

# CAPITOLO 6

## LO STOCCAGGIO IN AZOTO LIQUIDO

### PRINCIPI GENERALI

L'applicazione delle tecniche di crioconservazione di cellule e tessuti e la gestione dei campioni crioconservati nell'ambito della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) sono regolate dalle seguenti norme: Legge 40/2004 e relative Linee Guida, Decreto Legislativo 191/2007 e Decreto Legislativo 16/2010 (così come modificato dal D. Lgs. 85/2012), Decreto Legislativo 81/08.

Le "Linee Guida per la sala criobiologica di un istituto dei tessuti" 2014 definiscono le caratteristiche organizzative, strutturali e tecnologiche che la sala criobiologica deve possedere al fine di garantire il più alto livello di Qualità e Sicurezza delle cellule e tessuti crioconservati finalizzati all'uso clinico e il più alto livello di Sicurezza per il personale addetto.

# INDICE

- **Introduzione**
- **Approccio organizzativo delle biobanche**
  - **Requisiti strutturali ed impiantistici della sala criogenica**
  - **Strumenti di stoccaggio e gestione campioni**
  - **Norme comportamentali**
- **Problematiche relative alla sicurezza del campione**

# STOCCAGGIO IN AZOTO LIQUIDO

Normative di riferimento per la gestione della sala criogenica nei centri di PMA

L. 40/2004  
D.Lgs. 191/2007  
D.Lgs. 16/2010  
D.Lgs. 81/08

Requisiti strutturali ed impiantistici

- Descrizione dei Requisiti strutturali minimi secondo "Linee Guida per la sala criobiologica di un istituto dei tessuti" 2014

Strumenti di stoccaggio e gestione dei campioni

- Caratteristiche dei dewar per lo stoccaggio
- Aspetti relativi alla gestione e sicurezza dei campioni
- Procedure specifiche

Norme comportamentali

- Descrizione di norme comportamentali per la sicurezza dei campioni e del personale
- Formazione del personale dedicato
- Procedure specifiche

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni le metodiche di crioconservazione hanno acquisito sempre maggior valenza nel trattamento dell'infertilità, determinando un aumento delle *chance* di successo e rappresentando una strategia per la preservazione del potenziale riproduttivo.

Tali tecniche trovano applicazione nell'ambito della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) per la salvaguardia dei singoli gameti, embrioni e tessuti gonadici.

La trasposizione delle Normative Europee nella Legislazione Italiana, ha comportato l'emanazione di obblighi e requisiti specifici per le condizioni di stoccaggio e per tutti i procedimenti ad esse connessi al fine di garantire il più alto livello di Qualità e Sicurezza delle cellule e tessuti trattati.



**In particolare, per quanto concerne la criopreservazione di gameti, embrioni e tessuti gonadici umani le disposizioni in vigore prevedono che:**

- i centri di 1° livello possono eseguire solo la crioconservazione e stoccaggio dei gameti maschili, mentre i centri di 2° e 3° possono eseguire la crioconservazione e stoccaggio dei gameti maschili, femminili, embrioni e tessuti gonadici;
- ogni centro di PMA autorizzato e/o accreditato dalle Regioni a svolgere tecniche di fecondazione *in vitro* deve dotarsi delle apparecchiature e strumentazioni adeguate per applicare le migliori tecniche di crioconservazione e scongelamento di gameti, zigoti ed embrioni;
- gli ambienti per la criopreservazione devono presentare adeguate caratteristiche strutturali e di sicurezza ed essere

dedicati allo svolgimento di tale attività specifica; l'accesso in tali aree deve essere consentito solo a personale qualificato e formalmente autorizzato;

- devono essere presenti procedure operative scritte per ogni fase di utilizzo delle cellule e dei tessuti crioconservati;
- in ogni centro devono essere presenti appropriate misure di sicurezza e specifiche procedure d'emergenza al fine di garantire la qualità e integrità dei campioni e la salvaguardia del personale.
- le strutture che offrono il servizio di criopreservazione dei gameti, tessuti gonadici ed embrioni devono perseguire il mantenimento di un contatto con i soggetti donatori cui appartengono onde informarli dell'eventuale approssimarsi della data di scadenza della conservazione.

La presenza di un Sistema Gestione Qualità (SGQ) ben strutturato (D.Lgs. 191/07, Art.16), è fondamentale per il raggiungimento della piena conformità con le norme tecniche e le leggi cogenti applicabili. Documentate procedure operative che definiscono e descrivono ciascuna fase di lavorazione, garantiscono la standardizzazione e la sicurezza di tutte le attività correlate allo stoccaggio.

Un'appropriate analisi proattiva del processo e una documentata valutazione dei rischi, consente la minimizzazione e la prevenzione di possibili eventi avversi; l'identificazione dei parametri critici, delle apparecchiature critiche e di specifici indicatori di *performance*, offre una gestione controllata delle biobanche ed un continuo miglioramento dei risultati (1).

# APPROCCIO ORGANIZZATIVO DELLE BIOBANCHE

## REQUISITI STRUTTURALI ED IMPIANTISTICI

Per garantire la gestione in sicurezza dell'azoto liquido (gas compresso, criogeno) sono state definite specifiche caratteristiche strutturali, impiantistiche e tecnologiche per i locali dedicati allo stoccaggio dei campioni crioconservati.



**La sala criobiologica deve presentare i seguenti requisiti strutturali e impiantistici (Fig. 1):**

- deve essere fisicamente isolata da altri locali o luoghi di lavoro e deve avere dimensioni adeguate ( è consigliabile per gestire e stoccare azoto liquido un locale con volume non inferiore a 20 m<sup>3</sup>);
- devono essere presenti spazi sufficienti per la movimentazione dei contenitori di azoto, dei campioni e del personale; a tal fine è consigliabile che lo spazio di manovra sia pari almeno alle dimensioni del contenitore criogenico più grande;
- deve essere asciutta, fresca, ben ventilata e priva di sorgenti di calore; dotata di un sistema di trattamento dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura tra i 18 e i 25° C e dell'umidità tra il 40% e il 55% per evitare la condensazione sulle parti più fredde dell'impianto criogenico e la deposizione di ghiaccio all'interno dei serbatoi di stoccaggio;
- l'accesso alla sala criobiologica deve avvenire attraverso una porta, la cui dimensione della luce netta non deve essere inferiore alle dimensioni del più grande dei contenitori in essa contenuto;

- la porta di accesso deve essere a tenuta o devono essere previsti dispositivi per impedire lo spandimento del gas in fase liquida o gassosa all'esterno del locale e deve essere con apertura antipanico nel verso dell'esodo;
- deve essere possibile visionare l'interno della sala criobiologica attraverso una visiva posizionata sulla porta di accesso o tramite altra modalità di visione (es. pareti con vetrate, telecamere con monitor esterno);
- deve essere presente un sistema per il monitoraggio (manuale o automatico) degli accessi al locale ed è raccomandata la registrazione dello storico degli stessi;
- i pavimenti e i rivestimenti (almeno fino ad un'altezza di 1,80) devono essere tra loro raccordati, impermeabili, facilmente sanificabili e resistenti alle basse temperature;
- devono essere presenti rilevatori ambientali di ossigeno (ossimetri), posti ad un'altezza non superiore a 1,5 m (o comunque al di sotto delle vie respiratorie degli operatori) per il monitoraggio continuo della concentrazione di ossigeno presente all'interno del locale;
- la centralina di rilevazione degli ossimetri deve permettere la visualizzazione del valore rilevato e deve essere posizionata all'esterno della sala, nelle immediate vicinanze dell'ingresso, in modo tale che il controllo avvenga in area sicura;
- deve essere presente un allarme acustico-visivo che si attiva nel caso in cui si verifichi un abbassamento della concentrazione di ossigeno nel locale e la centralina deve prevedere almeno due soglie di allarme: una alla concentrazione di ossigeno del 19%, l'altra al 18%;
- deve essere prevista una ripetizione dell'allarme (remotiz-

zazione), almeno per la seconda soglia di allarme, o in un luogo presidiato 24 ore su 24 (ad es.: centrale operativa) che consenta di avvertire il personale addetto ed eventualmente i servizi di emergenza e/o di assistenza sanitaria, o direttamente presso gli operatori;

- l'attivazione dell'allarme acustico-visivo deve automaticamente mettere in funzione un sistema di ventilazione forzata dell'ambiente e, al raggiungimento della soglia del 18% di ossigeno, dovrebbe anche comportare la chiusura della valvola di radice della linea sottovuoto ove presente e l'interruzione del rifornimento di azoto in caso di un sistema di riempimento automatico;
- il sistema di ventilazione forzata deve essere del tipo "a tutta aria esterna" e deve assicurare almeno 6 ricambi/ora in condizioni normali ed un ricambio ottimale di 25 ricambi/ora, comunque non inferiore a 20, in caso di allarme per rilevazione di una condizione di sotto ossigenazione; deve poter essere avviato anche manualmente dall'operatore (per esempio durante le attività di riempimento manuale dei contenitori criobiologici);
- deve essere disponibile un impianto di rilevamento incendio in grado di individuare e segnalare la presenza di un incendio all'interno della sala;
- deve essere presente un impianto elettrico e di illuminazione conforme alle norme tecniche in materia;
- apparecchi o impianti elettrici critici presenti nella sala criobiologica dovranno essere costantemente alimentati anche in caso di interruzione dell'erogazione di corrente attraverso collegamento a gruppo elettrogeno o a gruppo statico di continuità (UPS – *Uninterruptible Power Supply*);
- la sala criobiologica deve essere circoscritta e delimitata da



segnaletica di sicurezza, di prescrizione, di avvertimento e di divieto di accesso alle persone non autorizzate, previsti dalla normativa vigente e poste in posizione ben visibile;

- all'interno del locale insieme alla cartellonistica prevista, dovrà essere sempre esposta e facilmente consultabile la scheda di sicurezza del liquido criogenico utilizzato fornita dalla stessa ditta produttrice;
- l'impiantistica di sicurezza (sistemi di allarme acustico e visivo, il funzionamento delle sonde e della ventilazione forzata) deve essere posta a monitoraggio periodico con manutenzione preventiva semestrale;

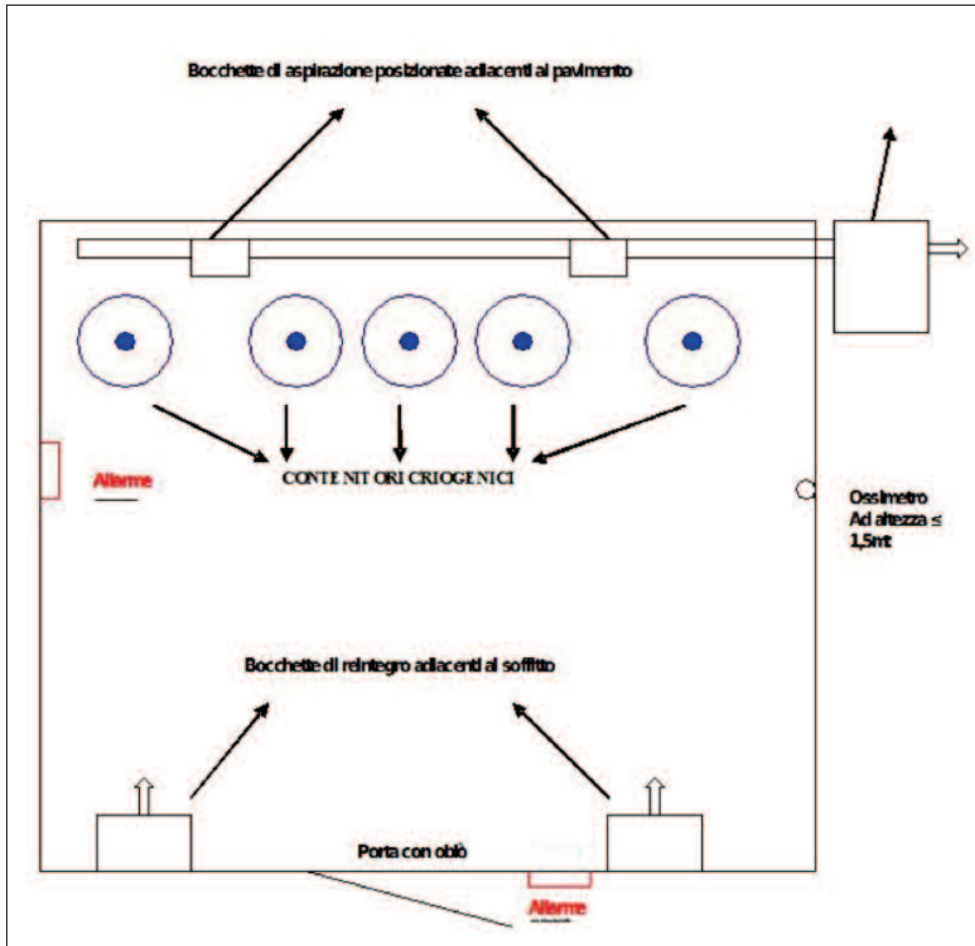


Fig. 1  
Piantina di una sala criobiologia

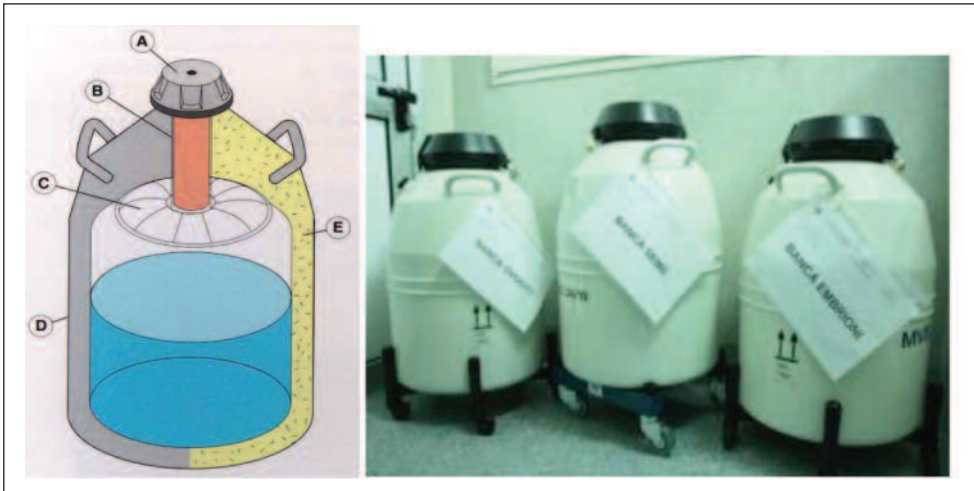
- la sala di criobiologia destinata allo stoccaggio non è un locale classificato; qualora tale stanza si aprisse nel laboratorio di grado D, deve essere classificata D anch'essa, preferibilmente con un  $\Delta P$  più basso (circa  $\frac{1}{2}$  rispetto la  $\Delta P$  del laboratorio).

## STRUMENTI DI STOCCAGGIO E GESTIONE CAMPIONI

La condizione di stoccaggio più comunemente utilizzata nei laboratori di PMA consiste nel mantenimento dei campioni biologici a temperature criogeniche ( $-196^{\circ} \text{C}$ ), immersi in azoto liquido in criocontenitori dedicati allo stoccaggio (o *Dewar*).

I *Dewar* sono caratterizzati dalla presenza di aree sotto vuoto che separano le pareti interne del contenitore da quelle esterne, consentendo l'isolamento termico tra il contenuto e l'ambiente; quelli più utilizzati nei nostri laboratori sono in alluminio a riempimento e rabbocco manuale, leggeri e compatti, caratterizzati da un basso tasso di evaporazione statica ed un minimo consumo di azoto liquido garantendo una medio-alta capacità di stoccaggio (Fig. 2).

Tuttavia, diverse tipologie di *Dewar* possono essere presenti nella sala criobiologica, a seconda della progettazione della sala stessa: criocontenitori a rifornimento automatico (Fig. 3 A) se il rifornimento di azoto è tramite sistema automatizzato, e/o criocontenitori a riempimento e rabbocco manuale (Fig. 3 B) nel caso in cui il riempimento e rabbocco è eseguito manualmente; in quest'ultimo caso, il rifornimento può essere effettuato anche tramite criocontenitori pressurizzati specifici per il trasporto e la conservazione di azoto liquido (Fig. 3 C).



**Fig. 2.** Schema strutturale di un contenitore Dewar.

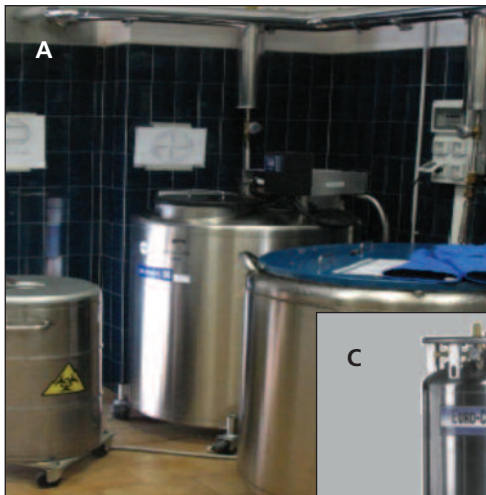
**A** Design del coperchio per facilitare la manutenzione

**B** Collo del recipiente resistente che riduce le perdite di azoto

**C** Sistema di ritenzione chimica del vuoto che fornisce una prestazione superiore per tutta la vita del prodotto

**D** Contenitore in alluminio a basso peso e ad elevata resistenza

**E** Intercapedine isolante che garantisce la massima prestazione termica



**Fig. 3 A, B, C.** Diverse tipologie di contenitori Dewar per lo stoccaggio in azoto liquido.



**Le operazioni manuali di riempimento e rabbocco possono essere effettuate nella sala criogenica o comunque in locale attiguo con le stesse caratteristiche di sicurezza.**



**È obbligatorio disporre di sistemi e/o procedure che garantiscano il monitoraggio continuo delle condizioni di stoccaggio e consentano la registrazione delle operazioni di rabbocco.**

Nel caso in cui non sia disponibile un sistema informatizzato sul controllo delle condizioni di stoccaggio, possono essere utilizzate semplici schede di registrazione che diano evidenza del monitoraggio continuo e delle operazioni eseguite.



**Oltre alle dimensioni per lo spazio di manovra, si raccomanda anche di mantenere una distanza minima tra i contenitori di azoto e le pareti della sala (non inferiore a 30 cm) e una distanza minima tra i criocontenitori stessi (non inferiore a 20 cm).**



**Ciascun criocontenitore dedicato allo stoccaggio dovrà essere univocamente identificato ed etichettato mediante la denominazione del Centro di appartenenza, numerazione (se necessaria) e descrizione del materiale biologico contenuto e dotato di sistemi di chiusura;**



**è utile siano adeguatamente corredati di maniglie e/o carrello per consentirne, in caso di necessità, il rapido spostamento.**

Per far fronte ad eventuali eventi avversi, quali malfunzionamento o necessità di eseguire manutenzione e/o sanificazione di uno di quelli in uso.



**è opportuno disporre di un criocontenitore libero ed attrezzato per lo stoccaggio, sempre fornito di azoto.**

Benché sia consigliabile pianificare gli interventi di manutenzione e sanificazione in successione, la gestione di tali procedure e la programmazione delle scadenze dipende da variabili quali tipologia e capienza dei criocontenitori e frequenza di apertura; in particolare è necessario tener presente che le scadenze relative agli interventi di manutenzione dipenderanno soprattutto dalla durata di estensione della garanzia (per la tenuta del vuoto presente nell'intercapedine isolante del criocontenitore), dato fornito dalla fabbrica produttrice.



**Ogni fase di manipolazione e di stoccaggio dei tessuti gonadici, gameti ed embrioni deve essere registrata; è necessario disporre di un sistema di monitoraggio degli errori, delle non conformità e degli eventi avversi. In particolare, secondo quanto definito dal D. Lgs. 191/2007, devono essere presenti procedure operative scritte per i seguenti processi connessi allo stoccaggio e alla criopreservazione:**

- qualificazione del personale per tali tecniche;
- controllo dell'accesso ai contenitori criogenici;
- riempimento dei contenitori criogenici;
- pulizia e manutenzione dei contenitori criogenici;
- localizzazione dei campioni ed eventuale durata della crioconservazione;
- contenitori differenziati per campioni criopreservati contaminati (se applicabile);
- trasporto di campioni contaminati.



**I dati identificativi dei soggetti donatori da cui provengono i tessuti gonadici, i gameti e da cui sono stati generati gli embrioni devono essere accuratamente registrati; i campioni devono essere etichettati in modo da non consentire alterazioni non autorizzate e non riconoscibili.**

**La documentazione dei campioni crioconservati deve includere:**

- il numero di ovociti contenuti in ciascun supporto di congelamento e il loro stadio maturativo;
- la concentrazione e motilità pre-congelamento degli spermatozoi contenuti nelle *paillettes*;
- il numero di embrioni contenuti in ogni supporto di congelamento;
- lo stadio dello sviluppo embrionario;
- il numero di supporti crioconservati per ogni paziente;
- i dati specifici relativi alla tracciabilità durante le fasi di manipolazione (lotto di appartenenza dei materiali e terreni venuti a contatto con le cellule ed i tessuti).



**Inoltre, al fine di garantire una gestione controllata e sicura, la normativa in materia prevede che ciascun centro abbia una procedura per verificare periodicamente, almeno una volta all'anno, la corrispondenza tra il materiale biologico crioconservato e la relativa documentazione.**



**Tuttavia, per minimizzare i possibili rischi da in-giurie termiche e/o contaminazione che tale operazione può comportare, la verifica può essere effettuata controllando la correttezza della rintracciabilità e registrazione dei dati quando dobbiamo disporre di un campione da scongelare.**

Com'è noto, uno degli obiettivi delle direttive europee è quello di impedire l'eventuale trasmissione di malattie attraverso le tecniche.



**Per tale ragione i donatori dovranno eseguire esami sierologici come previsto nel punto 2, Allegato III. del D.Lgs. 16/2010 "Criteri di selezione ed esami richiesti per i donatori di cellule riproduttive".**

Nei Centri in cui è prevista la crioconservazione di campioni positivi (o di cui non sia disponibile il risultato) per gli esami sierologici previsti (l'Annex III del D.Lgs. 16/2010 prevede l'obbligo di eseguire esami) sarà necessario disporre di criocontenitori per lo stoccaggio dei campioni negativi, criocontenitori dedicati per le diverse patologie *screenate* e almeno

un criocontenitore dedicato alla "quarantena", dove verranno temporaneamente criopreservati eventuali campioni ancora in attesa dei referti sierologici (Fig. 6).

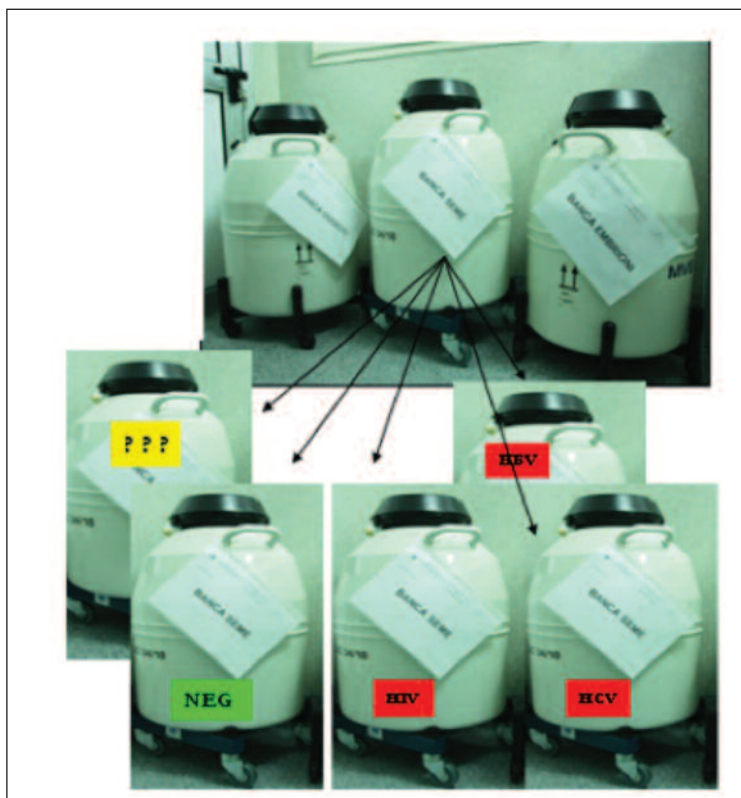


Fig. 6.

## NORME COMPORTAMENTALI



**L'accesso alla sala criobiologica deve essere controllato e limitato esclusivamente al personale autorizzato. Devono comunque essere disponibili procedure scritte nelle quali vengano definite le modalità e le condizioni per l'accesso ai locali, sotto il controllo del Responsabile del Centro.**



Diversi sono gli aspetti da considerare per quanto concerne la tutela della sicurezza e della salute del personale che opera in tale ambito.



**È compito del Responsabile del Centro assicurare l'attuazione degli adempimenti previsti dal D. Lgs. 81/08 e norme correlate.**

**In particolare ricordiamo che il lavoratore è tenuto ad osservare scrupolosamente i seguenti obblighi:**

- osservare disposizioni e istruzioni
- utilizzare correttamente macchine e attrezzature, ecc.
- utilizzare correttamente i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)
- segnalare carenze e condizioni pericolose
- non agire autonomamente in operazioni di manovra che possono comportare rischi
- prendere parte ai programmi formativi e di addestramento previsti dal datore di lavoro
- sottoporsi periodicamente ai controlli sanitari

Nella gestione di un programma di assicurazione della qualità devono essere incluse tutte le procedure e le precauzioni necessarie per il mantenimento di un ambiente di lavoro sicuro; tali procedure devono uniformarsi alla normativa europea, nazionale e locale.

È necessario assicurare l'identificazione e la minimizzazione dei rischi, pur mantenendo un livello di qualità e sicurezza del materiale biologico adeguato allo scopo prefissato (Sez. B, p.5 dell'ASR del marzo 2012).

Tutte le operazioni che contemplano l'utilizzo diretto del-

l'azoto liquido dovranno essere eseguite in sicurezza e specifiche Istruzioni Operative (I.O.) dovranno essere dedicate (es. estrazione campione biologico, rabbocco dei criccontentori, laddove sia previsto, ecc.).

Tutto il personale coinvolto nelle attività di stoccaggio e in tutte le attività ad esso correlate, deve essere adeguatamente formato.



**L'addestramento specifico dovrebbe prevedere l'informazione e la formazione per i rischi relativi alla manipolazione di un liquido criogenico.**

I principali rischi legati alla manipolazione dell'azoto sono:

- **ustioni da contatto** con il gas in forma liquida (temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$ ); nel caso che il contatto sia prolungato le lacerazioni possono essere molto gravi in quanto dovute a congelamento dei tessuti
- **lesioni oculari** dovute a contatto con il liquido o vapore criogenico
- **asfissia** dovuta alla presenza del mezzo criogenico in forma gassosa nell'ambiente con conseguente diminuzione della concentrazione di ossigeno presente nell'aria; l'inalazione di vapori a bassa temperature può comportare danneggiamenti ai polmoni.

Per ridurre il rischio da contatto nelle fasi di lavorazione in cui è prevista la manipolazione diretta del gas liquefatto refrigerato, la norma prevede:

**L'utilizzo di specifici DPI (Fig. 7) marcati CE:**

- occhiali o visiere facciali (Fig. 7 A) per la protezione da spruzzi di liquido criogenico: conforme alla norma EN 166;

- guanti diatermici molto larghi in modo da poterli sfilare facilmente in caso di penetrazione (Fig. 7 B): DPI di II categoria conforme alle norme EN 511;
- paragambo e pantaloni lunghi o tuta contro gli spruzzi alle gambe o altre parti del corpo (Fig. 7 C): DPI di II categoria conforme alle norme EN 511;
- calzari a protezione dei piedi e del polpaccio; quando non vengano indossate calzature completamente chiuse (Fig. 7 D).



Fig. 7.  
DPI



**Si riporta di seguito un elenco non esaustivo di norme comportamentali specifiche di prevenzione:**

- maneggiare sempre l'azoto liquido con la massima cautela;
- tenere il contenitore aperto il minor tempo possibile per evitare il pericolo di condensazione e formazione di gas;
- non toccare con la pelle non protetta tubazioni e recipienti contenenti azoto liquido per ridurre il rischio di ustioni;
- non rovesciare azoto liquido inutilizzato, negli scarichi o sul pavimento;
- utilizzare esclusivamente acqua calda per sbloccare valvole congelate;

- indossare idonei DPI;
- raccogliere dietro la nuca i capelli lunghi;
- tenersi sempre ad una distanza di sicurezza dall'azoto che bolle o schizza e dal gas da esso emanato;
- è consigliabile usare scarpe alte o comunque sufficientemente chiuse;
- quando si maneggiano dei liquidi in contenitori aperti, per evitare di non versarli dentro le calzature, indossare sempre pantaloni all'esterno delle calzature;
- eseguire sempre lentamente le operazioni di riempimento di un recipiente o di immersione nel liquido di oggetti non raffreddati così da minimizzare ebollizione e schizzi;
- usare sempre delle tenaglie o delle pinze dalla presa sicura per immergere o estrarre oggetti dal fluido criogenico, mai le mani;
- evitare di riempire i contenitori oltre il livello di sicurezza: l'eccesso di liquido aumenta il tasso di evaporazione ed il pericolo di trabocchi durante il trasporto;
- per il trasferimento di contenitori pieni utilizzare sempre mezzi appropriati (per es. carrelli);
- ricordare sempre che oggetti normalmente morbidi e pieghevoli a temperatura ambiente diventano estremamente duri e fragili alla temperatura di questi liquidi;
- evitare di lavorare da soli durante le attività che comportino l'uso e/o la manipolazione dell'azoto liquido;
- avvertire i colleghi prima di eseguire qualsiasi operazione particolarmente pericolosa;
- non avvicinarsi a zone ove si effettuano operazioni pericolose, se non vi è la necessità;
- rispettare la segnaletica di sicurezza presente;

- non tenere nella sala criobiologica quanto non sia strettamente necessario per lo svolgimento delle attività (ad es. effetti personali), in particolare materiali ingombranti o facilmente combustibili;
- non utilizzare tubi per misurare il livello di azoto liquido (effetto camino).

L'impiantistica di sicurezza adeguata prevista dalle norme stesse, come descritto nel paragrafo dedicato (2.1), consente la minimizzazione del rischio di asfissia.



**Tuttavia, a seguito di un'attenta valutazione dei rischi, può talvolta essere consigliato l'utilizzo di più ossimetri in base alla dimensione della sala criogenica e/o ossimetri portatili indossati direttamente dall'operatore. Nel caso in cui risulti necessario, a seguito di una valutazione dei rischi, può essere previsto disporre di autorespiratore.**

Dovranno essere dettagliatamente descritte, mediante procedure dedicate, le regole comportamentali a cui il personale dovrà attenersi in caso di condizioni di rischio quale diminuzione della tensione di ossigeno nel locale (tenendo conto delle diverse situazioni operative possibili: presenza o meno di personale). A tal proposito, è importante considerare che un abbassamento della concentrazione di ossigeno nel locale può verificarsi sia per rottura e/o malfunzionamento di un criocontenitore con conseguente fuoriuscita di azoto liquido, sia durante alcune fasi operative che prevedono il travaso del mezzo criogenico e/o la frequente introduzione nel mezzo stesso di materiali a temperatura ambiente.

Devono inoltre essere definite procedure di emergenza quali “Procedura d’intervento in condizione eccezionale di carenza di ossigeno nella sala criogenica” e “Procedura di emergenza per mobilitazione e trasferimento delle crio-banche”.



**Per quest’ultima è necessario che ogni Centro abbia definito specifici accordi con un altro potenziale Centro ricevente, in modo da garantire la sicurezza, l’accessibilità e la continuità del trattamento.**

## **PROBLEMATICHE RELATIVE ALLA SICUREZZA DEL CAMPIONE**

I potenziali rischi di contaminazione correlati all’applicazione delle tecniche di crioconservazione e allo stoccaggio dei campioni nella PMA sono stati ampiamente trattati in letteratura (2, 3); una delle principali problematiche emerse nella nostra pratica laboratoristica è data dall’utilizzo dell’azoto allo stato liquido.

Sebbene l’azoto liquido fornito dalle ditte produttrici presenti un grado di purezza elevato, le modalità di stoccaggio dei campioni all’interno dei criocontenitori non consentono la sterilità in tali ambienti: è ipotizzabile nel tempo un aumento della contaminazione del mezzo di stoccaggio imputabile principalmente a quanto accade durante le fasi di estrazione o inserimento dei campioni.

In effetti, l’azoto liquido può andare incontro a contaminazione di origine atmosferica e microbica.

La prima condizione è ammissibile a causa della liquefazione dell’ossigeno atmosferico nel mezzo di stoccaggio con conseguente possibilità di reazioni di ossidazione e potenziale danneggiamento del materiale crioconservato. Mentre, il verificarsi

di una contaminazione microbica è ipotizzabile come conseguenza della formazione di cristalli di ghiaccio sulla superficie dei materiali costituenti i dispositivi per lo stoccaggio; tali aggregati possono intrappolare virus, batteri, spore batteriche e fungine e detriti che, accumulandosi nel mezzo di stoccaggio, potrebbero potenzialmente contaminare i campioni.

È stato largamente dimostrato che gran parte dei microorganismi quali *Neisseria gonorrea*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, gli streptococchi, il citomegalovirus, i virus dell'epatite, il simplex virus, gli adenovirus, i poliovirus, *Trichomonas vaginalis*, *Aspergillus* spp e *Candida albicans* sopravvivono alle temperature criogeniche e alle procedure di congelamento/scongelo grazie ad alcune componenti dei mezzi comunemente utilizzati in tali procedure (4, 5).



**Risulta quindi fondamentale disporre di procedure sicure che consentano una manipolazione rapida ed accurata in tutte le fasi di stoccaggio, di rintracciabilità e di spostamento del materiale biologico in altri criocontenitori (6-8). Un approccio consapevole a tali criticità comporta la pianificazione nel tempo della sanificazione dei criocontenitori dedicati allo stoccaggio.**

Benché ad oggi nel campo della PMA non vi siano evidenze scientifiche di contaminazione e cross-contaminazione legati all'utilizzo dell'azoto nella fase liquida (9), l'importanza sempre maggiore delle tecniche di criopreservazione in tale ambito, impone una approfondita conoscenza delle metodologie utilizzate per una coerente e completa valutazione dei rischi che possono potenzialmente essere insite nelle tecniche.

Lo stoccaggio dei campioni in vapori d'azoto consente una notevole diminuzione dei rischi di contaminazione e cross-contaminazione (10-12); a dispetto di ciò, i costi proibitivi per l'installazione e la gestione di tali impianti rappresentano un grosso limite per la maggior parte dei Centri.

## BIBLIOGRAFIA

1. Mortimer D, Mortimer S. Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2009.
2. Bielanski A, Vajta G. Risk of cotamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod.* 2009;24:2457-2467.
3. Tomlinson M. Risk management in cryopreservation associated with assisted reproduction. *Cryo Letters.* 2008;29:165-174.
4. Rall WF. Avoidance of microbial cross-contamination of cryopreserved gametes, embryos, cells and tissues during storage in liquid nitrogen. *Embriologists' Newsletter.* 2003;6:2-15.
5. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irvin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet.* 1995;346:137-139.
6. Tomlinson M, Morrol D. Risk associated with cryopreservation: a survey of assisted conception units in the UK and Ireland. *Hum Fertil (Camb).* 2008;11:33-42.
7. Benifla JL, Letur- Konirsch H, Collin G, Devaux A, Kutten F, Madelenat P, BrunVezinet F, Feldmann G. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a preliminary study with human immunodeficiency virus – I. *Hum Reprod.* 2000;15:2186-218.
8. Letur-Konirsch H, Collin G, Sifer C, Devaux A, Kutten F, Madelenat P, BrunVezinet F, Feldmann G, Benifla JL. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a study with human immunodeficiency virus-I under cryopreservation conditions. *Hum Reprod.* 2003;18:140-144.
9. Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril.* 2010;94:1181-1188.
10. Cobo A, Romero JL, Perez S, de Los Santos MJ, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocyte in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril.* 2010a;94:1903-1907.
11. Eum JH, Park JK, Lee WS, Cha KR, Yoon TK, Lee DR. Long term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertil Steril.* 2009;91:1928-1932.
12. Grout BW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapor as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology.* 2009;71:1079-1082.