. Il sistema di etichettatura deve essere comprensibile e pratico per i centri di PMA con trattamenti di test preimpianto. L'etichettatura con adesivi stampati può risultare una metodica maggiormente efficace dei pennarelli non tossici indelebili, in quanto l'etichettatura deve essere leggibile e non modificabile. L'utilizzo di sistemi di testimonianza elettronica è consigliato.

L'attività di testimonianza è imprescindibile in ogni passaggio critico per garantire la tracciabilità dell'embrione, dalla biopsia al trasferimento embrionario (Cimadomo et al, Reprod Biomed Online. 2016). Il trasferimento dell'embrione dalla piastra in cui è stata eseguita la biopsia alla piastra di coltura, ogni passaggio di piastra di coltura dopo la biopsia, la procedura del tubing, la crioconservazione, lo scongelamento e il trasferimento embrionario sono passaggi critici per il quale è fondamentale seguire traccia del singolo embrione.

L'etichettatura e l'identificazione dei campioni devono essere confermate da un testimone e firmate per le fasi critiche e ad alto rischio. Queste fasi critiche sono descritte in dettaglio nei documenti tecnici dei vari metodi (ESHRE PGT-M Working Group, 2020, ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, 2020, ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, 2020).

## 2. Il laboratorio di Genetica Medica che esegue Test genetici preimpianto (PGT)

### 2.1 Requisiti strutturali e strumentazione

#### 2.1.1 Requisiti strutturali

Il laboratorio di genetica medica che esegue test preimpianto (PGT Unit) deve essere costituito da un'area a sé stante esclusivamente dedicata all'esecuzione dell'analisi molecolare di biopsie embrionali, che rispetti tutti gli standard ambientali e di sicurezza previsti dalle normative e raccomandazioni vigenti, volte ad evitare la contaminazione del campione ed a mantenere condizioni di sterilità.

Il laboratorio deve possedere i requisiti minimi strutturali stabiliti dal D.P.R. 14/1/1997 (Suppl. Ord. alla G.U. n.42 del 20/02/1997) per i servizi di medicina di laboratorio. Spazi e strumentazione devono essere adeguati a garantire la qualità delle analisi erogate. Il numero e le dimensioni dei locali devono essere proporzionati ed adeguati al numero del personale e alla tipologia delle attività svolte secondo quanto previsto dalle norme vigenti. Si richiamano in particolare i seguenti riferimenti nazionali e internazionali (e successive modifiche):

- American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG): Standards and guidelines for clinical genetics laboratories 2021 edition
- ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organization of PGT (ESHRE PGT Consortium Steering Committee et al, Hum Reprod Open 2020)
- Standard SIGUCERT Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica ed. 2018
- Provvedimento che individua le prescrizioni contenute nelle Autorizzazioni generali nn. 1/2016, 3/2016, 6/2016, 8/2016 e 9/2016 che risultano compatibili con il Regolamento e con il d.lgs. n. 101/2018 di adeguamento del Codice - 13 dicembre 2018
- Diagnosi Genetica Preimpianto – PGT- Raccomandazioni SIGU 2017 per la pratica clinica.
- OMS, Laboratory Biosafety Manual, terza edizione (2004) pubblicato in Italia da ISPESL Manuale di biosicurezza nei laboratori, edizione italiana, AIREPSA 2005
- Linee-guida per le attività di Genetica medica - Conferenza Stato-Regioni del 15 luglio 2004 (GU n.224 del 23.09.2004)
- Attuazione delle linee guida per le attività di genetica Medica - Conferenza Stato-Regioni del 26 novembre 2009
- D.P.R. 14/1/1997 (Suppl. Ord. alla G.U. n.42 del 20/02/1997)
- Norma UNI 10339:2008 e Norma EN 13779, entrambe parzialmente aggiornate in UNI EN 16798-3:2018.

Dal momento che non esiste una normativa nazionale specifica che identifichi i requisiti minimi di un laboratorio di genetica molecolare, il gruppo di lavoro costituito da esperti della SIGU (Società Italiana Genetica Umana) ha identificato una serie di requisiti di base che dovrebbe avere un laboratorio che esegue PGT. La PGT Unit dovrebbe essere configurata come un laboratorio di livello BSL2 (secondo la classificazione OMS e le misure riportate nell'Allegato XLVII del D. Lgs. 81/08), ove possibile con ventilazione invertita, che preveda un accesso limitato alle persone autorizzate, zona filtro, locale pre-PCR e locale post-PCR, percorso unidirezionale pulito-sporco.

Per l'esecuzione dei test preimpianto i laboratori devono essere dotati di aree idonee per:

- estrazione del DNA;
- allestimento PCR;
- acquisizione ed elaborazione dei dati;
- immagazzinamento di sostanze pericolose (reagenti chimici/infiammabili, radioattivi) secondo le normative vigenti;
- stoccaggio dei rifiuti secondo le normative vigenti.

I principali locali del laboratorio sono due e devono essere distinti in:

1. "zona pre-amplificazione" per preparazione dei reagenti, separazione del DNA dai campioni in arrivo e messa a punto della reazione di amplificazione (cosiddetta "zona pulita").
2. "zona post-amplificazione" per l'esecuzione della reazione di amplificazione, l'esecuzione del test e la valutazione dei dati ottenuti (cosiddetta "zona sporca").

È importante che esista separazione fisica tra i locali di cui ai punti 1 e 2. Materiali e strumenti presenti in questi locali devono essere dedicati, cioè impiegati esclusivamente all'interno dei rispettivi locali. In tali locali, le superfici di lavoro devono essere effettivamente impermeabili e decontaminabili; le pareti fino a 2 metri ed i pavimenti devono garantire la possibilità di una efficace decontaminazione da inquinanti biologici.

I Laboratori, oltre agli spazi dedicati all'attività analitica, devono possedere aree idonee a:

- accettazione dell'utenza e dei campioni.
- svolgimento, con garanzie di riservatezza e tranquillità, della consulenza collegata ai test genetici.
- conservazione dei risultati dei test genetici, in accordo con le norme vigenti per la protezione dei dati personali.
- consultazione di banche dati e di bibliografia computerizzata.
- discussione e refertazione del dato laboratoristico.

Le funzioni amministrative e di archivio devono essere svolte in locali separati e accessibili solamente a personale autorizzato.

I laboratori devono inoltre rispettare la normativa vigente in ambito di tutela della salute e della sicurezza dei lavoratori e di gestione dei rifiuti. L'applicazione di quanto sopra riportato deve essere documentata.

I principali requisiti della struttura sono: ambienti completamente sanificabili con pareti ricoperte di materiale non assorbente e sguscio di raccordo con il pavimento; arredi tecnici sanificabili che evitino l'accumulo di polvere e sporco; porte di accesso con serratura e apri-porta senza contatto; ove possibile ventilazione meccanica con flusso d'aria verso l'esterno.

Nel dettaglio, è opportuno che l'impianto di ventilazione e filtrazione abbia le seguenti caratteristiche (in riferimento alla normativa EN ISO 14644-4:2023 per laboratori di classe ISO 8 (grado D delle GMP):

- Condizionamento ad aria primaria con pressione positiva
- Unità di trattamento aria di tipo ospedaliero
- Numero minimo di ricambi con aria esterna (senza ricircolo): 8-10 vol/h ricambi aria/ora 6 v/h
- Umidità relativa 30-60% ottenuta con umidificatore e regolata da apposito igrometro;
- Temperatura invernale ed estiva 21-24°C

- Filtraggio aria 99.97%
- Dispositivi di controllo, regolazione e allarme, gestibili direttamente in campo e a distanza

Requisiti minimi dell'impianto elettrico:

- Presenza, oltre alla rete elettrica standard normale (prese universali e industriali), della rete sotto gruppo di continuità
- Idonea illuminazione di emergenza e relativa segnaletica

Requisiti minimi dell'impianto idrosanitario:

- Rete di distribuzione dell'acqua sanitaria nonché una rete di distribuzione di acqua demineralizzata per usi di laboratorio (raccomandata)
- Postazioni di lava-occhi di emergenza.

Ulteriori requisiti impiantistici:

- Impianto rilevazione fumi e allarme anti-incendio
- Impianto di monitoraggio della temperatura di frigoriferi e congelatori (con allarme locale e da remoto).

### 2.1.2 Strumentazione

I Laboratori di Genetica Medica che eseguono i test preimpianto (PGT) devono essere dotati di attrezzature di laboratorio adeguate ad eseguire i test genetici proposti, garantendo al contempo il contenimento dei rischi di contaminazione e la tutela del lavoratore.

In particolare, una PGT Unit deve essere dotata delle attrezzature essenziali di sicurezza per un laboratorio BSL-2 (colonna B.2 dell'Allegato XLVII del D. Lgs. 81/08) e di una strumentazione di base, con marcatura CE, composta da:

- Cappa a flusso laminare verticale di classe 2;
- Cappa chimica con idoneo aspiratore;
- centrifughe con caratteristiche adeguate all'uso;
- Frigoriferi e congelatori con monitoraggio costante della temperatura;
- Autoclave;
- Incubatori e bagnomaria con monitoraggio costante della temperatura;
- Spettrofotometro o sistema equivalente per quantizzazione DNA;
- Apparecchio per analisi qualitativa dei frammenti di DNA;
- Agitatore.

Inoltre, in base al tipo di tecnologia utilizzata nella specifica PGT Unit per eseguire l'analisi PGT, dovranno essere presenti:

- Termociclatore (PCR) CE-IVD;
- Sequenziatore massivo in parallelo (NGS);
- Analizzatore genetico multi-capillare automatico a tecnologia fluorescente o equivalente (opzionale);
- Scanner per SNP-array (opzionale);

- Termociclatore (PCR) Real-time (opzionale);
- Robot preparatore (raccomandato)

Tutte le attrezzature e gli equipaggiamenti devono essere adeguati al volume e alla tipologia delle analisi eseguite e devono rispondere agli standard della Comunità Europea.

Tutti gli strumenti considerati “critici” (ad esempio, i termostati per le colture cellulari, i congelatori, le centrifughe) devono essere previsti in doppio, dotati di idonea illuminazione di emergenza, di allarme e collegati a gruppi di continuità. Se per qualsiasi ragione un qualunque strumento “critico” non è presente in doppio, il laboratorio deve avere una procedura scritta che descriva come sopperire alle eventuali difficoltà che possono insorgere a seguito di un guasto.

Devono essere assicurati adeguati controlli periodici di impianti elettrici e attrezzature.

La documentazione relativa alla manutenzione ordinaria, preventiva e straordinaria deve essere conservata.

Il laboratorio deve inoltre possedere un sistema informatico gestionale e devono attivare sistemi in grado di garantire la qualità e di assicurare la protezione dei dati e la loro corretta conservazione (ad esempio, backup periodici eseguiti da personale autorizzato), secondo le vigenti normative (D.L. n. 101 del 10 agosto 2018 e GDPR 2016/679). I laboratori devono assicurare e documentare la protezione da intrusioni e danni degli strumenti informatici utilizzati, che possono comportare la perdita o la condivisione illecita di dati sanitari.

## **2.2 Counselling genetico**

Prima dell’esecuzione del PGT e a seguito dell’emissione del referto di PGT, è raccomandata per la coppia l’esecuzione della consulenza genetica eseguita da dirigenti sanitari (medici o biologi) con specializzazione in genetica medica, per la scelta dell’approccio diagnostico più informativo e l’interpretazione e discussione dei risultati, secondo le raccomandazioni della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU).

## **2.3 Requisiti del personale, formazione e mantenimento delle competenze**

### *2.3.1 Personale*

Il personale di laboratorio di genetica medica deve essere laureato abilitato all’esercizio delle professioni di biologo (Sezione A) - (Costituiscono titolo di accesso, in relazione ad ogni singola abilitazione, le lauree, le classi di laurea specialistica o i diplomi universitari previsti dal regolamento sugli esami di Stato, approvato con D.M. 9 settembre 1957 e successive modificazioni ed integrazioni e dal D.P.R. n. 328 del 5 giugno 2001, recante “Modifiche ed integrazioni della disciplina dei requisiti per l’ammissione agli esami di Stato e delle relative prove per l’esercizio di talune professioni, nonché della disciplina dei relativi ordinamenti”). Inoltre, per il personale dirigente operante in strutture pubbliche o strutture private accreditate con il SSN, oltre alla laurea magistrale è obbligatoria la specializzazione in una delle branche della medicina di laboratorio (DPR 483/1997).

L’esecuzione dei test genetici preimpianto richiede la presenza di personale dedicato con formazione specifica e competenze multidisciplinari in linea con la normativa nazionale e regionale oltre che le linee guida nazionali e internazionali. In particolare, i test genetici preimpianto devono garantire la stessa qualità dei test genetici eseguiti di routine in ambito diagnostico. Tuttavia, in considerazione della peculiarità che li

caratterizza, i test genetici preimpianto dovrebbero beneficiare di aspetti organizzativi volti a integrare i centri di riproduzione medicalmente assistita, i laboratori di embriologia, i laboratori di genetica medica dedicati al diagnosi preimpianto e i laboratori di genetica medica dedicati alla diagnosi prenatale in un sistema localmente integrato o in un quadro di integrazione diffusa che permetta lo scambio sicuro di informazioni e campioni in un sistema di rete.

In dettaglio, il personale impiegato in un laboratorio di genetica medica che esegue PGT deve garantire la presenza, numericamente stabilita sulla base dei volumi di lavoro attesi, di diverse figure professionali. Tra queste dovrebbero essere presenti:

- Dirigenti sanitari (medici o biologi) altamente qualificati con specializzazione in genetica medica ed esperienza nella diagnosi preimpianto (come da indicazione delle Linee-guida per le attività di Genetica medica - Conferenza Stato-Regioni del 15 luglio 2004 - GU n.224 del 23.09.2004) per l'esecuzione e refertazione dei test genetici PGT.
- Biologi collaboratori altamente qualificati con esperienza nella diagnosi preimpianto con titoli previsti dalle normative regionali e nazionali. Si raccomanda fortemente, in ogni caso, che i biologi siano in possesso di un diploma di specializzazione in genetica medica o disciplina equipollente.
- Tecnici di laboratorio con competenze nella gestione e utilizzo di campioni biologici e nella gestione/manutenzione delle attrezzature di laboratorio;
- Dirigenti sanitari (medici o biologi) con specializzazione in genetica medica per l'esecuzione di un servizio di consulenza genetica dedicato per la scelta dell'approccio diagnostico più informativo e l'interpretazione e discussione dei risultati con la coppia, al fine di trasferire informazioni utili alla riproduzione consapevole. Il biologo specialista in genetica medica può eseguire consulenza genetica pre- e post-test che non riguardi l'ambito clinico-assistenziale.

Si raccomanda inoltre che:

- Il direttore del laboratorio PGT abbia la specializzazione in Genetica Medica e una comprovata esperienza nel settore della PGT.
- Il personale del laboratorio di PGT sia numericamente adeguato ai carichi di lavoro. Escluso il direttore, in linea generale, si considera adeguato un numero minimo di due biologi con competenza in biologia o genetica molecolare, un tecnico di laboratorio e un assistente amministrativo.

In merito al carico di lavoro, per il mantenimento della specifica competenza di PGT, si considera adeguato per un laboratorio di PGT che voglia mantenere elevati standard di qualità l'esecuzione dell'analisi PGT di almeno 50 campioni all'anno, unitamente alla partecipazione a programmi di valutazioni esterne di qualità nazionali e internazionali. Questa raccomandazione è frutto di una expert opinion del tavolo di lavoro SIGU.

### *2.3.2 Formazione del personale*

Si riportano di seguito i principali documenti/standard di riferimento:

- UNI EN ISO 9001:2015: Sistema di gestione per la qualità
- UNI EN ISO 15189:2022 Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza
- Programma nazionale di ECM (DLgs 502/1992 integrato dal DLgs 229/1999)



Il personale di un laboratorio di Genetica Medica che esegue test genetici deve essere adeguatamente formato e la competenza deve essere periodicamente rivalutata. Il programma di formazione e la valutazione delle competenze devono essere formalizzati in procedure documentate. Al momento non sono disponibili percorsi accademici mirati a garantire il raggiungimento delle competenze per l'esecuzione della diagnosi preimpianto. Si raccomanda pertanto l'acquisizione di tale titolo per gli operatori coinvolti. È inoltre indicato definire un programma di formazione continua per gli operatori del settore e un percorso a garanzia della qualità delle prestazioni fornite, diretto alla valutazione di tutte le attività, incluso l'uso delle attrezzature, le procedure operative utilizzate, la protezione dei dati.

L'addestramento e l'aggiornamento nei laboratori PGT riguardano tre aspetti principali: (i) le capacità tecnico-scientifiche per eseguire le attività, sia a livello diagnostico/clinico che a livello organizzativo; (ii) la conoscenza del sistema di gestione qualità (es. UNI EN ISO 9001; UNI EN ISO 15189); (iii) la conoscenza del sistema di gestione per la salute e sicurezza nei luoghi di lavoro (D.Lgs. 81/08). La formazione pratica avviene sul campo, tramite affiancamento, utilizzando procedure operative, istruzioni di lavoro e/o indicazione dei responsabili di riferimento. Tutto il materiale utilizzato deve essere mantenuto aggiornato e reso sempre disponibile al personale.

Il responsabile del laboratorio deve formare il professionista che, a tutti i livelli, esegue attività aventi influenza sulla qualità del servizio erogato. In particolare, la formazione deve fornire le conoscenze e competenze specifiche riguardanti le indagini di genetica preimpianto effettuate nel laboratorio. Ciò si articola nelle fasi pre-analitica, analitica e post-analitica e mirano a: (i) essere in grado di ottenere, valutare e comunicare informazioni rispetto ai dati dei pazienti, il tipo di campione biologico da esaminare e le indagini richieste; (ii) essere autonomi nell'analisi, nell'interpretazione e/o nella refertazione dei test eseguiti; (iii) essere in grado di valutare l'appropriatezza dei controlli di qualità e pianificare progetti di sviluppo.

In ambito formativo sarà opportuno considerare:

- **Formazione accademica:** Il personale dovrà dimostrare di avere una formazione accademica adeguata con laurea in discipline scientifiche (biologia, biotecnologia, medicina e chirurgia) con abilitazione all'esercizio della professione. Si raccomanda per il personale impiegato nei laboratori di genetica con attività in diagnosi preimpianto il conseguimento della specializzazione in Genetica Medica o disciplina equipollente con comprovata esperienza in genetica molecolare e diagnosi pre-impianto/prenatale. È in corso di definizione un core curriculum dedicato nell'ambito delle scuole di specializzazione in Genetica Medica – indirizzo non medico che si renderà disponibile nelle prossime annualità.

- **Formazione continua:** In considerazione della rapida evoluzione delle tecnologie di genetica molecolare, che include le scienze -omiche, il personale dovrà essere invitato a partecipare a corsi di formazione continua e corsi di formazione pratica per l'aggiornamento sulle nuove tecniche e normative.

- **Compliance normativa:** Oltre alla formazione scientifica il personale dovrà essere formato e dovrà garantire un mantenimento della formazione negli ambiti normativi, etici, legali e di gestione e protezione dei dati personali e genetici secondo la normativa vigente e in continua evoluzione.

## 2.4 Certificazioni dei sistemi di gestione per la qualità e accreditamenti volontari

Si riportano di seguito i principali documenti/standard di riferimento:

- UNI EN ISO 9001:2015: Sistema di gestione per la qualità
- UNI EN ISO 15189:2022: Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza
- EA-4/17: EA Position Paper on the description of scopes of accreditation of medical laboratories
- EA 2/15: EA Requirements for the Accreditation of Flexible Scopes
- ILAC G18: Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories
- RG-02 rev. 08: Regolamento per l'accreditamento dei Laboratori di prova e dei Laboratori medici
- RT-23 rev. 04: Prescrizioni per la definizione del campo di accreditamento
- RT-26 rev. 07: Prescrizioni per l'accreditamento con campo di accreditamento flessibile – Laboratori di prova, Laboratori Medici, Laboratori di taratura, Organizzatori di prove valutative interlaboratorio
- RT-35 rev. 01: Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori medici

La richiesta di certificazione e/o accreditamento dei laboratori PGT secondo le norme del gruppo ISO è un atto volontario e quindi non obbligatorio. Tuttavia, l'ottenimento della certificazione e/o dell'accreditamento è uno strumento fondamentale per poter garantire che il laboratorio operi in conformità a specifiche norme e possieda determinati requisiti gestionali, organizzativi e tecnici ed è, pertanto, raccomandato per i laboratori che svolgono test genetici preimpianto.

### 2.4.1 Sistemi di gestione per la Qualità secondo UNI EN ISO 9001

La norma ISO 9001 definisce i requisiti minimi che il Sistema di Gestione per la Qualità di un'organizzazione deve dimostrare di soddisfare per garantire il livello di qualità di prodotto e servizio che dichiara di possedere. Il laboratorio PGT, che ottiene la certificazione secondo gli standard ISO 9001, garantisce agli utilizzatori del servizio, che il suo sistema di gestione per la qualità è conforme a questa specifica norma. La conformità è data da un ente di certificazione accreditato.

Il laboratorio PGT che intende richiedere la certificazione deve presentare la Documentazione all'ente certificatore che svolgerà poi una verifica ispettiva iniziale e delle verifiche periodiche di mantenimento. Il rinnovo avviene ogni 3 anni. Per il laboratorio PGT le verifiche sono solo di tipo documentale, il laboratorio quindi non è tenuto a dimostrare la competenza tecnica nell'eseguire determinati test.

Gli elementi distintivi che vengono valutati per la certificazione ISO9001 sono la presenza dell'analisi del contesto, l'analisi del rischio, analisi delle non conformità, delle azioni correttive e della loro efficacia.

Uno dei punti fondamentali è l'analisi del rischio. Il laboratorio PGT deve definire le modalità e le responsabilità adottate per la valutazione dei tutti i potenziali rischi, sia clinico-diagnostici che organizzativi e pianificare le azioni per la gestione di tali rischi. A questo proposito è importante citare il Risk Based Thinking che trova piena applicazione in tutte le analisi dei rischi; il RBT comprende l'adozione di azioni di miglioramento, l'analisi degli errori o delle non conformità e l'attuazione di tutte quelle misure necessarie ad

impedire o limitare il ripetersi di eventi dannosi. La metodologia seguita è quella denominata FMEA (failure mode and effect analysis).

Con il metodo FMEA il laboratorio PGT definisce un sistema per la gestione del rischio per la riduzione degli errori all'interno della struttura, individuando e prevenendo i problemi che si potrebbero verificare sui processi. Lo scopo dell'analisi è riuscire a sviluppare una valutazione oggettiva in relazione al rischio iniziale, alle misure adottate ed al rischio residuo, determinandone la tolleranza.

Il laboratorio deve individuare i punti critici e classificarli secondo la probabilità che la minaccia possa manifestarsi, la sua gravità e rilevabilità.

Questa analisi risulta particolarmente utile per identificare i punti critici dei processi di laboratorio. Un esempio è l'individuazione e gestione del rischio dello scambio di campioni durante le procedure di analisi preimpianto. Il sistema offre l'opportunità di riflettere sulle misure di prevenzione adottabili in relazione a questo rischio, esempio introduzione del witness negli step critici, oppure impiego di personale che ha seguito una formazione appropriata per l'esecuzione di tali analisi ecc, permettendo di ridurre notevolmente il livello di rischio individuato.

In conclusione, il laboratorio PGT che ottiene la certificazione ha la possibilità di migliorare il suo sistema di gestione per la qualità rendendolo efficace ed efficiente, con benefici evidenti a tutti i livelli dei processi e dell'organizzazione a cui appartiene. Il possesso di un certificato di sistema di gestione per la qualità conferisce all'azienda, credibilità e affidabilità circa il suo operato, distinguendosi da altre strutture che non la possiedono.

Il mantenimento della certificazione richiede costanza e dedizione, con particolare attenzione all'aggiornamento continuo della documentazione. Si raccomanda pertanto di avere almeno una persona dedicata in qualità di responsabile gestione qualità e, ove possibile, anche l'impiego di una seconda figura come assistente, specialmente se il laboratorio intende mantenere non solo il sistema gestione qualità, ma anche l'accreditamento istituzionale e volontario.

#### 2.4.2 Accreditemento secondo UNI EN ISO 15189:2022

La ISO 15189 è una norma riconosciuta a livello internazionale per la qualità e la competenza dei laboratori medici, dichiarata *preferred standard* per l'accreditamento dei laboratori medici. In Italia attualmente l'accreditamento ISO 15189 non è obbligatorio, ma diverse autorità competenti in ambito sanitario hanno indicato come obiettivo strategico la conformità alla ISO 15189 quale requisito per far parte del Sistema Sanitario Nazionale.

L'accreditamento UNI EN ISO 15189 si può applicare ai laboratori che eseguono test di genetica preimpianto, rientrando nella categoria chiamata "laboratorio di prova". È uno strumento per i laboratori PGT che intendono implementare un sistema di gestione inerente ai propri processi e che vogliono essere conformi a specifici requisiti di carattere tecnico, come assicurazione della bontà e dell'adeguatezza del risultato fornito. Infatti, un laboratorio PGT accreditato secondo UNI EN ISO 15189 non solo garantisce la qualità dell'organizzazione e del sistema di gestione del laboratorio, ma anche la competenza tecnica del Laboratorio stesso ad effettuare esami/test accreditati.

Una delle caratteristiche dell'accreditamento è la definizione di specifici requisiti per le fasi principali e peculiari di un laboratorio medico ovvero le fasi pre-analitica, analitica e post-analitica. Quindi il laboratorio

PGT, tramite accreditamento ISO 15189 assicura, non solo che i processi di laboratorio siano gestiti in maniera adeguata, ma anche di fornire risultati analitici affidabili e utilizzabili dal medico specialista in modo corretto.

In sintesi, il laboratorio PGT che vuole ottenere l'accreditamento deve presentare a Accredia la domanda per i Laboratori Medici e deve possedere determinati requisiti per poter presentare tale domanda.

- Il laboratorio deve già avere un sistema gestione qualità conforme alla ISO 15189. Fondamentale, oltre al sistema è la verifica della competenza tecnica, inclusi il personale, le apparecchiature utilizzate, la riferibilità delle misure e l'assicurazione della qualità. Il laboratorio deve inviare all'ente accreditatore il manuale della qualità, descrivendo i processi, le loro interazione e le modalità con cui ne viene garantita l'efficacia.
- Il laboratorio deve inviare anche i curricula del Responsabile del laboratorio e del Responsabile gestione qualità che provino l'esperienza nello svolgimento del ruolo e la conoscenza dei requisiti UNI EN ISO 15189.
- Inoltre, il laboratorio deve fornire evidenza delle procedure di validazione di metodi progettati o sviluppati dal laboratorio se non rientrano nella categoria dei dispositivi medico diagnostici in vitro (IVD).
- Infine, devono essere fornite le incertezze di misura per ciascuna prova di esame e i risultati delle verifiche esterne di qualità (VEQ) per i test da accreditare.

L'iter di accreditamento prevede due appuntamenti principali durante i quali il personale del laboratorio PGT e il responsabile qualità sono chiamati ad agire in maniera attiva: la verifica ispettiva iniziale e le verifiche periodiche di sorveglianza. Nella verifica ispettiva iniziale, vengono verificati il sistema di gestione e gli aspetti tecnici correlati ai test campionati. In pratica, il Laboratorio deve dimostrare «sufficiente esperienza pratica» per ciascuno dei test da accreditare, infatti, durante la visita ispettiva vengono valutati direttamente la qualifica e la competenza del personale, l'appropriatezza degli esami, il corretto prelievo e trasporto dei campioni, l'idoneità dei locali, la validazione dei metodi e la riferibilità delle misure nonché l'adeguatezza dei tempi di risposta e la chiarezza dei referti per ognuno dei test che si intendono accreditare.

Il laboratorio è soggetto, inoltre, a Verifiche periodiche di Sorveglianza, con periodicità semestrale e in seguito annuale. Il Laboratorio deve dimostrare di «mantenere l'attività e la competenza» per ciascuna delle prove in accreditamento. Questo significa che non è sufficiente ricevere l'accreditamento, ma bisogna mantenere lo stesso livello di eccellenza nel tempo in quanto l'attività e la competenza delle prove accreditate viene rivalutata periodicamente.

In fase di ispezione vengono indicati quali test saranno esaminati con valutazione tecnica di LIVELLO 1 o di LIVELLO 2. Nella valutazione tecnica di LIVELLO 1 l'ispettore verifica "in diretta" l'esecuzione dei test in laboratorio da parte di un operatore qualificato, mentre nella valutazione tecnica di LIVELLO 2 l'ispettore esegue una verifica documentale di un test già eseguito.

L'accreditamento prevede due tipologie di attività accreditabili:

- Attività in "campo di applicazione fisso": solitamente prevedono attività routinarie dove viene applicato sempre lo stesso protocollo per ogni campione inviato. Per il laboratorio PGT possono rientrare in questo campo i test svolti con kit commerciali non paziente-specifici (ad esempio il test PGT-A o PGT-SR se processati con metodiche NGS standard)

- Attività in “campo di applicazione flessibile”: prevedono la possibilità, da parte del laboratorio, sulla base di competenze già valutate, di modificare le tecniche, di ampliarne il campo di applicazione, di utilizzare nuove revisioni dei metodi standardizzati o di aggiungere nuovi metodi basati sulle stesse tecniche di quelli già accreditati. Un tipico test in campo flessibile è il PGT-M che richiede un set-up personalizzato e differente per ogni nuova patologia.

Il laboratorio PGT deve internalizzare e rispettare, come interpretazione ulteriore della norma, anche specifiche prescrizioni e regolamenti tecnici forniti dall'ente accreditatore. La procedura operativa per la gestione del campo flessibile ha lo scopo di definire i requisiti per l'applicazione del campo di accreditamento flessibile. Vengono definiti quali test rientrano in questo campo di applicazione, le verifiche delle competenze tecniche del personale di laboratorio e del processo di validazione del metodo e l'esito positivo di eventuali VEQ.

L'accreditamento è dunque uno strumento essenziale per accertare la qualità dei servizi erogati dai laboratori medici, in linea con gli obiettivi nazionali ed europei di tutela della salute pubblica e di garanzia di un'assistenza sanitaria sicura.

Il mantenimento della certificazione richiede costanza e dedizione, con particolare attenzione all'aggiornamento continuo della documentazione e alla condivisione con tutto il personale di laboratorio, che deve operare in modo consapevole secondo gli standard della norma. Il laboratorio, tramite riesame della direzione annuale, mette in atto delle azioni volte a migliorare continuamente l'efficacia del sistema e dei suoi processi e il servizio agli utilizzatori, individuando le risorse necessarie per farlo.

#### *2.4.3 Tracciabilità del campione*

Devono essere prese adeguate precauzioni per prevenire la contaminazione dei campioni sia mediante isolamento fisico (locali separati di pre e post-PCR, cappe ad aria filtrata), sia mediante protocolli di rilevazione di contaminazione. Una volta che la biopsia è stata eseguita, il campione cellulare può essere analizzato subito dal laboratorio di genetica medica oppure può essere congelato e inviato ad un laboratorio esterno per l'analisi. In questo ultimo caso devono essere messe in atto le procedure per la catena di custodia.

In entrambi i casi, il laboratorio deve essere dotato di sistemi adeguati di etichettatura per la precisa identificazione dei campioni, che devono avere un codice univoco di associazione biopsia/embrione. Il sistema di etichettatura è essenziale per abbinare correttamente il risultato diagnostico della biopsia con l'embrione da cui essa è stata prelevata. L'etichettatura e l'identificazione dei campioni sono tra le fasi critiche ed a più alto rischio di errore. Si raccomanda che il numero di identificazione univoco del paziente ed il numero di identificazione univoco degli embrioni / biopsie siano controllati e approvati da due operatori indipendenti (di cui uno testimone e controllore delle procedure eseguite dall'altro) o mediante l'utilizzo di strumenti e tecnologie elettroniche per la tracciabilità. In particolare, le fasi che richiedono obbligatoriamente un doppio controllo sono:

- al controllo della corrispondenza documentazione/campione in fase di accettazione e/o in fase di preparazione della seduta analitica.

- quelle immediatamente dopo la biopsia, per associare correttamente il numero dell'embrione con il campione di cellule prelevate.
- al tubing, per confermare che l'identificativo delle cellule corrisponda con l'etichettatura sulla provetta in questione.
- quelle in cui il processamento del campione prevede un cambio di provetta o un passaggio da un contenitore ad un altro.
- alla refertazione, per garantire la precisa corrispondenza tra la biopsia e l'embrione corrispondente.

E' suggerito l'utilizzo di sistemi informatici di tracciatura tipo "electronic-witnessing", in continuità con il laboratorio embriologico di PMA, per ridurre al minimo errori di scambio di campione.

## BIBLIOGRAFIA

Accordo ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento recante "Attuazione delle linee guida per le attività di genetica medica".

Accordo tra il Ministro della salute, le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano sul documento recante: «Linee-guida per le attività di genetica medica». (Accordo ai sensi dell'art. 4, del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281). (GU Serie Generale n.224 del 23-09-2004).

ACCREDIA: RG-02 rev. 08 "Regolamento per l'accreditamento dei Laboratori di prova e dei Laboratori medici"; RT-23 rev. 04 "Prescrizioni per la definizione del campo di accreditamento"; RT-26 rev. 07 "Prescrizioni per l'accreditamento con campo di accreditamento flessibile – Laboratori di prova, Laboratori Medici, Laboratori di taratura, Organizzatori di prove valutative interlaboratorio"; RT-35 rev. 01 "Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori medici".

Cimadomo D, Rienzi L, Romanelli V, et al. Inconclusive chromosomal assessment after blastocyst biopsy: prevalence, causative factors and outcomes after re-biopsy and re-vitrification. A multicenter experience. *Hum Reprod.* 2018;33(10):1839-1846.

Cimadomo D, Ubaldi FM, Capalbo A, et al. Failure mode and effects analysis of witnessing protocols for ensuring traceability during PGD/PGS cycles. *Reprod Biomed Online.* 2016;33(3):360-369.

Conferenza Stato-Regioni del 15 luglio 2004 (GU n.224 del 23.09.2004) - Linee-guida per le attività di Genetica medica.

Decreto del Presidente Della Repubblica 10 dicembre 1997, n. 483 - Regolamento recante la disciplina concorsuale per il personale dirigenziale del Servizio sanitario nazionale. Entrata in vigore del decreto: 31-1-1998 (Ultimo aggiornamento all'atto pubblicato il 29/05/2023).

Decreto del Presidente Della Repubblica 14 gennaio 1997 (Suppl. Ord. G.U. n. 42 del 20 febbraio 1997).

Decreto del Presidente della Repubblica 5 giugno 2001, n.328 - Modifiche ed integrazioni della disciplina dei requisiti per l'ammissione all'esame di Stato e delle relative prove per l'esercizio di talune professioni, nonché della disciplina dei relativi ordinamenti.

Decreto Legislativo 6 novembre 2007, n. 191. Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani. note: Entrata in vigore del provvedimento: 24/11/2007.

Decreto Legislativo 25 gennaio 2010, n. 16. Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione,

la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani. (10G0030) (GU Serie Generale n.40 del 18-02-2010). note: Entrata in vigore del provvedimento: 05/03/2010.

Decreto legislativo 10 agosto 2018, n. 101 - Disposizioni per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 aprile 2016, relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali, nonché alla libera circolazione di tali dati e che abroga la direttiva 95/46/CE (regolamento generale sulla protezione dei dati). (18G00129) (GU Serie Generale n.205 del 04-09-2018).

Decreto Legislativo 19 giugno 1999, n. 229 "Norme per la razionalizzazione del Servizio sanitario nazionale", a norma dell'articolo 1 della legge 30 novembre 1998, n. 419. (GU Serie Generale n.165 del 16-07-1999 - Suppl. Ordinario n. 132).

Decreto Legislativo 30 dicembre 1992, n. 502 Riordino della disciplina in materia sanitaria, a norma dell'articolo 1 della legge 23 ottobre 1992, n. 421.

Decreto legislativo in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro (Decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81) aggiornato con le modifiche apportate, da ultimo, dal D.L. 4 maggio 2023, n. 48, convertito, con modificazioni, dalla L. 3 luglio 2023, n. 85, Allegato XLVII. " Specifiche sulle misure di contenimento e sui livelli di contenimento".

Decreto Ministeriale del 09 settembre 1957 - Approvazione del regolamento sugli esami di Stato di abilitazione all'esercizio delle professioni.

Documento per la definizione del profilo professionale dell'embriologo clinico. Versione 1, 2018.

European co-operation for Accreditation - Laboratory Committee working group on Healthcare – Laboratory Medicine - Position papers: EA-4/17 "The description of scopes of accreditation of medical laboratories"; EA 2/15 "Requirements for the Accreditation of Flexible Scopes".

ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali G, Coticchio G, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa020.

ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F, Moutou C, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa018.

ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen E, Rubio C, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa017.

ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F, Coonen E, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3).

ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address: coticchio.biogenesi@grupposandonato.it. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online*. 2017;35(5):494-510.

Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application - European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM). 5th edition, 2022.



International Laboratory Accreditation Cooperation - ILAC G18 "Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories".

Legge 24 dicembre 2007, n. 244 - Disposizioni per la formazione del bilancio annuale e pluriennale dello Stato (legge finanziaria 2008) (GU Serie Generale n.300 del 28-12-2007 - Suppl. Ordinario n. 285).

Maggiulli R, Giancani A, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Human Blastocyst Biopsy and Vitrification. *J Vis Exp.* 2019;(149):10.3791/59625. Published 2019 Jul 26.

Manuale per la Gestione di un laboratorio di PMA - Comunicazione congiunta SIERR-CNT. Versione 2017.

Norma UNI 10339:2008: "Impianti aeraulici per la climatizzazione - Classificazione, prescrizioni e requisiti prestazionali per la progettazione e la fornitura"; Norma EN 13779:2008 "Ventilazione degli edifici non residenziali - Requisiti di prestazione per i sistemi di ventilazione e di climatizzazione". Entrambe aggiornate in UNI EN 16798-3:2018.

Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), Laboratory Biosafety Manual, terza edizione (2004) pubblicato in Italia da ISPESL Manuale di biosicurezza nei laboratori, edizione italiana, AIREPSA 2005.

Provvedimento che individua le prescrizioni contenute nelle Autorizzazioni generali nn. 1/2016, 3/2016, 6/2016, 8/2016 e 9/2016 che risultano compatibili con il Regolamento e con il d.lgs. n. 101/2018 di adeguamento del Codice.

Raccomandazioni SIGU per la pratica clinica "Diagnosi Genetica Preimpianto – PGT", ed. 2017.

Regolamento (UE) 2016/679 relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali, nonché alla libera circolazione di tali dati.

Standard SIGUCERT "Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica" ed. 2018.

UNI EN ISO 14644-4:2023 "Camere bianche ed ambienti associati controllati - Parte 4: Progettazione, costruzione e avviamento".

UNI EN ISO 15189:2022 "Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza".

UNI EN ISO 9001:2015 "Sistemi di gestione per la qualità".

Vaiarelli A, Zacà C, Spadoni V, et al. Clinical and laboratory key performance indicators in IVF: A consensus between the Italian Society of Fertility and Sterility and Reproductive Medicine (SIFES-MR) and the Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR). *J Assist Reprod Genet.* 2023;40(6):1479-1494. doi:10.1007/s10815-023-02792-1.

Veiga E, Olmedo C, Sánchez L, et al. Recalculating the staff required to run a modern assisted reproductive technology laboratory. *Hum Reprod.* 2022;37(8):1774-1785.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia Emma Whitney per il contributo fornito alla realizzazione del documento.

**STAKEHOLDERS** che hanno contribuito alla revisione del documento:

ALTERI ALESSANDRA

ARTINI PAOLO GIOVANNI

DE SANTIS LUCIA

NOTARANGELO LEONARDO

STIOUI SABINE