

#### **Affiliation and Disclosures**

#### **Lodovico Parmegiani**

- Head of Embryology, NextClinics International
- Director, IVF Laboratory Next Fertility GynePro, Bologna-Italy
- Founder and shareholder of:
  - Nterilizer, Italy
- reports fees during 2022 from:
  - Origio Coopersurgical, Denmark-USA
  - Biopsybell, Italy





# Sicurezza: Automatic Witness System



## Problema: Mismatch - Scambio Campioni Biologici



embryos belonging to another couple as well as with her own has been heavily criticised and

w faces legal action.

Il "mismatch" di campioni biologici è un danno grave per i centri PMA (HFEA, Regno Unito)

Caso A – "Mix-up" seme utilizzato per inseminazione. Mancato passaggio di consegne tra un turno ed il successivo in laboratorio

Caso B - Sei ovociti inseminati col seme sbagliato. Mancata testimonianza sulla seconda piastra della ICSI

Caso C – Utilizzato seme sbagliato. Errore nella testimonianza

Caso D – Embrioni sbagliati trasferiti al paziente. Errore testimonianza

Caso E – Embrioni sbagliati scongelati e trasferiti alla paziente. Mancanza di testimone

Caso F – I risultati dei test genetici sono stati erroneamente trasferiti al laboratorio che ha poi scartato gli embrioni normali e trasferito alla paziente quelli anomali



# Can you find the the mistake? 1 2 3 4 5 6 7 8 9







Morning Mix

They thought their embryo didn't take. Then their son was born to a stranger across the country, lawsuit claims.



### **Soluzione – Witness Automatico**



A ciascun paziente viene assegnata una carta d'identità o un codice personale univoco



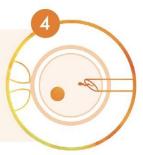
I tag ID contenenti questo codice personale univoco vengono fissati alla struttura in plastica che ospita i campioni del paziente

Ogni area del laboratorio rileva i segnali wireless inviati da questi taq ID.

Essi vengono identificati, tracciati e registrati lungo ciascun passaggio del processo ART



RI Witness conferma l'identità dei campioni e consente agli embriologi di procedere con l'inseminazione





Nel caso improbabile di un errore dei campioni, il sistema avverte l'embriologo, arresta i processi e previene qualsiasi errore

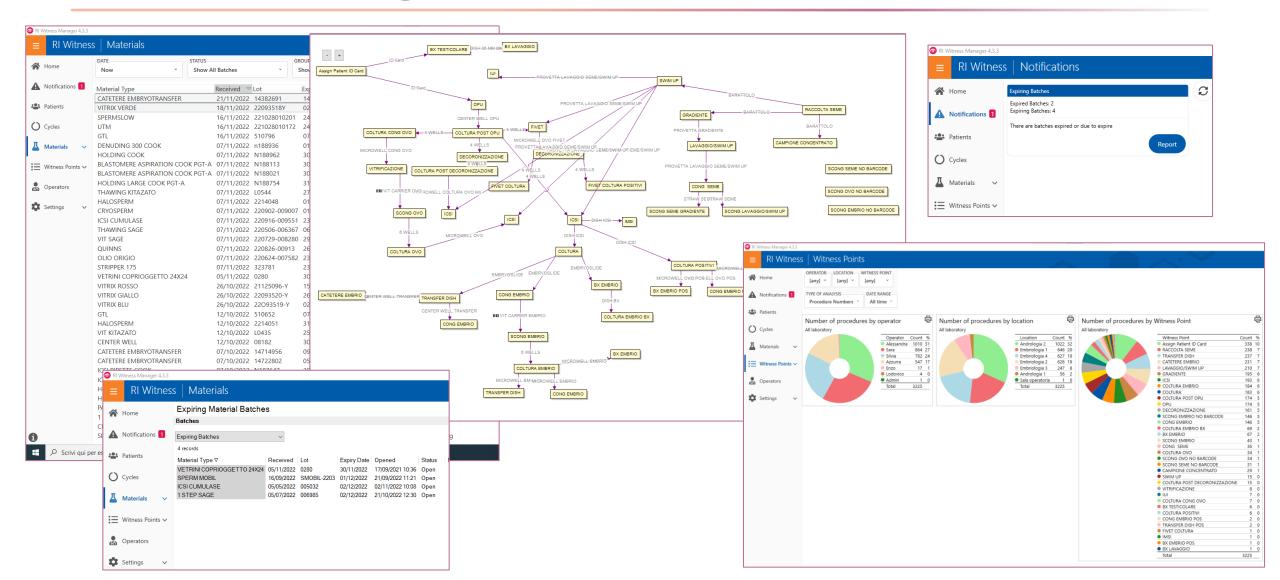


Prima di trasferire l'embrione, la scheda ID del paziente viene controllata in maniera automatica con la piastra dell'embrione taggato





## RI-Witness: Organizzazione -Tracciabilità - Controllo





# Sicurezza: Vitrificazione Personalizzata Virus-Free Blockchain



## Azoto Liquido – (Liquid Nitrogen - LN<sub>2</sub>)



Tedder et al, Lancet 1995. Morris, Cryobiology 2005. Borges et al, JARG 2020.

# Agente criogenico per il raffreddamento e il congelamento nel Food & Beverage, Healthcare

- LN<sub>2</sub> si può contaminare: sono stati trovati contaminanti nelle criobanche contenenti cellule e tessuti
  - virus, batteri, funghi
- la contaminazione crea rischi per i campioni biologici, i pazienti e gli operatori
  - Nel 1995, 6 pazienti sono state infettate da HBV in seguito a trapianto di midollo osseo e staminali del sangue contaminati da LN<sub>2</sub> in una criobanca
- Alcune applicazioni richiedono LN<sub>2</sub> sterile
  - Procreazione Medicalmente Assistita (PMA)
  - Vitirificazione, riscaldamento e crioconservazione
  - Costo della contaminazione nella PMA: 100 milioni USD/anno



Vitrificazione Luyet, Biodynamica 1937,1:1-14; Leibo et al, Cryobiology 1978,15:257-71; Mazur et al, Cryobiology 2005,51:29-53







- Conversione di un liquido super viscoso in uno stato vetroso quando viene raffreddato al di sotto della sua temperatura di transizione vetrosa
  - Fahy et al, Cryobiology 1987,24:196-13
- Qualsiasi materiale può vetrificare, in base a:
  - viscosità, velocità di raffreddamento e volume del campione
  - Yavin e Arav, Theriogenology 2007,67:81-9; Vajta e Kuwayama, Theriogenology 2006,65:236-44
- La vitrificazione delle cellule riproduttive umane è incredibilmente efficiente e viene eseguita con specifici «carriers»
  - Sopravvivenza: 99% embrioni 90% ovociti
    - Kuwayama et al, RBMO 2005



#### Rischio di infezione

Parmegiani, Fertil Steril 2011. Pomeroy et al, Fertil Steril 2009. Parmegiani, Hum Reprod 2020.

#### thebmj covid-19 Research - Education -

Re: Covid-19: Airborne transmission is being underestimated, and Covid-19 in Liquid Nitrogen is a potential threat

Human assisted reproductive technology (ART) is the only medical discipline where human gametes and embryos with potential to produce live births are routinely stored in LN2/NV. Many embryo/oocyte cryopreservation techniques utilize "open" cryo-devices with direct contact with LN2/NV during cooling. Even with "closed" systems, accidental contact with LN2/NV may occur during storage and warming of material. The fact that infections traceable to cryostorage have not been reported after millions of embryo transfers may be due to innate immunity in the female reproductive tract and reduced dosage of infective agents during laboratory procedures. However, the risk of infection is real, especially when new, highly infective agents arise.

Airborne contaminants come in contact with LN2/NV and remain cryopreserved [3]. Although some industrial sectors (drug manufacturing, food and beverage sterile packaging) carry out raw filtration of LN2 before use, this does not guarantee sterility, and it is not effective against smaller microorganisms.

Parmegiani, Vajta and Alikani - British Medicine Journal 2020

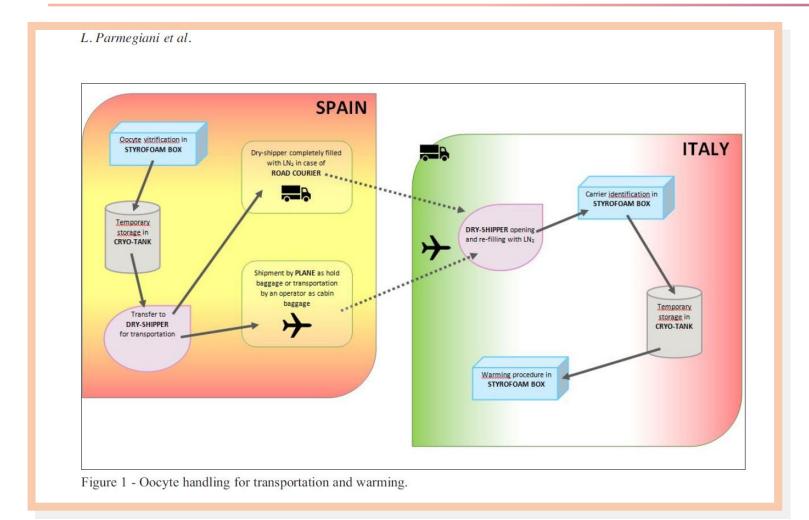
#### Contaminazione mediata da azoto liquido

- Anche con sistemi "chiusi", durante lo stoccaggio e il riscaldamento del materiale può verificarsi un contatto accidentale con LN<sub>2</sub>/NV
- Il vero rischio non è legato ai sistemi di vitrificazione, ma all'azoto liquido e ai vapori di azoto (LN<sub>2</sub>/NV) stessi. Una scatola con 2 litri di LN<sub>2</sub> può contaminare piani di lavoro, operatori, cellule e pazienti



# Manipolazione e trasporto di cellule/tessuti riproduttivi

Parmegiani et al, Current Trends in Clinical Embryology 2017 van Doremalen et al, NEJM 2020; Burke et al, J Dermatol Surg Oncol 1986. van der Hoek et al, Plos One Medicine 2005

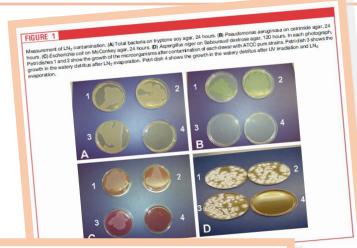


# Covid-19 ed altri virus in LN<sub>2</sub>/NV: una potenziale bomba a orologeria?

- I contaminanti trasportati dall'aria entrano in contatto con LN<sub>2</sub>/NV e rimangono crioconservati
- L'uso di LN<sub>2</sub>/NV contaminati rischia il risveglio del virus e la contaminazione delle cellule in scongelamento, dell'ambiente e degli operatori



# Sterilizzazione LN<sub>2</sub>/NV Lavaggio Carriers con LN<sub>2</sub> sterile







Contaminants in Liquid Nitrogen. Parmegiani, Fertil Steril 2012

A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN<sub>2</sub>)

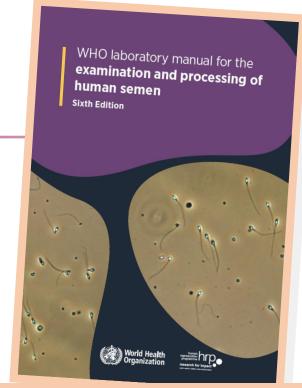
- La luce ultravioletta UV-C sterilizza LN<sub>2</sub> da qualsiasi contaminante
- HIV, Epatite, Coronavirus, etc (EG epatite: 8,000 UV μWs/cm²)
  - Parmegiani et al, Hum Reprod 2009; Darnell et al Transfusion 2006
- E' possibile sterilizzare facilmente piccole quantità di LN<sub>2</sub> prima dell'uso
  - Parmegiani et al, RBMO 2010
- E' possibile eseguire la vitrificazione in modo sicuro ed asettico
  - Parmegiani et al, RBMO2011; Parmegiani and Rienzi, Hum Reprod 2011
- Un lavaggio delle cellule con LN<sub>2</sub> sterile prima dello scongelamento riduce il rischio di contaminazione
- La certificazione del lotto sterile di LN<sub>2</sub> utilizzato per la procedura di lavaggio è una traccia attendibile per
  - Sistema Gestione Qualità / legislazioni stringenti



## Raccomandazioni - Linee guida

Recentemente molti autori hanno suggerito di implementare pratiche di "good manufacturing" nella PMA tra cui:

- L'utilizzo di contenitori di vitrificazione personalizzati monouso
  - Maggiulli et al., RBMO 2020
- La sterilizzazione di LN<sub>2</sub> prima dell'uso
  - Arav et al., JARG 2020; Alteri et al., Hum Reprod 2020
- Il lavaggio dei campioni crioconservati con LN<sub>2</sub> sterile prima dello scongelamento
  - Hickman et al., RBMO 2020; Shapiro et al., RBMO 2020
- Precauzioni per un uso sicuro di LN<sub>2</sub>
  - Pomeroy and Schiewe, JARG 2020; Scarica et al JARG 2021; Vajta et al Hum Reprod 2022
- Anche il WHO suggerisce la sterilizzazione di LN<sub>2</sub> e la decontaminazione dei campioni criopreservati prima dello scongelamento
  - WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth edition 2021





# Blockchain

- La Blockchain sfrutta le caratteristiche di una rete informatica di nodi e consente di gestire e aggiornare, in modo univoco e sicuro, un registro contenente dati e informazioni in maniera aperta, condivisa e distribuita senza la necessità di un'entità centrale di controllo e verifica.
- Nel settore sanitario, la Blockchain può diventare uno strumento per affrontare le sfide relative alla condivisione di dati sensibili e alla tracciabilità delle procedure mediche e di laboratorio.

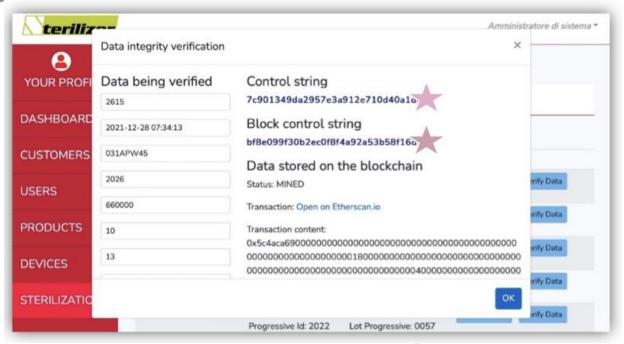


#### **Blockchain Virus-Free Personalized Vitrification**

#### P-777: Parmegiani et al – ESHRE Meeting – Milan Italy 3-6 July 2022

This is the first evidence of the application of Blockchain in IVF and many others will probably follow. Blockchain immutable records of LN2 sterilization combined with procedure codes and disposable lots represent incorruptible traces for "Virus-Free" vitrification/warming. During this pandemic **219** babies were born from cryopreservation procedures powered by Blockchain





# Vitrificazione Personalizzata Virus-Free Blockchain

Ad oggi, dall'inizio della pandemia presso il nostro centro Next Fertility GynePro sono già nati 363 bambini da cellule congelate con tecnologia Blockchain Virus-Free

#nterilizer #NBATH SYSTEM officially presented in #China by VitaVitro At Chinese Fertility congress #CSRM2022 #vitavitro #mainsponsor #virusfree #vitrification #always #riskmanagement #cryopreservation #liquidnitrogen #contamination #sterilization #medicaldevice

La tecnologia si sta diffondendo in tutto il mondo!

All'ospedale di Lagosanto la conservazione degli embrioni è "virus-free"



Il Delta è il primo centro pubblico in Italia a usare le nuova tecnica che sterilizza l'azoto impiegato nella procreazione assistita



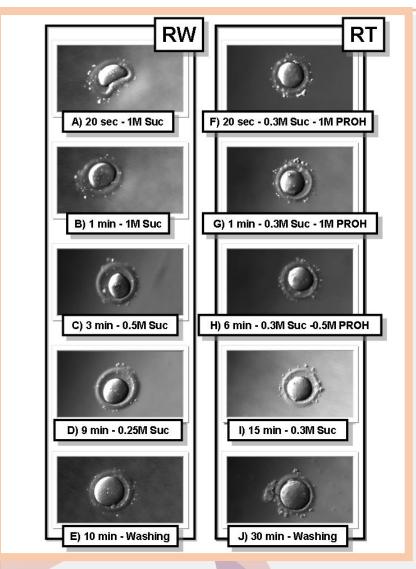
### **Background**



- Le cellule crioconservate vengono trasportate tra centri PMA autorizzati per svariate ragioni
  - volontà dei pazienti, regolamenti, traslochi, guerra...
- Gli ovociti e gli embrioni vengono vitrificati utilizzando diverse marche di kit pronti all'uso
- La aziende produttrici potrebbero cambiare composizione o ritirare alcuni kit
- Alcuni kit potrebbero non essere più disponibili
  - perdita marcatura CE, problemi nella distribuzione
- Un protocollo di "riscaldamento universale" può facilitare lo scambio di cellule/tessuti riproduttivi vetrificati tra i centri PMA



## Studio "Proof of Concept" - 2014



#### Eseguito su ovociti, le cellule riproduttive più fragili

Protocollo di VIT-warming applicato su ovociti "slow frozen"

- utilizzando solo crioprotettori extracellulari (ECCPs)
  - first warming step: 1 M
  - second warming step: 0.5 M

#### Risultati

sopravvivenza e sviluppo paragonabile

#### Conclusione

- procedura per riscaldare qualsiasi cellula/tessuto riproduttivo
- indipendentemente dai protocolli di congelamento
  - Parmegiani et al, RBMO 2014;28:614-23



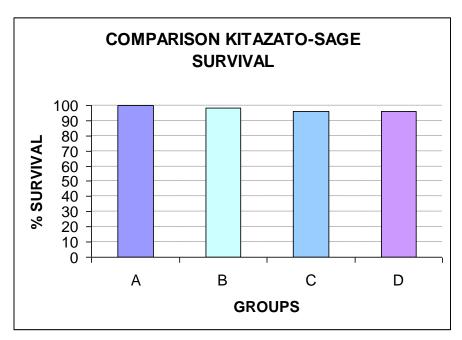
## **Universal Warming - Protocollo**

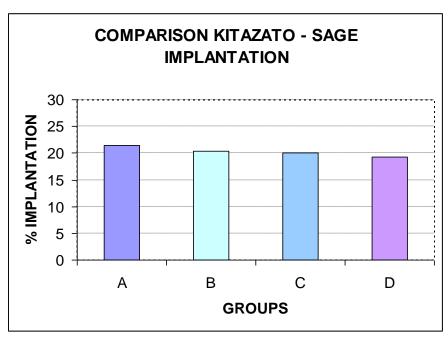
- Medium
  - any basic medium: TC199, HTF-MOPS, PBS, HAMS, etc.
  - any ECCP: Trehalose Sucrose
  - any supplement: Hydroxypropyl Cellulose, Dextran Serum Supplement, Albumin, etc.
- 1 minute 4 mL 1M ECCP 37°C
- 3 minutes 300 µL 0.5 ECCP Room Temperature (RT)
- 5 minutes 300 µL washing solution RT
- 1 minute 300 μL washing solution RT
- 1-2 hours incubation prior to ICSI (oocytes) or ET (embryos)



# Primo studio clinico su combinazione di diversi VIT/WARM kits - Blastocisti - 2017

**A**(Kitazato/Kitazato) **B**(Kitazato/Sage) **C**(Sage/Kitazato) **D**(Sage/Sage)





- Tassi di sopravvivenza e impianto statisticamente comparabili
  - Parmegiani et al, Fertil Steril 2017; 108:e173

# Primo studio clinico su combinazione di diversi VIT/WARM kits – Embrioni DAY3 -2018

1055 vitrified cleavage-stage embryos - Cohort Study

KK – vitrification Kitazato/warming Kitazato

KS – vitrification Kitazato/warming Sage

SK – vitrification Sage/warming Kitazato

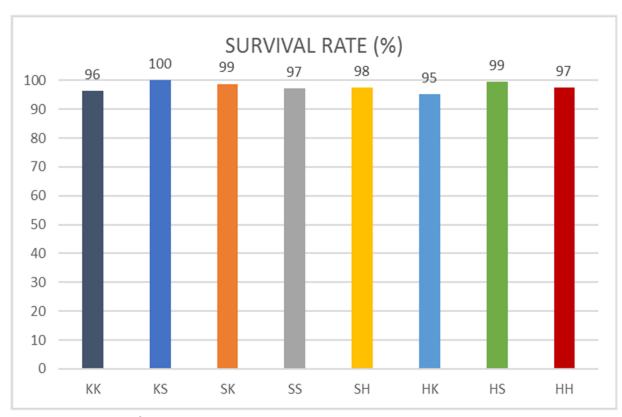
SS – vitrification Sage/warming Sage

SH – vitrification Sage/warming "in house kit"

HK – vitrification "in house kit"/warming Kitazato

HS - vitrification "in house kit"/warming "Sage"

HH -vitrification "in house kit"/warming "in house kit"

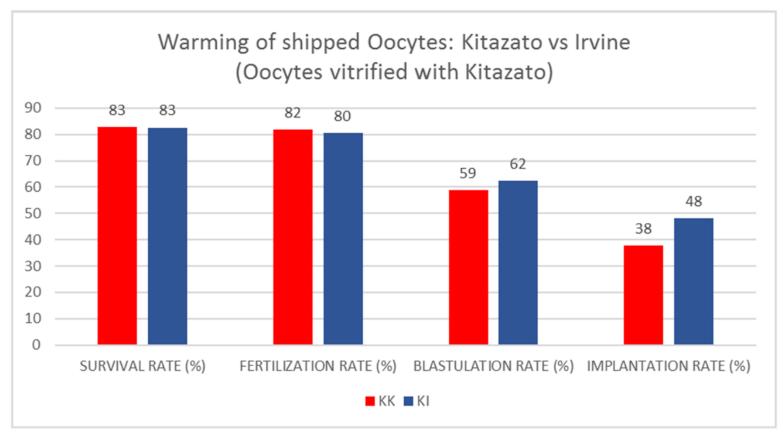


- Tasso di sopravvivenza statisticamente comparabile
  - Parmegiani et al, Fertil Steril 2018;110:e230
  - JARG 2018;35:1887-1895



#### Primo studio clinico su Ovociti donati - 2018

820 vitrified oocytes KK (Kitazato/Kitazato) 233 - KI (Kitazato/Irvine) 587



- Sopravvivenza, fertilizzazione, blastulazione e impianto paragonabile
  - Parmegiani et al, Fertil Steril 2018;110:e230



#### Studio multicentrico – Ovociti donati 2019

Studio multicentrico retrospettivo su 238 pazienti

- ovociti donati vitrificati in Spagna
  - Vitrification Kit (Kitazato)
  - 1898 ovociti scongelati e inseminati in 2 centri in Italia
    - 238 transfer di blastocisti
  - Ovociti assegnati a 2 gruppi per lo scongelamento
    - KK (Kitazato/Kitazato) 939
    - KI (Kitazato/Irvine) 959
  - Coltura Time Lapse Embryoscope (Vitrolife)

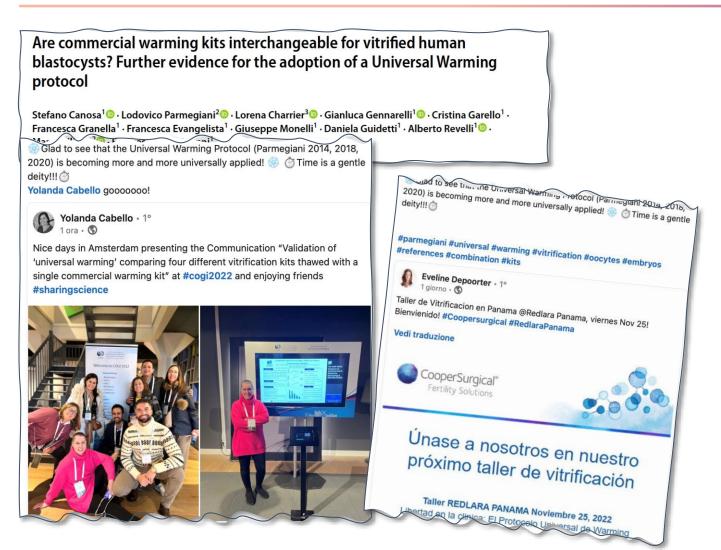
#### Risultati

- sopravvivenza, blastulazione, impianto e tassi di nati vivi tutti comparabili
  - Parmegiani et al, JARG 2020;37:1379-1385





# The "coming-out" of "off-label" use of warming kit brands



This result supports the "off-label" use of different combinations of vitrification and warming kits, allowing practitioners worldwide to "come-out" of the closet!

Questo risultato supporta l'uso "off-label" di diverse combinazioni di kit di vitrificazione e warming, consentendo agli operatori di tutto il mondo di "uscire allo scoperto"!





## Rischi associati alla criopreservazione

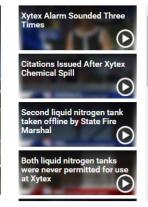
Risks of Cryopreservation

#### Risks associated with cryopreservation: a survey of assisted conception units in the UK and Ireland

Pages 33-42 | Published online: 03 Jul 2009

#### UPDATE | Tanks did not cause chemical leak at Xytex, investigators say





By Staff | Posted: Mon 1:07 PM, Feb 13, 2017 | Updated: Mon 1:13 PM, Feb 13, 2017











Monday, Feb. 13, 2017

AUGUSTA, Ga. (WRDW/WAGT) - New details are being released about the liquid nitrogen leak at the Xytex Corporation last week.

Investigators say the tanks did not cause the chemical leak, they believe there was a malfunction with the system. The tanks supply nitrogen to the system, but the State Fire Marshal does not regulate the system.

Investigators say the alarm at Xytex went off a total of three times the day of the accident, 1:43pm, 3:26pm, and 3:44pm. Xytex reported the alarm went off at 3:26pm in their news release



Xvtex Leak - 2.5.17 /Augusta, GA.

The state fire marshal cited Xytex and Airgas on Tuesday last week for violations involving the liquid nitrogen tank that caused the deadly leak. Deputy State Fire Marshal Chris Stephen returned to Xytex the next day with another citation for a second tank.

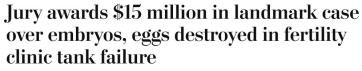
The leak killed Richmond County Sgt. Greg Meagher, and put three additional deputies and Anita Wylds, a Xytex worker, in the hospital.

Xytex is still prohibited from using the tanks, Fire Marshal's office and OSHA are still investigating the incident.

News

UH freezer malfunction update: More than 150 families settle lawsuits in loss of embryos

Updated: Sep. 29, 2019, 10:09 a.m. | Published: Sep. 29, 2019, 5:00 a.m.







These would-be parents' embryos were lost. Now they're grieving — and suing.

By Ariana Eunjung Cha



# Marzo 2018 USA: uno spartiacque per i laboratori PMA

Mina Alikani 2022

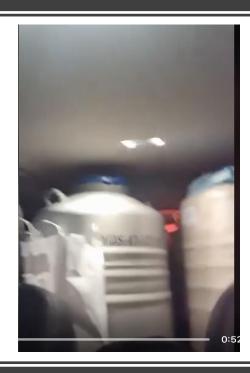






You can destroy the buildings but you will never succeed the destroy our hopes and dreams! #Ukraine #glorytoukraine





# 2022 - Trasloco per guerra

Birol Aydin 2022



#### Human Reproductive Cell Cryopreservation, Storage, Handling, and Transport: Risks and Risk Management

Mina Alikani, PhD, HCLD<sup>1</sup> Lodovico Parmegiani, PhD<sup>2</sup>

Northwell Health Fertility Laboratories, New York, New York
 Reproductive Medicine Unit, GynePro Medical Centers, Bologna,
 Italy

Address for correspondence Mina Alikani, PhD, HCLD, Northwell Health Fertility Laboratories, New York, New York (e-mail: mina.alikani@embryos.net).

Semin Reprod Med 2018;36:265-272

# Cryostorage of reproductive tissues in the in vitro fertilization laboratory: a committee opinion

Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, Society for Reproductive Biologists and Technologists, and Society for Assisted Reproductive Technology

American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama

- controllare i serbatoi tre volte alla settimana
- monitoraggio continuo tramite sonda di livello/temperatura
- allarmi continui testati periodicamente
- scorte sufficienti di LN<sub>2</sub> per le emergenze
- adeguata protezione personale
  - guanti, scudo, occhiali e schermatura della pelle
- immagazzinare i serbatoi in un'area di stoccaggio ben ventilata
- adeguata formazione del personale
- schede di sicurezza e segnaletica



# Sicurezza per gli operatori









## Sicurezza per le cellule - Disaster Recovery







#### Conclusioni Finali – il laboratorio PMA del Futuro

- Sicurezza
  - Automatic Witness System
  - Vitrificazione Personalizzata Virus-Free Blockchain
- Flessibilità
  - Universal Warming
- Sicurezza e Flessibilità
  - Business Continuity
    - Disaster Plan / Relocation

