

LINEE GUIDA PER LA CRIOCONSERVAZIONE DEL SEME

INTRODUZIONE

Da alcuni anni a questa parte si sta diffondendo l'impiego di Linee Guida per migliorare la qualità dell'assistenza clinica al paziente. Com'è noto le Linee Guida rappresentano delle raccomandazioni dedotte dalle evidenze scientifiche disponibili al momento della loro stesura e dall'inevitabile dato soggettivo rappresentato dall'esperienza del gruppo che le ha redatte. Il loro ruolo è quello di incrementare la qualità della pratica clinica elevando di conseguenza gli standard assistenziali ed è evidente, quindi, che se un sistema sanitario vuole crescere e migliorarsi non può prescindere dall'elaborare e dall'utilizzare Linee Guida di eccellente qualità.

Le Linee Guida sono protocolli che non impongono regole, ma suggeriscono i comportamenti da tenere in determinate circostanze cliniche al fine di rendere quanto più corretta ed uniforme la gestione del paziente da parte degli specialisti.

E' con questo spirito che le presenti Linee Guida sono state pensate e realizzate da un gruppo di specialisti, esperti nel campo della crioconservazione dei gameti maschili, appartenenti a varie Società Scientifiche, coinvolte nel campo della fisiopatologia della riproduzione.

Sono state proposte e discusse durante un incontro che si è svolto a Roma il 5 febbraio 2005 presso il Dipartimento di Fisiopatologia Medica dopo una attenta revisione della letteratura recente e sulla base dell'esperienza dei singoli componenti del gruppo di lavoro.

Le presenti Linee Guida riflettono, come tutte, la situazione al momento della loro stesura e saranno, pertanto, soggette a periodiche revisioni sulla base dell'*evidence-based medicine*".

PROBLEMATICA

La crioconservazione del liquido seminale o degli spermatozoi prelevati a livello epididimario e testicolare rappresenta uno dei più importanti strumenti che abbiamo oggi a disposizione nella gestione di pazienti affetti da patologie neoplastiche, autoimmuni, urologiche, neurologiche, che si sottopongono a trattamenti medici e chirurgici potenzialmente in grado di indurre una sterilità permanente o temporanea nonché nei pazienti affetti da azoospermia secretoria ed escretoria. Alla luce del fatto che molto spesso tali patologie riguardano pazienti giovani e senza figli è imperativo che gli specialisti coinvolti nel settore consiglino questa opportunità e che

almeno un centro in ogni regione si attrezzino per assicurare questa opzione con il più alto grado di professionalità possibile.

E' importante rilevare che esistono due diverse modalità di Banca del seme. Infatti, l'attività di crioconservazione può essere inclusa in una tecnica di fecondazione assistita, nell'ambito di un progetto finalizzato a realizzare una gravidanza, in questo caso è considerata soggetta alla legge 40; oppure può perseguire finalità strettamente conservative ed indipendenti dalla fecondazione assistita e quindi rientrare nell'ambito della "autonomia contrattuale" fra il singolo Centro ed il paziente.

FINALITA' DELLE LINEE GUIDA

Gestione pazienti

- Pazienti che accedono alla Banca del Seme
 - Tipologia
 - Requisiti
- Consensi informati per la gestione del paziente e del seme crioconservato
- Tempo di durata del deposito del seme

Gestione interna

- Materiali e metodi

Gestione pazienti che accedono alla crioconservazione

• Tipologia

La crioconservazione può essere solo "omologa", cioè il paziente può crioconservare il proprio seme; l'utilizzo del seme di un donatore non è più effettuabile nel nostro Paese secondo quanto previsto dall'art. 4, comma 3, della legge 40/2004 "Norme in materia di riproduzione medicalmente assistita".

Le principali indicazioni alla crioconservazione del seme sono le seguenti:

- Pazienti affetti da patologie che necessitano di terapie inducenti danni alla spermatogenesi (patologie neoplastiche, autoimmuni, ecc.);
- Pazienti affetti da patologie che necessitano di interventi chirurgici all'apparato uro-genitale che possono ledere la funzione eiaculatoria;
- Soggetti che per motivi di lavoro sono esposti a sostanze potenzialmente genotossiche.
- Pazienti con OAT che presentano transitori miglioramenti della qualità del seme
- Pazienti che mostrano un severo e progressivo peggioramento della qualità del seme

- Pazienti criptozoospermici
- Pazienti che hanno difficoltà a raccogliere il liquido seminale il giorno della PMA (difficoltà psicologiche o logistiche)
- Soggetti che si sottopongono a vasectomia

Requisiti

- *Età*
 - *Terapie*
 - *Analisi*
 - *Astinenza*
 - *Raccolta*
 - *Accertamento Identità*
- **Età**
Non è opportuno indicare limiti di età a meno che non esista una normativa regionale specifica.
 - **Terapie**
Se il paziente deve subire trattamenti antitumorali o radioterapia, entrambi induttori di danno genotossico, è necessario eseguire la crioconservazione prima dell'inizio di qualsiasi trattamento. Se il paziente è già stato trattato con chemio o radioterapici è opportuno attendere a scopo prudenziale circa due anni dalla fine della terapia stessa prima di effettuare una crioconservazione.
Nel caso di farmaci che non agiscono sul ciclo cellulare è possibile fare crioconservazione dopo tre mesi dalla sospensione del farmaco per utilizzare gameti derivanti da una nuova spermatogenesi, se ciò non interferisce con l'urgenza di iniziare un nuovo ciclo di terapia.
Nel caso di farmaci di cui non è stato ancora dimostrato l'effetto genotossico, si può eseguire la crioconservazione inserendo nel consenso informato una frase riferita alla possibilità che tali farmaci agiscano sul nucleo della cellula e possano essere, quindi, dannosi per il feto.
 - **Analisi da effettuare pre-crioconservazione**
In considerazione del fatto che l'azoto liquido, come l'acqua, può agire come veicolo di trasmissione per batteri, virus e funghi, si ritiene opportuno non procedere alla crioconservazione di liquido seminale o di tessuto testicolare in assenza di markers infettivologici. Le analisi virologiche necessarie sono le seguenti:
 - Virus EPATITE B: HBsAg,
 - Virus EPATITE C: Anticorpi anti - HCV;

- HCV-RNA Qualitativo (nel caso di anticorpi positivi)
- HIV: Anticorpi anti - HIV
- CITOMEGALOVIRUS: Anticorpi anti IgG, Anticorpi anti IgM

E' possibile crioconservare campioni di pazienti positivi a questi virus solo se la banca è attrezzata con percorsi e contenitori dedicati ad ogni singolo virus.

- **Periodo di astinenza**

Si consiglia il classico periodo di astinenza di 3-5 o 2-7 giorni, fermo restando che in caso di urgenza nell'inizio della terapia non viene tenuto conto di tali limitazioni.

- **Raccolta del campione**

Il paziente deve raccogliere il campione seminale per masturbazione in un contenitore sterile per urine. Il centro deve fornire il contenitore sterile contrassegnato con nome e cognome del paziente

La raccolta deve avvenire presso il Centro di crioconservazione per motivi medico-legali. È possibile raccogliere il liquido seminale fuori sede solo se il paziente è impossibilitato a farlo in sede (es. ricoverato ed intrasportabile o paraplegico che richiede l'ausilio di un elettrostimolatore), in tal caso è necessario che il paziente compili una autocertificazione attestante la proprietà del campione di liquido seminale consegnato.

- **Accertamento di identità**

E' indispensabile che il paziente si presenti munito di documento di identità valido che deve essere fotocopiato, inserito in cartella e riportato sul consenso informato. Se il paziente è minorenne oltre al proprio documento è necessario il documento di identità dei genitori o di chi esercita la potestà genitoriale.

Consensi informati

- E' indispensabile prevedere una serie di consensi informati per la gestione del paziente e del seme crioconservato. In particolare:
 - per la crioconservazione (è necessario un consenso per ogni campione seminale crioconservato)
 - per il rinnovo della crioconservazione
 - per l'eliminazione del campione
 - per il ritiro di tutto il campione
 - per il ritiro di una o più paillettes

- Al momento della firma di ognuno di questi consensi è indispensabile che il paziente mostri un documento di identità. Nel caso di pazienti minorenni, è necessaria la firma ed il documento di identità sia del paziente che dei genitori o di chi esercita la potestà genitoriale.
- Il ritiro del campione crioconservato (tutte le paillettes o solo una parte), può essere effettuato solo dal proprietario dei gameti, previa presentazione di un documento di identità.
- Richiesta e ritiro paillettes *post-mortem* : poiché le paillettes possono essere ritirate solo dal "proprietario dei gameti", la richiesta *post-mortem* non può essere evasa ed il campione crioconservato sarà eliminato alla scadenza prevista sul consenso. Fatte salve disposizioni differenti della magistratura.
- I singoli consensi informati vengono predisposti dai Centri. Modelli dei singoli consensi sono riportati in appendice.

• ***Tempo di durata del deposito***

In considerazione del fatto che esistono due diverse modalità di Banca del seme a seconda che la crioconservazione sia inclusa in una tecnica di fecondazione assistita o persegua finalità strettamente conservative ed indipendenti dalla fecondazione assistita, essa può essere regolata da un differente consenso informato per quanto riguarda il tempo di durata del deposito. In entrambi i casi si deve indicare chiaramente la scadenza della crioconservazione, che nel caso del semplice deposito sarà una fissa (per es. annuale), mentre nel caso della PMA può essere legata alla sola effettuazione della tecnica.

Quindi:

- Nel caso di deposito per fecondazione assistita viene stabilito un tempo di crioconservazione che può anche essere limitato alla sola effettuazione della procedura di PMA. Il Centro, prima di eliminare il campione, si farà carico di contattare il paziente per avvisarlo che il periodo di crioconservazione è scaduto, in modo tale che il paziente possa decidere se eliminare o rinnovare il deposito del proprio campione.
- Nel caso di deposito a fine puramente conservativo, si stabilisce un periodo di tempo di crioconservazione definito (esempio un anno) che deve essere riportato chiaramente nel consenso informato, preferibilmente con una precisa data di scadenza.

Gestione interna

Struttura

- L'area dedicata alla crioconservazione deve possedere caratteristiche strutturali, ambientali e di sicurezza idonee al trattamento dei gameti maschili. In particolare non deve essere situata in zone a possibile rischio batteriologico, virale, chimico e radioattivo.
- L'accesso all'area di crioconservazione deve essere consentito esclusivamente a personale autorizzato.
- Il personale operante in una banca del seme deve possedere conoscenze teoriche e pratiche adeguate nel campo della seminologia e della crioconservazione.

Materiali

- Tutti i materiali utilizzati per la crioconservazione devono essere specifici per la criogenia.
- Elenco Materiali:
 - Azoto liquido
 - Terreno di crioconservazione
 - Contenitori per azoto liquido
 - Rampa di congelamento
 - Stecche
 - Visotubi
 - Paillettes e Raccordi specifici
 - Pompa aspirante per singola paillette
 - Sigillatrice
 - Etichettatrice
 - Sonda termica (non obbligatoria)
- **AZOTO LIQUIDO**
Si consiglia il controllo settimanale del livello di azoto ed il rifornimento settimanale o mensile in funzione del consumo dell'azoto stesso. Le operazioni relative alla gestione dell'azoto devono essere annotate in un apposito registro.
- **TERRENO DI CRIOCONSERVAZIONE**
Come crioprotettore viene utilizzato il Test Yolk Buffer (TYB), che si conserva a -20°C. Prima dell'utilizzo del terreno è necessario controllare la scadenza, eventuali contaminazioni e registrare il numero di lotto.

- **CONTENITORI**

Il centro di crioconservazione deve essere fornito di contenitori a bassa evaporazione per azoto liquido.

- Contenitori per lo stoccaggio dei campioni, che devono essere resi inaccessibili con appositi sistemi di chiusura
- Contenitore con azoto per rifornimento

Sarebbe opportuno avere un contenitore dedicato alla sola procedura di crioconservazione, per evitare stress termici continui alle cellule stoccate (opzionale).

- **RAMPA DI CONGELAMENTO**

Sistema di congelamento manuale in acciaio composto da un cestello esterno, canister di sicurezza e supporto per paillettes.

I contenitori e l'apparecchiatura di congelamento devono essere sottoposti a regolare disinfezione e detersione per evitare contaminazioni da microrganismi ambientali.

- **PAILLETTES E PROVETTE PER CRIOGENIA**

E' necessario utilizzare paillettes ad elevata sicurezza cioè termosaldabili. Le paillettes attualmente in commercio con queste caratteristiche (CBS) sono da 0,300 ml e da 0,500 ml. Le paillettes devono essere sigillate e prive di contaminazione esterna. Per tale motivo è obbligatorio utilizzare raccordi che consentono di riempire le paillettes senza immergerle nel liquido seminale e la termosaldatrice per la chiusura delle paillettes.

Per quanto riguarda le provette con tappo a vite per criogenia, si rammenta che sono garantite dalle ditte produttrici solo per il congelamento e lo stoccaggio nei vapori di azoto ma non per il congelamento e lo stoccaggio in azoto liquido (rischio che "scoppino").

- **MARCATURA**

E' importante effettuare delle procedure standard per la marcatura dei campioni. La marcatura deve essere leggibile e indelebile per evitare gli scambi tra i campioni. Per garantire la rintracciabilità del paziente le paillettes devono essere marcate con un codice che identifica il paziente stesso. Per la marcatura delle paillettes è necessario impiegare l'etichettatrice per singola paillette che consente di trattare tutti i tipi di paillettes.

Una alternativa è quella di utilizzare cilindri di 35-40 mm di lunghezza, detti JONCS, su cui è possibile scrivere con pennarello a punta fine, da inserire nello

spazio sovrastante lo stoppino delle paillettes CBS da 0,300 ml. Le paillettes in questo caso vengono termosaldare da entrambe le estremità.

Sempre ai fini di una facile e sicura rintracciabilità del paziente è opportuno marcare con il nome o il codice del paziente anche i visotubi.

- **PERCORSO IDENTIFICATIVO DEL PAZIENTE**

- **Contrassegnare con nome o codice:**

- Contenitore sterile per la raccolta
- Provetta sterile in cui viene trasferito il campione
- Paillettes
- Visotubi

- **Registrare:**

- tipo di paillettes
- tipo di terreno e il lotto
- numero paillettes crioconservate per singolo paziente e loro localizzazione

- **CONGELAMENTO**

Si effettua nei vapori di azoto mediante due tipi di metodiche: una si basa sul congelamento lento, l'altra su quello rapido.

Il primo metodo si avvale di apparecchiature automatiche che portano gradualmente le cellule dalla T ambiente a quella di crioconservazione con velocità controllata (opzionali).

Il secondo metodo permette un congelamento rapido e non richiede attrezzature sofisticate come la precedente. La tecnica più utilizzata è il congelamento verticale che si effettua nei vapori di azoto in contenitori criogenici di adeguato calibro.

- **Metodologia di crioconservazione (Congelamento - Metodo rapido)**

- Valutare i parametri seminali al termine della fluidificazione
- Scongellare il terreno crioprotettivo in termostato a 37 °C
- Diluire 1:2 il liquido seminale con terreno crioprotettivo e lasciare a 37°C per 10 min (fase di condizionamento).
- Aspirare con la pompa a vuoto la sospensione così ottenuta nelle paillettes mediante raccordi specifici, per evitare contaminazioni esterne
- Sigillare le paillettes con la saldatrice e marcarle
- Inserire le paillettes nell'apposito supporto verticale

- Inserire i visotubi porta paillettes nelle apposite stecche e posizzarle in uno dei cestelli del contenitore di stoccaggio
- Inserire il dispositivo di crioconservazione nel contenitore dell'azoto
- Far discendere lentamente le paillettes sino a raggiungere la superficie dell'azoto, quindi sollevarle lentamente al di sopra del livello del liquido
- Lasciare nei vapori di azoto circa 8 minuti
- Al termine del congelamento immergere lentamente le paillettes nell'azoto liquido
- Estrarre lentamente le paillettes dall'azoto, trasferirle rapidamente nei visotubi e immergere il tutto nell'azoto liquido.

• SCONGELAMENTO

La tecnica di scongelamento deve consentire alle cellule di recuperare le normali attività biologiche, limitando quanto più possibile rapide differenze di temperatura. E', quindi, necessario estrarre lentamente le paillettes dall'azoto liquido e consentire il raggiungimento dell'equilibrio termico tra materiale cellulare ed ambiente esterno.

Tecniche di scongelamento utilizzate:

- a T ambiente per 10' e in termostato a 37 °C per 10'
- in termostato a bagnomaria a 37° C per 10'
- a T ambiente (22 °C) per 15'

• ARCHIVIO

Ogni banca del seme deve essere dotata di un archivio dedicato, in cui debbono essere conservati a tempo indefinito tutti i dati relativi ai pazienti che hanno crioconservato il proprio seme, anche se quest'ultimo è stato eliminato o ritirato in toto. Tale archivio deve essere accessibile solo a personale autorizzato.

Per ogni paziente devono essere archiviati i seguenti dati:

- Dati identificativi del paziente (codice, cognome, nome, codice fiscale)
- Data della crioconservazione
- Fotocopia del documento di identità
- Documentazione attestante il motivo per cui è stata eseguita la crioconservazione
- Analisi infettivologiche
- Consensi informati
- Numero paillettes congelate, loro capacità volumetrica e loro localizzazione
- Numero paillettes ritirate
- Certificato di morte (eventuale)