

**- Attività di ricerca.**

La legge n. 40/2004 all'art. 2, comma 1, stabilisce che il Ministro della Salute, sentito il Ministro dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, può promuovere ricerche sulle cause patologiche, psicologiche, ambientali e sociali dei fenomeni della sterilità e della infertilità e favorire gli interventi necessari per rimuoverle, nonché per ridurne l'incidenza, può incentivare gli studi e le ricerche sulle tecniche di crioconservazione dei gameti e può altresì promuovere campagne di informazione e di prevenzione dei fenomeni della sterilità e della infertilità.

Per le finalità di studio e ricerca sono state stanziate le somme di Euro 500.000,00 sul capitolo 3174 ed Euro 500.000,00 sul capitolo 3408, per gli anni 2004 e 2005, e le somme di Euro 405.000,00 sul capitolo 3174 ed Euro 500.000,00 sul capitolo 3408, per l'anno 2006. Queste risorse sono state assegnate all'Istituto Superiore di Sanità per eseguire progetti di ricerca.

In applicazione del suddetto art. 2, comma 1, della legge n.40/2004, è stato emanato il D.M. 4 agosto 2004, pubblicato nella G. U. 26 agosto 2004, n. 200, con il quale, tra l'altro, viene affidato – con apposita convenzione – all'Istituto Superiore di Sanità (I.S.S.) il compito di: a) definire il numero e la localizzazione degli embrioni abbandonati da trasferire per la crioconservazione; b) contattare i centri detentori degli embrioni abbandonati ai fini del trasferimento al Centro trasfusionale e di immunologia dei trapianti dell'Ospedale Maggiore di Milano e della conservazione di tutti i dati clinici inerenti ciascun embrione trasferito; c) attivare allo scopo il predetto Centro trasfusionale e di immunologia dei trapianti dell'Ospedale Maggiore di Milano.

Per tale scopo è stata assegnata all'I.S.S. la somma di Euro 50.000,00.

Specifici elementi al riguardo sono stati riportati nella Relazione al Parlamento --Anno 2005 - a cui si rimanda.

Lo stesso D.M. affida altresì – mediante la stipula di apposita convenzione - al Centro trasfusionale e di immunologia dei trapianti dell'I.R.C.C.S. “Ospedale Maggiore” di Milano il compito di effettuare studi e ricerche sulle tecniche di crioconservazione dei gameti e degli embrioni ivi conservati. Per tale scopo è stata assegnata all'Ospedale Maggiore la somma di euro 400.000,00.

La somma residua di Euro 550.000,00 è stata trasferita all'I.S.S., sempre ai sensi del D.M. 25 novembre 2004, ed utilizzata per lo svolgimento delle ricerche di seguito descritte.

Le somme stanziate per il 2005 ed il 2006 – Euro 1.000.000,00 complessivi per il 2005 ed Euro 905.000,00 complessivi per il 2006 – sono state impegnate a favore dell'I.S.S., riservando l'identificazione dei criteri e delle procedure per la distribuzione di dette risorse ad un successivo atto. Sono attualmente in corso intese con il dipartimento della prevenzione e della comunicazione

per definire un programma organico di utilizzo dei finanziamenti in questione da sottoporre all'attenzione del Ministro.

**Biobanca Nazionale.** La Biobanca Nazionale è stata formalmente costituita a seguito del Decreto del Ministro della Salute del 4 agosto 2004 presso il Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Dipartimento di Medicina Rigenerativa dell'Ospedale Maggiore di Milano, dal gennaio 2005 Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena. Il nome "Biobanca Nazionale" è stato successivamente modificato in "Biobanca Italiana", in analogia alla terminologia adottata in altri Paesi.

Il Decreto Ministeriale 4 agosto 2004 ha assegnato a questa struttura il compito di conservare gli embrioni criopreservati per i quali sia stato accertato lo stato di abbandono presso i centri di Procreazione Medicalmente Assistita, tramite un censimento coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. La sala criobiologica degli embrioni è stata inaugurata il 16 dicembre 2005. L'impianto è ora predisposto al ricevimento degli embrioni criopreservati, sulla base delle indicazioni che verranno inviate dall'Istituto Superiore di Sanità.

Come riportato nella Relazione al parlamento - Anno 2005 - , e coerentemente a quanto prescritto dal decreto ministeriale 4 agosto 2004, gli operatori della Biobanca Italiana hanno sviluppato, parallelamente all'adeguamento dell'area criobiologica, un progetto di ricerca, finanziato con i fondi previsti dal medesimo decreto, intitolato 'Progetto di ricerca sulla determinazione della qualità ovocitaria e sulla criopreservazione degli ovociti', in collaborazione con il Prof. Fulvio Gandolfi della Facoltà di Medicina Veterinaria, Istituto di Anatomia degli Animali Domestici dell'Università degli Studi di Milano e con il Prof. Guido Ragni del Dipartimento di Ostetricia, Ginecologia e Neonatologia della Fondazione.

Il progetto, che ha avuto avvio l'1 aprile 2004, si compone di tre parti:

- Ricerca di marcatori molecolari di qualità ovocitaria
- Miglioramento del protocollo di congelamento di ovociti umani
- Studio dell'attività mitocondriale (parte del progetto successivamente modificata, vedi di seguito)

Gli studi sviluppati e i risultati finora raccolti sono descritti di seguito.

*1) Ricerca di marcatori molecolari di qualità ovocitaria*

(Prof. Fulvio Gandolfi, Laboratorio di Embriologia dell'Istituto di Anatomia degli Animali Domestici, Università degli Studi di Milano).

A questa unità è stato assegnato il compito di individuare marcatori molecolari che consentano l'identificazione degli ovociti col maggiore potenziale di sviluppo, correlando i livelli di alcuni geni specifici espressi nelle cellule del cumulo ooforo, con la potenzialità del singolo ovocita di essere fecondato e di generare un embrione "trasferibile". Come previsto dal progetto, è stata valutata l'espressione dei geni Gremlin-1 e Pentraxin-3 mediante la tecnica della PCR semi-quantitativa.

Come primo passo sono stati disegnati primers specifici, e ne è stata provata la specificità e l'efficienza di amplificazione. Dato che il numero delle cellule varia in ogni cumulo ooforo è stato necessario mettere a punto una serie di procedure per la normalizzazione dei risultati mediante la valutazione di due parametri complementari:

- valutazione del numero di cellule di ogni cumulo mediante la quantificazione del DNA, estratto contemporaneamente all'RNA;
- valutazione del livello di trascrizione generale mediante la quantificazione del gene "house-keeping" 28S.

Per la messa a punto dei due parametri descritti sopra si sono raccolti 5 gruppi di cumuli e si sono poi realizzate diluizioni seriali dell'RNA estratto. Si è poi verificata la linearità delle quantificazioni ottenute. I risultati conseguiti hanno permesso di determinare le condizioni di estrazione e di amplificazione che consentano di misurare accuratamente il livello di espressione di ogni singolo cumulo. Terminata questa fase preliminare, necessaria per validare l'uso di questa metodica col materiale in esame, si è passati ad analizzare i cumuli di pazienti sottoposte alla procedura di fecondazione assistita. Alla data del 31 dicembre 2005 erano stati analizzati 26 cumuli di 9 pazienti.

Al 31 dicembre 2006 sono stati analizzati 82 cumuli di cui 32 provenienti da COCs (cumulus cell oocyte complexes) con giudizio morfologico positivo e 50 provenienti da COCs con giudizio morfologico negativo. Mediante la tecnica della PCR semi-quantitativa è stata valutata l'espressione dei geni Gremlin-1 (GREM) e Pentraxin-3 (PTX) in cellule del cumulo provenienti da pazienti sottoposte alla procedura di fecondazione assistita.

I risultati sono stati espressi in termini di quantità relativa del gene considerato rispetto al gene "house-keeping" 28S preso come riferimento.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato un test non parametrico, il Mann-Whitney rank sum test (SigmaStat 3.1 software), in quanto si tratta di campioni estratti da una popolazione non distribuita normalmente.

E' stato così possibile osservare differenze significative tra l'espressione di GREM in cellule provenienti da COCs con giudizio morfologico positivo (Giudizio 1) e in cellule provenienti da COCs con giudizio morfologico negativo (Giudizio 0). In particolare, i livelli di GREM risultano essere più elevati in cellule provenienti da COCs con giudizio morfologico positivo. Lo stesso risultato è stato ottenuto analizzando solo i cumuli ottenuti da COCs i cui ovociti sono stati fecondati.

Al contrario, l'analisi condotta sull'espressione di PTX non ha evidenziato differenze significative tra i due tipi di cumuli presi in esame.

Si è pensato poi di estendere lo studio dell'espressione genica ad altri geni che potrebbero essere in relazione con il corretto sviluppo dell'ovocita.

Allo scopo, si è pensato di disegnare ulteriori primers specifici per geni espressi a livello delle cellule del cumulo, la cui presenza può essere correlata alle caratteristiche morfologiche e fisiologiche

dell'ovocita (McKenzie et al., 2004). Un esempio di tali geni è HAS2 (hyaluronan synthase 2), gene associato alla matrice extracellulare ricca in acido ialuronico che si forma durante l'espansione del cumulo.

Sono state quindi determinate le condizioni di amplificazione che consentano di determinare accuratamente il livello di espressione di tale gene in ogni singolo cumulo.

E' stato così possibile osservare che i livelli di HAS2 risultano essere più elevati in maniera significativa in cellule provenienti da COCs con giudizio morfologico positivo. Lo stesso risultato è stato ottenuto analizzando solo i cumuli ottenuti da COCs i cui ovociti sono stati fecondati.

Nel corso dell'anno successivo si procederà con l'analisi di cellule del cumulo isolate da ulteriori ovociti dando particolare precedenza a quelli effettivamente fecondati per ampliare la popolazione sperimentale e rafforzare quindi la validità statistica dei risultati al fine di terminare la stesura di un manoscritto da sottomettere ad una rivista internazionale del settore.

## 2) *Miglioramento del protocollo di congelamento di ovociti umani*

(Prof. Guido Ragni, Centro per la Fecondazione Assistita, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena).

Il progetto "Miglioramento del protocollo di congelamento di ovociti umani" ha completato la fase preliminare di messa a punto delle nuove metodiche di vitrificazione. In particolare è stata valutata accuratamente la bibliografia disponibile, pur esigua, riguardante la vitrificazione degli ovociti e grazie anche al contributo di esperti internazionali è stato stabilito un protocollo di vitrificazione da comparare alla metodica di congelamento lento attualmente in uso nella maggior parte dei laboratori di procreazione medicalmente assistita. Si è acquisita manualità nelle particolari manovre di vitrificazione, nella preparazione dei terreni di crioconservazione e nella gestione del materiale necessario. In seguito alla predisposizione della documentazione relativa al protocollo e dopo aver ottenuto il consenso informato alla donazione dei gameti a scopo di ricerca da parte delle prime pazienti, si è provveduto ad effettuare le prove di fattibilità biologica. Le prove di sopravvivenza al protocollo di vitrificazione sono state condotte su 40 ovociti; il risultato è stato di 33 ovociti sopravvissuti su 40 (tasso di sopravvivenza particolarmente elevato: 33/40=82.5%).

In data 29 novembre 2005 si è iniziato a reclutare le pazienti e a randomizzare gli ovociti donati nei due trattamenti previsti di "vitrificazione" e "congelamento lento". Al 10 marzo 2006, 29 pazienti hanno sottoscritto il consenso informato e donato in totale 135 ovociti per la valutazione comparativa della competenza di sviluppo con il metodo dell'attivazione partenogenetica dopo scongelamento/devitrificazione. I risultati preliminari ottenuti dall'attivazione di 50 ovociti non mostrano differenze statisticamente significative tra le metodiche a confronto; i dati saranno presto ampliati con la conclusione del reclutamento, rivelatosi difficoltoso e quindi prolungato rispetto ai tempi previsti, e con l'attivazione dei restanti ovociti. La messa a punto del protocollo di vitrificazione ha mostrato inequivocabili vantaggi procedurali rispetto al congelamento lento: in particolare il minor

tempo richiesto e la maggiore praticità d'esecuzione della vitrificazione permettono di considerarne positiva una resa in termini di sopravvivenza e potenziale di sviluppo almeno pari a quella del congelamento lento. Il modello di attivazione partenogenetica su ovociti congelati si è rivelato affidabile per i primi tre giorni di sviluppo dei partenoti, trascorsi i quali la frammentazione cellulare, che interviene invariabilmente nei due gruppi, non permette di effettuare valutazioni comparative. L'analisi finale dei dati sarà condotta immediatamente dopo il raggiungimento di 200 ovociti reclutati in totale, richiedendo una modesta proroga dei termini inizialmente prefissati.

### 3) *Studio dell'attività mitocondriale*

Questa parte del progetto non è stata realizzata in quanto gran parte degli ovociti non fecondati è stata sottoposta a crioconservazione a scopi clinici e quindi non è stato possibile recuperare materiale a scopo sperimentale. In base ai risultati ottenuti con l'analisi del cumulo ooforo che ha fornito delle indicazioni precise sulla correlazione tra i livelli di espressione di GREM e di HAS e la capacità di sviluppo degli ovociti ci si propone di sostituire l'analisi mitocondriale con uno studio volto a rendere applicabile in campo clinico i risultati fin qui ottenuti. La metodica fin qui utilizzata, infatti, si basa sull'analisi semiquantitativa dei livelli di mRNA. Malgrado i risultati indichino una forte correlazione tra livelli di espressione e competenza degli ovociti tale analisi può essere svolta solo retrospettivamente a cause dei tempi tecnici troppo lunghi per dare all'embriologo clinico una valutazione qualitativa degli ovociti. L'intervallo tra la raccolta degli ovociti e la loro fecondazione, infatti, non può superare le 4-5 ore a fronte delle 48 ore necessarie per ottenere un responso con le metodiche utilizzate finora. Ci si propone quindi di sviluppare e validare dei metodi alternativi che siano compatibili con questi intervalli operativi in modo da potere fornire un ulteriore parametro obiettivo che consenta una migliore selezione degli ovociti stessi.

**Istituto Superiore di Sanità.** All'Istituto Superiore di Sanità sono stati assegnati i due seguenti progetti di ricerca.

Primo progetto di ricerca: “*Valutazione dell'efficienza clinica della crioconservazione di oociti e sviluppo di nuovi protocolli di crioconservazione*”.

E' uno studio multicentrico al quale partecipano dieci strutture cliniche che applicano tecniche di riproduzione assistita in varie regioni italiane e due laboratori di riferimento per lo studio morfologico ed ultrastrutturale degli oociti crioconservati. Per quanto riguarda la parte clinica dello studio, sono state valutate le seguenti variabili in relazione al diverso protocollo di congelamento oocitario applicato:

- percentuale di sopravvivenza oocitaria allo scongelamento;
- percentuale di fecondazione post scongelamento;
- percentuale di transfer effettuati sugli oociti scongelati;
- percentuali di gravidanze ottenute ed esiti delle stesse;

Nelle varie unità partecipanti al progetto sono stati applicati diversi protocolli di crioconservazione di oociti. Nei laboratori di riferimento è stato eseguito lo studio morfologico del fuso meiotico tramite Fluorescenza e Microscopia Confocale con Laser Scanner (CLSM). L' analisi mirava a caratterizzare il fuso meiotico dell'oocita post scongelamento, per evidenziarne eventuali anomalie cromosomiche. Tutte le osservazioni sono state eseguite in "Blind" per non influenzare l'osservatore che non conoscerà né il Centro di provenienza dell'oocita analizzato né la tecnica utilizzata per il congelamento. I risultati di questo studio sono stati pubblicati in due articoli scientifici: "Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation", Human Reproduction, luglio 2006; 21(7):1771-6. E-pub 20 marzo 2006. - "Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations", Human Reproduction, aprile 2007; 22(4): 1123-33. E-pub 11 dicembre 2006. Lo studio è ancora in corso.

Secondo progetto di ricerca: *"Studio sull'efficacia e sicurezza delle tecniche di Procreazione Medicalmente assistita: comparazione dei cicli effettuati, dei risultati ottenuti e degli esiti dell'applicazione di tali tecniche prima e dopo l'entrata in vigore della legge n. 40/2004"*.

E' stato effettuato uno studio basato sui cicli singoli per comparare un set di dati provenienti da cicli di trattamento di procreazione medicalmente assistita, raccolti da una ricerca eseguita nel 2003 ed un altro set di dati raccolti nel 2006 (su dati retrospettivi riferiti all'attività dell'anno 2005), dopo l'emanazione e l'entrata in vigore della legge n. 40/2004. Nel 2003, infatti, è stato eseguito uno studio coordinato dall'ISS, che vedeva coinvolti 10 dei maggiori Centri Italiani, pubblici e privati, che applicavano tecniche di PMA, che ha raccolto dati per effettuare una valutazione sull' efficacia, sulla sicurezza e sugli esiti di tali tecniche. Il proseguimento di tale studio, che ha coinvolto gli stessi Centri per una raccolta dei dati successiva all'entrata in vigore della Legge n. 40/2004, ha consentito di comparare in maniera ottimale le diversità riscontrate nelle variabili prese in esame. Hanno partecipato allo studio 10 centri di procreazione medicalmente assistita, molti dei quali hanno già partecipato allo studio precedente, previa adesione al nuovo protocollo. I centri sono stati selezionati sulla base dei seguenti criteri:

- numero di cicli effettuati e donne trattate nell'ultimo anno;
- effettuazione di crioconservazione di embrioni e/o ovociti;
- area geografica;
- equa ripartizione tra strutture pubbliche e private;
- competenza e affidabilità scientifica.

Nel corso di 10 mesi sono state arruolate tutte le donne che si rivolgevano ai centri e alle quali è stato effettuato un ciclo di trattamento. Gli obiettivi raggiunti dallo studio sono stati:

- valutazione dell'efficacia e la sicurezza delle varie tecniche di procreazione medicalmente assistita, prima e dopo l'entrata in vigore della Legge n. 40/2004;
- confronto dei risultati osservati con uso di embrioni non crioconservati, crioconservati o embrioni ottenuti da ovociti crioconservati;
- valutazione delle complicatezze delle terapie sulla donna e gli esiti neonatali (gravidanze plurime, basso peso alla nascita, parto pretermine, malformazioni, anomalie genetiche);
- validazione del software per l'immissione e il controllo dei dati che verrà utilizzato per la raccolta dati del Registro nazionale;
- analisi e valutazione dell'esito delle gravidanze iniziate nelle donne che si sono rivolte ai centri partecipanti allo studio nei primi 6 mesi;
- valutazione del benessere e la salute dei nati da tecniche di PMA, con un follow-up a distanza nelle due diverse raccolte dei dati 2003-2006.

L'analisi dei dati da parte dell'ISS ha considerato, per ciascuna tecnica di PMA utilizzata, i seguenti indicatori:

- % delle gravidanze iniziate e dei nati sul totale dei cicli,e dei trasferimenti effettuati e sul totale delle donne trattate;
- % di gravidanze multiple;
- % di complicatezze per la donna;
- % di esiti neonatali negativi (indice di apgar, pretermine, basso peso alla nascita, malformazioni).

Nell'analisi si stanno considerando i principali fattori di confondimento, quali età della donna, storia riproduttiva, malattie organiche e si stanno confrontando i risultati ottenuti negli anni 2003-2005. Al momento i dati raccolti sono stati già analizzati ed i risultati verranno divulgati a breve. Infatti sono state già avviate le procedure per pubblicarli in una rivista scientifica di rilievo nazionale e/o internazionale.

L'Istituto Superiore di Sanità, in ottemperanza ai compiti affidati dal D.M. 4 agosto 2004 (definire il numero e la localizzazione degli embrioni crioconservati in stato di abbandono) ha avviato un censimento nazionale suddiviso in due fasi:

- Una prima fase riguardante il censimento e la localizzazione di quegli embrioni definiti "in stato di abbandono" secondo l'art. 1, comma 2, lettera a, del menzionato decreto: "il centro che effettua tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) acquisisce la rinuncia scritta al futuro impianto degli embrioni crioconservati da parte della coppia di genitori o della singola donna";

– Una seconda fase riguardante il censimento degli embrioni crioconservati definiti “in stato di abbandono” secondo l’art. 1. comma 2, lettera b, dello stesso decreto: “il centro che effettua tecniche di PMA documenta i ripetuti tentativi eseguiti, per almeno un anno, di ricontattare la coppia o la donna che ha disposto la crioconservazione degli embrioni; solo nel caso di reale, documentata impossibilità a rintracciare la coppia, l’embrione potrà essere definito come abbandonato”.

Per eseguire sia la prima che la seconda fase del censimento sono state utilizzati due specifici moduli inviati a tutti centri interessati al censimento.

La prima fase del censimento, al di là di eventuali aggiornamenti, può ritenersi conclusa a febbraio 2007, con la seguente situazione.

Per quanto riguarda la prima tipologia degli embrioni in stato di abbandono (art. 1. comma 2, lettera a) entro febbraio 2007 si è ottenuta una risposta del 100% degli 88 centri censiti.

Dei centri rispondenti 6 hanno dichiarato di non avere embrioni crioconservati in assoluto. Dopo febbraio del 2006 altri 2 centri hanno comunicato di non essere più operativi trasferendo i propri embrioni ad altri centri. Per questi 8 centri il censimento è stato dichiarato definitivamente concluso.

Degli 80 centri rimanenti che hanno dichiarato di avere embrioni crioconservati, 54 (67,5%) hanno dichiarato di avere embrioni crioconservati in stato di abbandono, mentre i restanti 26 centri (32,5%), ad oggi hanno dichiarato di non avere embrioni crioconservati in stato di abbandono.

Pertanto il totale degli embrioni crioconservati in stato di abbandono (art. 1. comma 2, lettera a) risulta pari a 3415, appartenenti a 825 coppie.

Il grafico 1.1.1 mostra la distribuzione regionale degli embrioni crioconservati in stato di abbandono, ai sensi dell’art. 1. comma 2, lettera a) del decreto 4 agosto 2004.

**Grafico 1.1.1 - Distribuzione regionale degli embrioni crioconservati in stato di abbandono secondo l'art. 1, comma 2, lettera a, del decreto ministeriale del 4 agosto 2004:**



La seconda fase del censimento (art. 1., comma 2, lettera b), relativa ai dati raccolti sulla seconda tipologia di embrioni crioconservati in stato di abbandono (cioè quegli embrioni per i quali, dopo più di un anno di documentati tentativi da parte dei centri di PMA di rintracciare le coppie di genitori o le donne a cui gli embrioni appartengono, questi tentativi non abbiano dato alcun esito) il censimento è ancora in corso.

Questa seconda tipologia di embrioni definiti in stato di abbandono, prevede dei tempi di censimento ovviamente più lunghi, giacchè i Centri stanno ancora eseguendo i tentativi di rintracciare le coppie che non hanno finora risposto.

Comunque, allo scopo di censire il numero di embrioni crioconservati rimanenti nei centri di PMA, è già stata avviata una nuova e pressante richiesta di dati, al momento con risultati ancora molto parziali ed in continuo aggiornamento.

Entro febbraio 2007, anche in questa seconda fase, degli 80 Centri che in precedenza avevano dichiarato di avere embrioni crioconservati il 100% di questi Centri hanno dichiarato di avere embrioni crioconservati.

Degli i 80 Centri:

- 31 Centri hanno dichiarato di non avere altri embrioni crioconservati in assoluto e 1 Centro ha comunicato di non essere più operativo trasferendo i propri embrioni ad un altro Centro. Per questi 32 Centri il censimento si può dichiarare concluso. Considerando che nella fase precedente altri 8 centri avevano concluso definitivamente il censimento, possiamo dire che ad oggi in totale 40 centri hanno concluso in modo definitivo il censimento;
- I rimanenti 48 Centri rispondenti dicono di avere ancora embrioni crioconservati, e dichiarano di aver realizzato ripetuti tentativi, per almeno un anno, di ricontattare le coppie o le donne che hanno disposto la crioconservazione di questi embrioni;
- Nel caso di 1499 coppie, a cui appartengono un totale di 6079 embrioni crioconservati, fino ad ora i Centri non sono riusciti a contattarle e sono ancora in corso, in alcuni casi, i tentativi di rintracciarle.

Il Decreto Ministeriale del 4 agosto 2004, all'art. 2, comma 2, prevede che gli embrioni crioconservati definiti in stato di abbandono, censiti e localizzati dall'Istituto Superiore di Sanità devono essere trasferiti alla Biobanca Nazionale, situata presso il Centro trasfusionale ed immunologia dei trapianti dell'IRCCS "Ospedale Maggiore" di Milano.

Dal D.M. 4 agosto 2004 non si evince chi debba trasferire gli embrioni crioconservati. In questo D.M. infatti, non si dà l'incarico formale a nessun ente o struttura per il trasferimento degli embrioni crioconservati in stato di abbandono né vengono allocate risorse per effettuare il trasferimento stesso. Nell'eventualità che questo compito venga affidato all'Istituto Superiore di

Sanità è stato predisposto un protocollo operativo per svolgere tale incarico ed elaborata una scheda di raccolta dati per indagare quali fossero le tipologie di contenitori utilizzati dai Centri di procreazione assistita per crioconservare gli embrioni. La realizzazione di questa scheda è stata fatta da un gruppo di lavoro composto da esperti di embriologia e criobiologia della Biobanca dell’Ospedale Maggiore di Milano e dell’Istituto Superiore di Sanità.

La scheda è stata inviata nel gennaio del 2006 a tutti gli 88 centri che hanno dichiarato di avere embrioni crioconservati e compilata da 31 Centri (pari al 35,2% del totale).

Sono state poi da parte dell’ISS, con esperti di embriologia e criobiologia e con i referenti di ditte di trasporto di materiale biologico, individuate le modalità più idonee e le procedure più sicure da adottare per il successivo trasporto degli embrioni crioconservati in stato di abbandono.

In considerazione quindi della mancata definizione dello stato di abbandono degli embrioni crioconservati in ancora 48 centri si propone di attendere i risultati definitivi per effettuare il trasferimento di tutti gli embrioni crioconservati in stato di abbandono presso la Biobanca di Milano. Il Ministero della Salute, garantendo la necessaria copertura economica, eventualmente anche con fondi propri dell’Amministrazione, formalizzerà l’incarico per il trasferimento degli embrioni attraverso una specifica convenzione con l’Istituto Superiore di Sanità.

#### **- Campagne di informazione e prevenzione**

La legge n. 40/2004 all’art. 2, comma 1, prevede la promozione di campagne di informazione e prevenzione dei fenomeni della sterilità e della infertilità.

Con D.M. 21 dicembre 2005 è stata impegnata la somma di Euro 1.000.000,00, ed è stato quindi stipulato un accordo di collaborazione tra il Ministero della Salute e l’Istituto Italiano di Medicina Sociale per la realizzazione di un progetto di comunicazione finalizzato a orientare adolescenti e giovani verso stili di vita e comportamenti corretti, allo scopo di prevenire cause di infertilità e sterilità e promuovere, presso i giovani, il valore dell’assunzione del ruolo genitoriale.

Con D.M. 28 dicembre 2006 è stata impegnata la somma di Euro 810.000,00, relativa alle risorse dell’anno finanziario 2006 ed è stato stipulato un accordo di collaborazione con l’Istituto Superiore di Sanità per la realizzazione di una campagna di informazione e di prevenzione dei fenomeni della sterilità e dell’infertilità.

#### **- Fondo per le tecniche di procreazione medicalmente assistita**

La legge n. 40/2004 all'art. 18 ha istituito, presso il Ministero della Salute, il Fondo per le tecniche di procreazione medicalmente assistita, al fine di favorire l'accesso alle suddette tecniche da parte delle coppie, che possono accedervi ai sensi dell'art. 5, comma 1 della stessa legge.

Tale Fondo, previsto nel Bilancio di previsione del Ministero della Salute dal capitolo 2440 “Somme da erogare alle Regioni ed alle Province di Trento e Bolzano per le tecniche di procreazione medicalmente assistita”, annualmente pari a Euro 6.800.000=, è ripartito tra le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano in base al disposto del D.M. 9 giugno 2004, pubblicato nella G.U. del 29 settembre 2004, n. 229.

I fondi assegnati relativi all'anno 2006, così come stabiliti e ripartiti con D.M. 9 giugno 2004, sono stati trasferiti alle Regioni e Province Autonome, in una unica soluzione, con D.D. 28 marzo 2006.

## **1.2 Azioni delle Regioni e delle Province Autonome di Trento e di Bolzano**

Nella presente sezione vengono descritte le iniziative e le attività realizzate con le quote di riparto del Fondo per le tecniche di procreazione medicalmente assistita, assegnate alle singole Regioni e Province Autonome, sulla base degli elementi forniti dalle seguenti Regioni.

La **Regione Piemonte** ha attuato, per il secondo anno, il riparto dei fondi con provvedimento dirigenziale del 14 novembre 2006 n° 268.

I fondi sono stati erogati ai servizi pubblici di PMA che effettuano il 2° /3° livello per il potenziamento dell'attività al fine di ridurre le liste di attesa e pertanto sono destinati ad acquisire personale attraverso borse di studio o altro. Ciò in quanto le strutture in questione sono già adeguate ai requisiti di cui alle normative vigenti.

I Centri finanziati sono quattro:

- Centro di "Prevenzione e terapia della subfertilità e sterilità di coppia", dell'Azienda Ospedaliera OIRM/SANTANNA di Torino
- Centro di "Medicina della riproduzione", Università degli Studi di Torino
- Centro di Fisiopatologia della riproduzione e sterilità di coppia, dell'Azienda Sanitaria Locale 3 - Presidio Ospedaliero Maria Vittoria di Torino
- Centro di procreazione medicalmente assistita, dell'Azienda Sanitaria Locale 17 - Presidio Ospedaliero di Fossano (CN)

L'entità della cifra è di € 121.038,25 per ciascun Servizio. Dalle relazioni trasmesse dalle Aziende Sanitarie sopra citate emerge che le medesime si sono attivate per l'utilizzo dei fondi di cui sopra.

La **Regione Valle d'Aosta** ha trasferito interamente il finanziamento assegnato ai sensi della legge n. 40/2004 all'unica Azienda Sanitaria Locale per le spese di funzionamento del Centro di sterilità

presente nel presidio ospedaliero regionale. Il Finanziamento è stato utilizzato per l'acquisto di una stazione di lavoro K-System completa di accessori ed illuminatore.

La **Regione Lombardia**, con l'assegnazione della quota di ripartizione, ha provveduto ad individuare le strutture autorizzate all'applicazione delle procedure, sulla base della DGR 16 febbraio 2005 – 7/20790 “Determinazioni per l'attuazione dell'art. 10 della legge 19 febbraio 2004 – N. 40, recante le norme per la procreazione medicalmente assistita” e del Decreto del Direttore Generale della Direzione Generale Sanità 6 giugno 2006 – N. 6295 “Definizione delle procedure autorizzative per le attività di procreazione medicalmente assistita”.

Inoltre, ai fini dell'impiego delle somme assegnate alle Regioni ai sensi dell'art. 18 del provvedimento, con la DGR 7 novembre 2006 – N. 8/3462 la Giunta regionale ha stanziato nell'ambito delle assegnazioni ricevute una quota pari a due milioni di euro per implementare studi e progetti innovativi riguardanti la procreazione medicalmente assistita, allo scopo di informare, sostenere e contribuire all'avanzamento delle modalità di gestione dei casi di infertilità e al miglioramento dell'assistenza alle coppie con problemi riproduttivi in Lombardia.

Il provvedimento dispone che sia promossa la realizzazione di studi e progetti finalizzati a favorire la gestione efficace e sicura dei casi di infertilità e le procedure che offrono l'assistenza migliore alle coppie. La progettazione dovrà tenere conto delle seguenti tematiche:

- la valutazione dell'efficacia e della sicurezza delle tecniche di procreazione medicalmente assistita mediante la comparazione dei dati dei cicli effettuati, dei risultati ottenuti e degli esiti dell'applicazione di tali tecniche nel 2003, nel 2004, nel 2005;
- l'analisi statistica e scientifica dei dati inseriti nel Registro nazionale della procreazione medicalmente assistita concernenti l'attività svolta nel primo semestre 2006;
- la presa in carico della coppia infertile con particolare attenzione alla componente relazionale ed emotiva che la problematica dell'infertilità e gli iter diagnostico-terapeutici comportano;
- il miglioramento della qualità dell'assistenza alla coppia infertile attraverso la definizione e l'applicazione di protocolli interni;
- la promozione di interventi di controllo della qualità.

La Direzione Generale Sanità prevede di pubblicare al riguardo apposito bando per la presentazione degli studi e dei progetti da vagliare e ammettere al finanziamento.

La Regione inoltre prevede di organizzare a Brescia un convegno aperto agli operatori e al pubblico sulla procreazione medicalmente assistita, per favorire la diffusione di conoscenze e di competenze tra i professionisti, consentendo loro di indirizzarsi verso le opzioni terapeutiche più appropriate e per facilitare l'accesso della coppia alle procedure, permettendo alle persone interessate di orientarsi

in modo più consapevole all'interno di percorsi assistenziali di peculiare complessità come quelli riguardanti la medicina riproduttiva.

La **Provincia Autonoma di Trento** nel corso del 2006, in base alle specifiche direttive approvate con deliberazione della Giunta provinciale n. 777 in data 21 aprile 2006 ha attivato presso l'Ospedale di Arco un centro di procreazione medicalmente assistita in grado di assicurare funzioni di primo, secondo e terzo livello.

I fondi previsti dalla legge 40/2004, per l'anno 2006, sono stati assegnati all'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, come finanziamento specifico per l'attivazione del predetto centro di procreazione medicalmente assistita, i cui oneri sono risultati pari a circa 540 mila euro.

In particolare nel corso del 2006 il centro ha eseguito le seguenti attività:

Settore diagnostico: n. 293 visite primi colloqui, n. 178 secondi colloqui, n. 98 ecografie transvaginali diagnostiche, n. 30 laparoscopie, n. 62 isteroscopie, n. 70 iterosalpingografie;

Settore terapeutico: Sono stati eseguiti 80 cicli di primo livello (di cui 7 sotto cut off) e 78 cicli di secondo livello (FIVET o FIVET – ICSI).

Complessivamente sono state accettate dal Centro circa 300 coppie, che si trovano in varie fasi di diagnosi e terapia. Si rileva inoltre che 35 pazienti hanno avviato una gravidanza, 5 per procedure di primo livello, 15 per procedure di secondo livello, 15 per farmacoterapia, dopo interventi su tube o utero o spontaneamente.

I tempi di attesa sono attualmente di 8 mesi per un colloquio di ammissione, 2 mesi per il secondo colloquio, 3 mesi per un ciclo FIVET, mentre non vi sono attese per i cicli di primo livello.

La **Regione Veneto**, , previa una attenta analisi e valutazione dei programmi di utilizzo delle risorse, finalizzati a favorire l'accesso della popolazione alle tecniche di procreazione medicalmente assistita, presentati dalle strutture pubbliche e private preaccreditate autorizzate ad erogare prestazioni di PMA con oneri a carico del SSN, ha individuato quali beneficiari del finanziamento di cui all'art. 18 della Legge n. 40/2004, sette Aziende ULSS (Belluno, Vicenza, Alto Vicentino, Treviso, Venezia, Alta Padovana, Rovigo), l'Azienda Ospedaliera di Padova e due soggetti privati accreditati (Case di Cura).

Nell'ambito delle principali azioni programmate da tali strutture per favorire l'accesso alle tecniche surrichiamate, con contestuale riduzione delle liste di attesa, si evidenzia:

- l'implementazione dell'offerta assistenziale, oltre che mediante l'assunzione di personale dedicato, anche mediante il ricorso della singola struttura all'acquisto di prestazioni aggiuntive da proprio personale, prevalentemente infermieristico.
- la promozione di eventi formativi specialistici rivolti al personale coinvolto nell'attività di fecondazione assistita;

- il potenziamento strumentale con l’obiettivo di intervenire positivamente nella riduzione dei tempi di attesa con contestuale ottimizzazione della qualità della prestazione lavorativa;

La Regione del Veneto con decreto dirigenziale n. 114 del 22 dicembre 2005 ha impegnato e liquidato le prime due tranches del finanziamento, relative agli anni 2004-2005, subordinando la liquidazione della terza tranne alla avvenuta realizzazione dei progetti formulati dalle summenzionate strutture, ed ha invitato la singola struttura a presentare apposita e dettagliata relazione illustrante l’attività svolta nel periodo 2004-2006, corredata dalla rendicontazione delle spese a tal fine sostenute.

La **Regione Friuli Venezia Giulia** con deliberazione della Giunta regionale 22 dicembre 2006, n. 3163, ha approvato le “Linee annuali per la gestione del servizio sanitario regionale nel 2007”, che, in merito all’utilizzo della quota di riparto delle somme relative al Fondo per le tecniche di procreazione medicalmente assistita, prevedono:

- la prosecuzione dei percorsi di autorizzazione/accreditamento delle strutture pubbliche e private che erogano prestazioni di procreazione medicalmente assistita;
- la riorganizzazione dei Consultori familiari al fine di una maggiore integrazione delle attività, poste in essere dai medesimi, con i servizi sociali del Comune di cui alla legge quadro n. 328/2000. Le priorità per il 2007 sono, fra le altre, l’informazione alle coppie che ricorrono alle tecniche di riproduzione medicalmente assistita, l’attività di orientamento verso i centri che la praticano ed il raccordo operativo con i medesimi, come da progetto specifico che le aziende hanno predisposto per area.

Inoltre, con decreto del Direttore centrale salute e protezione sociale n. 935/Pren., del 30 ottobre 2006, è stato approvato il documento “Destinazione del finanziamento del fondo ex art. 18, L. 40/2004”, elaborato dal servizio Pianificazione sanitaria della su richiamata Direzione centrale, atto ad individuare i criteri di assegnazione del finanziamento in argomento, nonché le strutture beneficiarie del medesimo.

Con il decreto n. 935/Pren., poi, è stata contestualmente autorizzata, a favore delle strutture individuate nel su richiamato documento, la spesa prevista, il cui pagamento sarà autorizzato all’esito dell’istruttoria relativa ai progetti presentati, che ad oggi risulta ancora in corso.

La Regione Friuli Venezia Giulia in merito al percorso di autorizzazione/accreditamento delle strutture pubbliche e private che esercitano le attività di procreazione medicalmente assistita, con deliberazione giuntale 26 gennaio 2007, n. 106, ha approvato, in via provvisoria, i relativi requisiti e procedura.

**La Regione Toscana**, con delibera n. 710 del 9 ottobre 2006, dovendo prioritariamente assegnare per l'anno 2004 e 2005 le somme previste, ha assegnato le somme alle Aziende Sanitarie con i seguenti criteri di ripartizione:

- 70% delle somme da assegnare a tutte le Azienda USL sulla base del numero delle donne in età feconda che possono accedere alla PMA, ovvero comprese nella classe di età da 19 a 41 anni, come individuato nel nomenclatore tariffario regionale di cui alla DGR n. 86/2006;
- 30% della somma da assegnare alle Aziende USL sulla base delle prestazioni assicurate nell'anno 2004 e 2005.

Per l'anno 2006 la Regione Toscana prevede di procedere con successivo atto, tenuto conto del risultato dello studio in corso presso la Direzione Generale del Diritto alla Salute per la riorganizzazione delle strutture che effettuano l'attività in argomento.

**La Regione Abruzzo** destina le somme al potenziamento dei Centri di PMA pubblici autorizzati (Centro di PMA di I livello dell'U.O. di Ostetricia e Ginecologia del P.O. di Pescara, Centro di PMA presso le ASL di Chieti e di L'Aquila), anche al fine della riduzione dei tempi di attesa.

**La Regione Molise** ha assegnato la quota di riparto del fondo a favore dell'unico Centro di Procreazione di 3° livello, realizzato presso il Presidio Ospedaliero "A. Cardarelli" di Campobasso. Nell'anno 2006 nel citato Centro Regionale di PMA. sono stati effettuati n. 172 prime visite e prestazioni pari a n. 120 cicli di procreazione medicalmente assistita, consistenti in pick up ovocitari e transfer embrionali da parte dell'equipe multidisciplinare preposta all'attività, come risulta dai registri ambulatoriali e di sala operatoria e comunicato dal Centro medesimo.

Sono state, inoltre, svolte settimanalmente le consulenze specialistiche ed accertamenti (isteroscopia, isterosalpingografia etc.) necessarie per una diagnosi definitiva. Tale operatività del Centro Regionale di PMA ha consentito di soddisfare la domanda di salute riproduttiva del Molise e non solo, determinando una inversione di flussi di pazienti da altre Regioni. I risultati raggiunti sono stati soddisfacenti in termini percentuali di gravidanze e di livello organizzativo.

E' stata creata una equipe multidisciplinare di consulenza per l'espletamento dell'attività correlata al funzionamento del Centro composta da:

- Direttore del Centro Regionale di PMA, direzione clinica e scientifica del Centro, attività di supervisore nei vari ambulatori di medicina della riproduzione, attività clinica e chirurgica e coordinamento con la Direzione Generale Sanitaria del Centro Regionale di PMA;
- Responsabile delle Attività Diagnostico-Terapeutiche, attività clinica e chirurgica;
- Responsabile del laboratorio di biologia della riproduzione del Centro di PMA.