

## **CAP 5**

# **LO STOCCAGGIO IN AZOTO LIQUIDO**

**CRISTINA BOTTAZZI**

*E.O. OSPEDALI GALLIERA, GENOVA*

## 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 di 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.

In Italia, l'applicazione delle suddette metodologie e la gestione dei campioni crioconservati sono regolamentate dalle seguenti norme: Legge 40/2004 (così come modificata dalla sentenza n.151/2009 della Corte Costituzionale), Decreto Legislativo 191/07 e Decreto Legislativo 16/10 (così come modificato dal D. Lgs. 85/2012), Decreto Legislativo 81/08.

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.

Tuttavia, quanto previsto dal quadro normativo attuale non dovrebbe essere lontano dalla nostra buona pratica di laboratorio; le "Good Laboratory Practice dell'ESHRE", già integrate con quanto richiesto dalle direttive europee, rappresentano un riferimento per chiunque pratici PMA (1).

In particolare, per quanto concerne la criopreservazione di gameti ed embrioni le disposizioni in attuazione prevedono che:

- ogni centro di PMA autorizzato e/o accreditato dalle Regioni a svolgere tecniche di fecondazione *in vitro* debba 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;
- in ogni centro devono essere presenti appropriate misure di sicurezza in caso di rottura o malfunzionamento dei contenitori criogenici e dei sistemi di crioconservazione;

- devono essere presenti procedure operative scritte per ogni fase di utilizzo delle cellule e dei tessuti crioconservati per minimizzare i rischi di contaminazione o di perdita di materiale biologico;

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.

Ogni fase di manipolazione 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.

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 ciascuna *paillette* e il loro stadio maturativo;
- la concentrazione e motilità e motilità pre-congelamento degli spermatozoi contenuti nelle *paillette*;
- il numero di embrioni contenuti in ogni *paillette*;
- lo stadio dello sviluppo embrionario;
- il numero di *paillette* crioconservate 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).

I sistemi di registrazione devono permettere di assicurare la tracciabilità di ogni fase del trattamento dei campioni e dell'operatore che ha svolto la procedura.

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.

Concretamente, quanto richiesto è garantire il controllo e la tracciabilità di tutte le fasi di manipolazione delle cellule e dei tessuti crioconservati.

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, per altro previsto dalle normative stesse (D.Lgs 191/07, Art.16), è fondamentale per il raggiungimento della piena conformità. Documentate procedure operative che definiscono e descrivono ciascuna fase di lavorazione garantiscono la standardizzazione e la sicurezza di tutte le attività correlate alla crioconservazione e allo stoccaggio. L'analisi dei punti critici, che in tale ambito spesso sono dovuti a problematiche di tipo organizzativo e logistico, consente la minimizzazione dei rischi, la prevenzione di possibili eventi avversi che possono compromettere la qualità e l'integrità dei campioni crioconservati e la sicurezza del personale.

Inoltre, 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 (2).

#### Approccio organizzativo delle biobanche: Qualità e Sicurezza

Uno degli obiettivi primari della direttiva nella PMA è quello di impedire l'eventuale trasmissione di malattie attraverso le tecniche; un qualunque evento negativo collegato con

l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, lo stoccaggio e la distribuzione di cellule o tessuti che possa provocare la trasmissione di patologie, la morte o condizioni di pericolo di vita, di invalidità o incapacità dei pazienti o ne possa produrre o prolungare l'ospedalizzazione o lo stato di malattia si definisce “Evento avverso grave” (Art.3, D.Lgs 191/2007).

A tal fine, l'Annesso III del D.Lgs. 16/2010 prevede l'obbligo di eseguire esami sierologici entro i 90 giorni precedenti la raccolta delle cellule fatta eccezione di specifici casi in cui non sia prevista né la lavorazione né la crioconservazione del campione biologico donato.

I risultati sierologici positivi (o la non disponibilità dei risultati) non impediscono necessariamente la raccolta; in tal caso però il Centro di PMA dovrà essere adeguatamente attrezzato per offrire un sistema di lavorazione e conservazione separata.

Inoltre, secondo quanto previsto, il materiale biologico crioconservato deve essere tenuto lontano da materiale radioattivo e da ogni potenziale sorgente nota di infezione, contaminazione chimica o atmosferica.

Una gestione sicura della biobanca comporta quindi l'analisi di tutti i potenziali rischi compresi quelli di contaminazione e cross-contaminazione dei campioni.

L'interpretazione corretta e l'attuazione delle disposizioni in materia, hanno messo in evidenza alcune problematiche relative ad aspetti scientifico – tecnologici che nella nostra pratica possono costituire reali potenziali fonti di rischio; ne esamineremo qui di seguito alcune con l'intento di offrire spunti pratici e suggerimenti utili per un approccio organizzativo congruo con le prescrizioni di legge.

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 (3, 4); una delle principali problematiche emerse nella nostra pratica laboratoristica è data dall'utilizzo dell'azoto allo stato liquido.

Come è noto infatti, la condizione di stoccaggio più comunemente utilizzata consiste nel mantenimento dei campioni biologici a temperature criogeniche (a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), immersi in azoto liquido in criocontenitori dedicati e le modalità di stoccaggio non consentono la sterilità in tali ambienti.

E' stato largamente dimostrato che gran parte dei microorganismi quali, *Neisseria gonorrea*, *Treponema pallidum*, *Chlamidia trahomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, gli streptococchi, il citomegalovirus, i virus dell'epatite, il simplex virus, gli adenovirus, i pilloavirus, *Trichomonas vaginalis*, *Aspergillus spp* e *Candida albicans* sopravvivono alle temperature criogeniche e alle procedure di congelamento e scongelamento e che alcune componenti dei mezzi di coltura comunemente utilizzati in tali procedure sono in grado di proteggere virus e batteri da tali temperature (5, 6).

Per tale ragione, nei Centri in cui è prevista la criopreservazione di campioni positivi (o di cui non sia disponibile il risultato degli esami) sarà necessario disporre di criocontenitori per lo stoccaggio dei campioni negativi, criocontenitori dedicati per le diverse patologie infettive screenate e almeno un criocontenitore dedicato alla "quarantena" dove verranno temporaneamente criopreservati i campioni ancora in attesa dei referti sierologici.

Inoltre, sebbene l'azoto liquido fornito dalle ditte produttrici presenti un grado di purità elevato, è stato osservato che all'interno dei criocontenitori, 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, è stato osservato che, in queste fasi, l'azoto liquido può andare incontro a contaminazione di origine atmosferica e microbica. La prima condizione è ipotizzabile 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 funginee e detriti che, accumulandosi nel mezzo di stoccaggio, potrebbero potenzialmente contaminare i campioni.

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 al fine di garantire la qualità e la sicurezza dei campioni minimizzando i rischi di possibili ingiurie termiche e/o contaminazioni (7).

Un approccio consapavole a tali criticità comporta la pianificazione nel tempo della sanificazione

dei criocontenitori dedicati allo stoccaggio.

Benchè sia consigliabile pianificare gli interventi di manutenzione e sanificazione in successione la gestione di tali procedure e la programmazione delle scadenze sarà dipendente da diverse 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.

Come è noto infatti, i contenitori criogenici (o *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 che più comunemente vengono utilizzati nei nostri laboratori sono in alluminio, 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.1).

**Fig.1:**

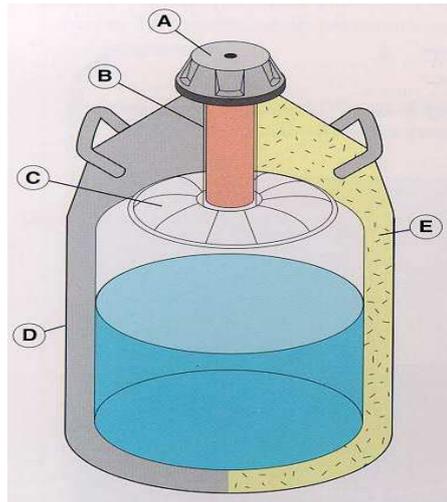
**A** Design del coperchio per facilitare al manutenzione

**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



Al fine di poter eseguire gli interventi di pulizia e manutenzione è consigliabile disporre di un criocontenitore libero attrezzato per lo stoccaggio, per altro utilizzabile anche per far fronte ad eventuali eventi avversi quale malfunzionamento di quelli in uso.

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; i criocontenitori dovranno inoltre essere dotati di sistemi di chiusura, sistemi e/o procedure che garantiscano il monitoraggio continuo delle condizioni di stoccaggio e dovranno essere adeguatamente corredati al fine di consentirne, in caso di necessità, il rapido spostamento.

Tuttavia, è importante tener presente che nella maggior parte dei casi delle ipotizzabili condizioni di rischio di contaminazione durante lo stoccaggio, l'evento avverso determinante è il danneggiamento del dispositivo contenente il materiale biologico crioconservato; l'utilizzo dei supporti ad alta sicurezza (8, 9) riduce drasticamente tali rischi.

Lo stoccaggio dei campioni in vapori d'azoto consente una notevole diminuzione dei rischi di contaminazione e cross-contaminazione (10, 11, 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.

La problematica relativa ai possibili rischi di contaminazione legati all'utilizzo dell'azoto liquido nella nostra pratica è emersa, recentemente, anche per alcune procedure di congelamento di ovociti ed embrioni umani per l'applicazione sempre più frequente della tecnica di vitrificazione.

In questi ultimi anni, la rapida evoluzione dei protocolli ed il progressivo sviluppo dei supporti di vitrificazione hanno permesso di ottenere per la criopreservazione di ovociti umani risultati stimolanti e paragonabili in termini di gravidanza a quelli ottenuti da ovociti freschi (13, 14, 15, 16); l'“*egg banking*”, oggi, rappresenta non solo una strategia efficace per la preservazione della fertilità nelle pazienti oncologiche ma offre vantaggi anche nel trattamento delle coppie infertili.

Ma, ad oggi, i risultati migliori ottenuti mediante le tecniche di vitrificazione provengono da quelle procedure in cui è previsto l'utilizzo dei cosiddetti sistemi “aperti” e denominatore comune in tali metodiche è il contatto diretto tra la soluzione di vitrificazione contenente gli ovociti o embrioni e l'azoto liquido durante la fase di raffreddamento e talvolta durante lo stoccaggio. Tuttavia, la continua progettazione di nuove strategie da parte della comunità scientifica ci fa sperare sempre più nella possibilità di eseguire in futuro tali tecniche in sicurezza mediante l'approccio procedurale che prevede la separazione della fase di raffreddamento (eseguita in condizioni asettiche) dalla fase di stoccaggio mantenendo inalterata l'efficacia della tecnica (17).

Benché nell'uomo ad oggi non vi siano evidenze scientifiche di contaminazione e cross-contaminazione nel campo della PMA (18), l'importanza sempre maggiore delle tecniche di criopreservazione in tale ambito impone una approfondita conoscenza delle metodologie indispensabile per una completa e coerente valutazione dei rischi nella gestione di un programma di assicurazione della qualità.

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

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

Nella gestione di un programma di gestione 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.

E' necessario assicurare l'identificazione e la minimizzazione dei rischi, pur mantenendo un livello di qualità e sicurezza del materiale biologico adeguati allo scopo prefissato (Sez. B, p.5 del Documento dell'Osservatorio sul D. Lgs 191/07).

Tutte le operazioni che contemplano l'utilizzo diretto dell'azoto liquido dovranno essere eseguite, per quanto sia prevedibile, in sicurezza e specifiche Istruzioni Operative (I.O.) dovranno essere dedicate (es. estrazione campione biologico, rabbocco dei criocentimetri, laddove sia previsto, ...etc).

Nell'area dedicata alla criogenia insieme alla cartellonistica prevista, dovrà essere sempre esposta e facilmente consultabile la scheda di sicurezza del liquido criogenico utilizzato fornita dalla stessa ditta produttrice.

Dovranno essere dettagliatamente descritte, mediante I.O. dedicate, le regole comportamentali a cui il personale dovrà attenersi in caso di condizioni di rischio quale diminuzione della tensione di ossigeno nel locale dedicato (tenendo conto delle diverse situazioni operative possibili: presenza o meno di personale).

A tal proposito, è importante considerare che un abbassamento della tensione di ossigeno nel locale può verificarsi sia per rottura e/o malfunzionamento di un criocentimetro 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.

Tutto il personale coinvolto nelle attività di stoccaggio e in tutte le attività ad esso correlate, deve essere adeguatamente formato; l'addestramento specifico prevede l'informazione e la formazione per i rischi relativi alla manipolazione di un liquido criogenico.

E' ben noto che, al fine di ridurre il rischio da contatto dell'operatore con l'azoto liquido nelle fasi di lavorazione in cui è prevista la manipolazione diretta del gas liquefatto refrigerato, la norma prevede l'utilizzo di specifici Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) (Fig. 2).

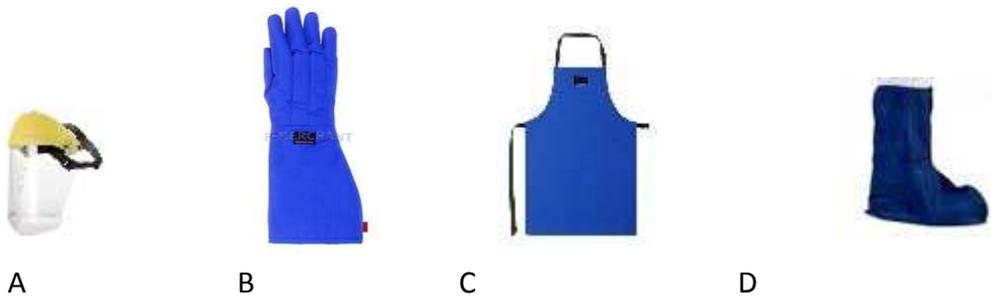
Al fine di evitare il contatto con il liquido o vapori freddi è necessario adottare le seguenti misure di prevenzione e protezione di tipo personale:

- usare occhiali o visiere facciali (Fig. 2, A) durante le operazioni per le quali si prevedono spruzzi di liquido criogenico (travasi o altro);
- indossare appositi guanti diatermici molto larghi in modo da poterli sfilare facilmente in caso di penetrazione (Fig. 2, B);
- indossare paragambo e pantaloni lunghi o tuta contro gli spruzzi alle gambe o altre parti

del corpo (Fig. 2, C);

- indossare calzari a protezione dei piedi e del polpaccio; quando non vengano indossate calzature completamente chiuse (D).

Fig.2: DPI



In conclusione possiamo affermare che le tecniche di crioconservazione, grazie al continuo miglioramento in termini di sopravvivenza ed efficacia clinica, rappresentano oggi la strategia emergente nell'ambito della medicina della riproduzione.

L'applicazione e lo sviluppo di tali tecniche deve essere accompagnato dall'impegno continuo da parte della comunità scientifica verso la standardizzazione e validazione dei processi per la prevenzione dei rischi ad esse correlati.

L'implementazione, il mantenimento e il miglioramento continuo di un sistema di Gestione della

Qualità e Sicurezza consentono il perseguimento di strategie organizzative che permettono il raggiungimento della conformità alle prescrizioni di legge e promuovono una continua crescita in termini di qualità, sicurezza ed efficienza dell'applicazione clinica di tali tecniche.

#### BIBLIOGRAFIA:

- 1) Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L “Revised guidelines for good practice in IVF laboratories”, Hum Reprod 2008; 23: 1253-1262.
- 2) Mortimer and Mortimer “Quality and Risk Management in the IVF Laboratory
- 3) Bielanski A and Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. Hum Reprod 2009; 24: 2457-2467.
- 4) Tomlinson M. Risk management in cryopreservation associated with assisted reproduction. Cryo Letters 2008; 29: 165-174.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Benifla JL, Letur- Konirsch H, Collin G, Devaux A, Kuttan F, Madelenat P, Brun Vezinet 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.
- 9) Letur – Konirsch H, Collin G, Sifer C, Devaux A, Kuttan F, Madelenat P, Brun Vezinet 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.
- 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) Grount BW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapor as a risk factor in pathogen transfer. Theriogenology 2009; 71: 1079-1082.
- 13) Cobo A, Remohì J, Chang CC, Nagy ZP. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. Reprod Biomed Online 2011; 23:341-346.
- 14) Cobo A, Kuwayama M, Pèrez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocyte vitrified by the Cryopot method. Fertil Steril 2008; 89: 1657-1664.
- 15) Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, Colamaria S, Capalbo A, Sapienza F, Vajta G, Rienzi L. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. Hum Reprod 2010; 25: 1199-1205.
- 16) Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocyte results in high survival rate and healthy deliveries. Reprod Biomed Online 2007; 14: 72-79.
- 17) Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. RBM Online 2011; article in press.
- 18) Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D. 2010. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. Fertil. Steril. 94, 1181-1188.