

		<p style="text-align: center;">CONSENSO INFORMATO PER TEST GENETICO PREIMPIANTO Clinica Ruesch- Codice Centro ISS 150063</p>
--	---	--

CONSENSO INFORMATO PER TEST GENETICO PRE-IMPIANTO (PGT)

La sottoscritta (partner femminile) _____
 Data di nascita _____ Luogo di nascita _____
 Residente a _____ Via _____
 Documento _____ Nr. _____
 Rilasciato il _____ da _____

Il sottoscritto (partner maschile) _____
 Data di nascita _____ Luogo di nascita _____
 Residente a _____ Via _____
 Documento _____ Nr. _____
 Rilasciato il _____ da _____

in previsione di sottoporci presso il Centro di PMA GENERA della Clinica Ruesch, Viale Maria Cristina di Savoia n39, 80122 Napoli, ad un ciclo fecondazione assistita IVF/ICSI (iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi) dichiariamo di avere preliminarmente effettuato uno/più colloqui con il/la Dott. _____ (Responsabile del trattamento di PMA) nel corso del/i quale/i siamo stati informati, in modo chiaro ed esaustivo, in merito ai seguenti punti:

I. Definizione dei ruoli e oggetto della collaborazione

Il Centro di PMA GENERA della Clinica Ruesch, ha richiesto il supporto specialistico del Laboratorio di Diagnosi molecolare IGENOMIX, sito in Marostica (VI) via Fermi 1, per l'ottimizzazione e l'espletamento di test molecolari su cellule embrionali per la diagnosi di alterazioni cromosomiche numeriche, strutturali sbilanciate o malattie monogeniche (test genetico pre-impianto PGT) al fine di fornire ai propri pazienti, su loro esplicita richiesta, informazioni sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire nell'utero, ai sensi dell'Art. 14 comma 5 della Legge 40/2004.

II. Definizione di test genetico preimpianto (PGT)

La PGT è un test genetico che si esegue sull'embrione pre-impianto ottenuto in laboratorio a seguito di una fecondazione in vitro, prima del suo trasferimento in utero. Per le coppie a rischio di produrre embrioni con alterazioni cromosomiche o affetti da malattie monogeniche, la PGT informa sullo stato di salute di ciascun embrione e permette di individuare gli embrioni anomali per l'analisi in considerazione.

Esistono tre tipologie di diagnosi molecolare: PGT-A (per aneuploidie dei cromosomi), PGT-M (per malattie monogeniche) e PGT-SR (per riarrangiamenti strutturali). Nel primo caso, si mira all'identificazioni di embrioni che presentano un numero normale di cromosomi (22 coppie di autosomi più due cromosomi sessuali), nel secondo caso di embrioni non affetti da una specifica malattia monogenica per cui la coppia presenta un rischio riproduttivo accertato, e nel terzo caso di embrioni privi di una specifica anomalia strutturale presente nel cariotipo parentale. Le tecnologie, ove necessario, possono essere applicate simultaneamente sulla medesima biopsia embrionale.

III. Indicazioni alla PGT-A (per aneuploidie)

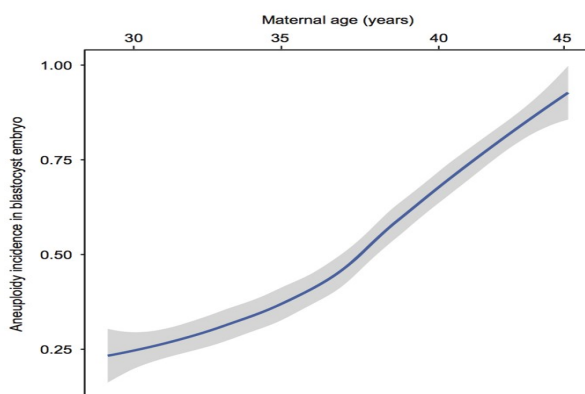
L'analisi delle anomalie numeriche dei cromosomi nel cariotipo embrionale è indicata in presenza delle seguenti condizioni (ESHRE guidelines: Goossens et al, Human Reproduction, 2009; Linee Guida SIGU, 2017):

- **Età riproduttiva della donna avanzata** (generalmente definita come > 35 anni);
- **Ripetuti aborti spontanei** (generalmente definita come > 2 aborti consecutivi);
- **Ripetuti fallimenti d'impianto** embrionale durante precedenti cicli di fecondazione assistita (generalmente definita dopo > 2 trasferimenti con assenza di impianto);
- Il fattore maschile severo è stato proposto, per cui però non si è ancora raggiunto un consensus internazionale. Nella nostra casistica, ad esempio, la presenza di un severo fattore maschile di infertilità non ha mostrato effetti sul tasso di euploidia al netto della produzione di almeno una blastocisti (Mazzilli, Cimadomo et al, Fertility and Sterility, 2017)

Per le indicazioni sopra citate, infatti, sono generalmente riscontrate aumentati tassi di insuccesso delle tecniche di fecondazione assistita e di abortività successivi al trasferimento embrionale, principalmente dovute alla produzione di embrioni cromosomicamente anomali (aneuploidi). La PGT-A permette di individuare le anomalie numeriche dei cromosomi consentendo alla coppia di evitare il trasferimento di embrioni aneuploidi. Qualora vengano trasferiti embrioni diagnosticati euploidi (con normale numero di cromosomi), le possibilità di ottenere una gravidanza sono significativamente aumentate (e il rischio di aborto si riduce di 2-3 volte) (Dahdouh et al, Fertility and Sterility 2015; Chen et al, Plos one 2015). Inoltre, considerata l'elevata efficacia del trasferimento di embrioni euploidi è suggerito il trasferimento di un solo embrione alla volta riducendo così l'insorgenza di gravidanze gemellari e le relative complicanze ostetriche e neonatali (Ubaldi et al, Human Reproduction, 2015).

L'**età materna avanzata** è la prima e più frequente tra le indicazioni. Il rischio più comune è rappresentato da una maggior incidenza di concepire un bambino affetto da sindrome di Down (dovuto alla presenza di tre copie del cromosoma 21). Infatti, in donne con più di 35 anni al momento del concepimento sono fortemente suggerite villocentesi o amniocentesi (tecniche di diagnosi prenatale) per scongiurare tale rischio. In epoca preimpianto, l'incidenza di anomalie numeriche dei cromosomi è molto più elevata che in epoca prenatale, ma esiste una forte selezione riproduttiva che si esplicita in fallimenti di impianto o aborti che prevengono un concepimento a termine. Sono poche infatti le aneuploidie vitali, oltre alla trisomia 21: la trisomia 14, la trisomia 18, nonché le aneuploidie a carico dei cromosomi sessuali (che si esplicitano ad esempio nella sindrome di Turner, o nella sindrome di Klinefelter).

L'analisi morfologica della qualità embrionale o dello sviluppo embrionale preimpianto non sono sufficienti a predire un normale assetto cromosomico (Capalbo et al, Human Reproduction, 2014), pertanto il rischio di trasferire un embrione che presenti anomalie è comunque elevato in assenza di analisi genetica. Nello specifico, un lavoro condotto nel nostro centro su oltre 5000 embrioni (Capalbo et al, Human Reproduction update, 2017) conferma la chiara relazione tra età materna e aumentato rischio di produrre embrioni con anomalie cromosomiche a seguito della fecondazione in vitro.



Capalbo, Hoffman et al, HRU, 2017

Figura 1. Incremento delle aneuploidie embrionali in relazione all'incremento dell'età della donna. Dati pubblicati da Capalbo et al in Human Reproduction update nel 2017



Nel caso in cui nessun embrione cromosomicamente normale dovesse essere identificato in un ciclo di PGT-A, non ci sono dati che escludano un esito diagnostico positivo in cicli successivi.

IV. Indicazioni alla PGT-SR (per anomalie strutturali dei cromosomi)

La tecnica di PGT-SR è indicata per pazienti portatori di anomalie cromosomiche strutturali nel cariotipo paterno o materno (inversioni, traslocazioni, ...). Tali condizioni possono esitare nella produzione di gameti (spermatozoi o ovociti) sbilanciati che si ripercuotono su una ridotta fertilità e un rischio riproduttivo (aborto o gravidanze cromosomicamente anomale) elevato, indipendentemente dall'età materna.

V. Indicazioni alla PGT-M (malattie monogeniche)

La tecnica PGT-M è indicata per pazienti portatori o affetti da patologie geniche e, pertanto, con un elevato rischio riproduttivo di concepire un feto a sua volta affetto da una malattia monogenica. Attualmente qualunque condizione per cui è nota la mutazione genetica causativa può essere analizzata tramite PGT-M, al fine di informare la coppia circa lo stato di salute degli embrioni prodotti. L'obiettivo della PGT-M, pertanto, è di effettuare la diagnosi in epoca preimpianto

		<p style="text-align: center;">CONSENSO INFORMATO PER TEST GENETICO PREIMPIANTO Clinica Ruesch- Codice Centro ISS 150063</p>
---	---	--

di embrioni affetti da patologie monogeniche e di evitare il loro trasferimento in utero. Qualora la coppia lo richieda, o in presenza di una specifica indicazione, la PGT-M può essere associata alla PGT-A, al fine di definire sia la presenza della mutazione identificata nel genoma paterno e materno, sia eventuali sbilanciamenti numerici dei cromosomi.

Le tecniche di PGT sono applicabili a prescindere dallo stato di fertilità della coppia, l'accesso alla fecondazione assistita per diagnosi genetica pre-impianto è stata infatti allargata anche alle coppie fertili con certificata indicazione ad essa (Sentenza n. 96/2015 della Corte costituzionale).

VI. Fasi procedurali

Le tecniche di PGT condividono tutte le fasi di un ciclo standard di fecondazione assistita:

- Stimolazione ovarica
- Prelievo ovocitario
- Raccolta degli spermatozoi
- Inseminazione in vitro
- Coltura embrionale
- Embryo transfer

In aggiunta sono necessarie le seguenti procedure laboratoristiche:

- **Biopsia embrionale**
- **Crioconservazione embrionale**
- **Analisi genetica**

Solo nel caso di PGT-M, trattandosi di un test specifico per ogni condizione genetica, la PGT-M prevede un **set-up preliminare ad hoc** sulla/e mutazione/i di cui sono portatori i due partner. In particolare, sarà necessario un prelievo di sangue di ciascun partner della coppia, nonché dei tamponi buccali dei genitori e/o figli qualora disponibili, al fine di definire le sonde molecolari (probes) mirate all'identificazione della mutazione e dei relativi marcatori fiancheggianti (flanking markers), ovvero sequenze informative prossime alla mutazione da utilizzare nella fase clinica di analisi embrionale. **Tale procedura richiede 1-2 mesi** di lavoro propedeutici al ciclo di PMA con diagnosi preimpianto.

Nel caso della PGT-A invece, la metodica di analisi molecolare è identica per tutti i cicli e mirata all'identificazione esclusiva di anomalie numeriche di tutti i cromosomi.

Infine, nell'eventualità in cui vi sia una indicazione per PGT-SR, non sarà necessario alcun set-up preliminare, ma semplicemente la verifica che la metodica di analisi molecolare in uso raggiunga il livello di risoluzione richiesto per identificare la presenza/assenza del relativo sbilanciamento negli embrioni.


Qualora fossero ottenuti embrioni evolutivi a seguito della fecondazione assistita (allo stadio di blastocisti), si procederà alla biopsia embrionale e alla diagnosi genetica.

	PGT-M	PGT-A	PGT-SR
Set-up	1-2 mesi	Non necessario	Non necessario
Ciclo di IVF	Circa 12 giorni di stimolazione ovarica + 5-7 giorni di coltura embrionale		
Tempistiche diagnostiche	15 giorni	15 giorni	15 giorni
Scongellamento e trasferimento embrionale	Su ciclo dedicato a seguito di preparazione endometriale		

Tabella 1. Tempistiche richieste per le varie fasi procedurali e logistiche delle tre tecnologie di PGT.

VII. Tecniche embriologiche relative alle PGT

1. **Coltura degli embrioni fino allo stadio di blastocisti:** Si tratta di ottenere gli embrioni che saranno oggetto della diagnosi. Si devono produrre *in vitro* mediante convenzionali tecniche di riproduzione assistita di secondo livello. Vedi consenso informato per PMA (MOD16-MPO-PMA) che deve essere allegato a questo consenso dovutamente firmato.

 Ruesch Casa di cura 1919	 g.en.e.r.a.	CONSENSO INFORMATO PER TEST GENETICO PREIMPIANTO Clinica Ruesch- Codice Centro ISS 150063
--	--	---

2. **Biopsia embrionale.** La biopsia embrionale è eseguita allo stadio di blastocisti il quinto, sesto e/o settimo giorno dopo la fecondazione al fine di prelevare il materiale cellulare necessario per l'analisi molecolare. Eseguita la biopsia, gli embrioni sono crioconservati mediante tecnica di vitrificazione (Rienzi et al., Human Reproduction Update, 2017).

In base alle evidenze scientifiche, la blastocisti rappresenta il miglior stadio evolutivo sul quale è possibile fare diagnosi genetica preimpianto (Cimadomo et al, Biomedical Research International, 2016). Il prelievo di cellule in questa fase è molto utile alla diagnostica, poiché è possibile prelevare un discreto numero di cellule senza evidenza di problemi allo sviluppo successivo dell'embrione, che in questo stadio è composta da 200-300 cellule. Inoltre, poiché la biopsia è effettuata su cellule esclusivamente del trofoectoderma, da cui originano esclusivamente gli annessi placentari dopo l'impianto, la massa cellulare interna, da cui invece origina il feto, non è coinvolta dalla biopsia, con chiari vantaggi biologici e bioetici. La tecnica di prelievo (biopsia) consiste nel praticare un foro nella zona pellucida, parete che avvolge l'embrione fino allo stadio di blastocisti. L'apertura della zona pellucida è effettuata mediante l'azione di un raggio laser, di cui è stata comprovata la biosicurezza sia in modelli animali che umani (Rienzi et al., 2001). Le cellule embrionali (circa 5-7) da utilizzare per la diagnosi sono prelevate mediante aspirazione con una pipetta da biopsia o provocando un'erniazione delle cellule del trofoectoderma all'esterno. Tali cellule vengono, quindi, poste all'interno di una provetta per eseguire l'analisi genetica. Eventuali cellule extraembrionali vengono rimosse contestualmente al fine di prevenire un potenziale effetto negativo delle stesse sullo sviluppo della blastocisti (come consigliato in vari studi in letteratura: Alikani et al, Fertility and Sterility, 1999; Alikani, Human Reproduction, 2005; Lagalla et al, Reproductive Biomedicine online, 2016).

Una serie di studi condotti nel nostro centro hanno evidenziato che l'analisi allo stadio di blastocisti rappresenta oggi il *gold standard* per la PGT nei centri specializzati per questa pratica (Capalbo et al, Human Reproduction, 2013, 2014, 2015), principalmente per i seguenti unici vantaggi:

- Maggiore robustezza analitica,
- Assenza di evidenze circa la compromissione dello sviluppo embrionale dovuto alla biopsia.

3. **Crioconservazione** della blastocisti a seguito di biopsia. La vitrificazione è una metodica clinica di congelamento di gameti ed embrioni validata e affidabile (Rienzi et al, Human Reproduction update, 2017). Essa è necessaria in cicli di PGT, viste le tempistiche necessarie al processamento del campione e alla diagnosi. Il tasso di sopravvivenza di blastocisti biopsiate a seguito di scongelamento è superiore al 98,5%.
4. **Diagnosi genetica pre-impianto.** Il campione ottenuto è processato per l'analisi molecolare secondo le tecniche e le metodiche richieste dalla specifica indicazione (**vedi consenso specifico IGENOMIX**) che deve essere allegato a questo consenso dovutamente firmato.
5. **Trasferimento embrionale.** La coppia una volta informata sul risultato dell'analisi molecolare dall'équipe medica del Centro può programmare il trasferimento. Il trasferimento degli embrioni crioconservati dopo biopsia viene eseguito, generalmente, nel ciclo seguente a quello in cui è avvenuto il prelievo ovocitario (o nel minor tempo possibile non appena le condizioni psicofisiche della donna lo permettano). La posticipazione del trasferimento è richiesta sia per motivi tecnici legati alle tempistiche dell'analisi molecolare sia per motivi medici relazionabili alle maggiori possibilità di concepimento e miglior decorso ostetrico e ginecologico delle gravidanze ottenute da cicli non stimolati in cui la maturazione endometriale risulta più fisiologica (Wennerholm et al, Human Reproduction, 2013). Dai registri europei (Desmyttere et al, Human Reproduction, 2009; Sunkara et al, Human Reproduction, 2017), non viene riportato un aumento delle anomalie alla nascita in relazione all'applicazione della PGT, a testimonianze dell'efficacia e sicurezza delle procedure adoperate.
6. **Diagnosi genetica pre-natale.** In caso di gravidanza viene consigliata una ulteriore valutazione genetica con metodiche non invasive (bi-test o NIPT) o invasive (villocentesi o amniocentesi). Si suggerisce comunque di discutere eventuali approfondimenti in consulenza genetica con uno specialista del settore.

VIII. Risultati ottenuti nel nostro centro

- **PGT-A**

L'efficacia globale della diagnosi preimpianto dipende, da un lato, dal numero di embrioni disponibili e dal loro grado di sviluppo e, dall'altro dal rendimento del metodo diagnostico molecolare impiegato.

I risultati clinici ottenuti nel nostro centro (2763 prelievi ovocitari effettuati da 2280 coppie presso la nostra struttura fino ad aprile 2017; età media della donna: 39,5 anni) evidenziano che:

- il 78% in media dei cicli presentano almeno una blastocisti analizzabile
- nel 67% in media dei casi in cui viene effettuata la biopsia si identificano embrioni evolutivi e con normale corredo cromosomico (euploidi; tasso di euploidia: 47% delle 6600 blastocisti analizzate)
- il tasso di gravidanza a termine per trasferimento embrionale risulta essere in media 43% in questi cicli.

Le gravidanze gemellari sono lo 0,5%, in conseguenza di un numero medio di blastocisti trasferite pari a 1,01 per trasferimento embrionale.

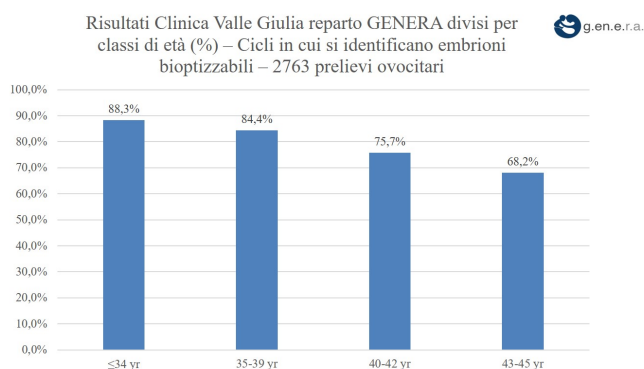


Figura 2. Possibilità di ottenere almeno una blastocisti in relazione all'età materna

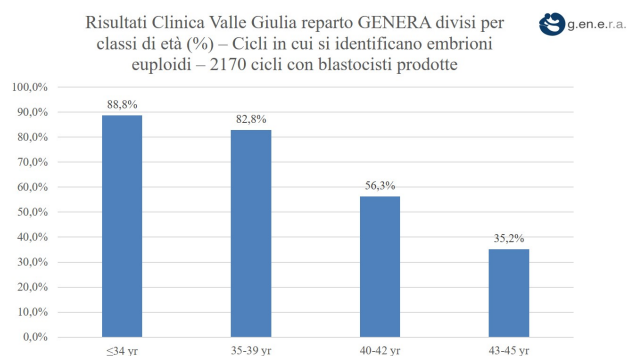


Figura 3. Possibilità di identificare una blastocisti cromosomicamente normale all'aumentare dell'età materna

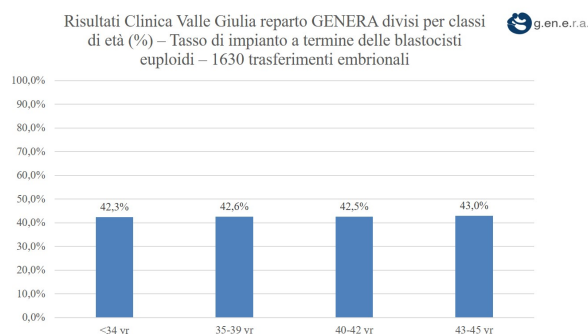


Figura 4. Tasso di impianto a termine delle blastocisti euploidi per età della donna al prelievo ovocitario. 1630 trasferimenti di 1654 blastocisti euploidi

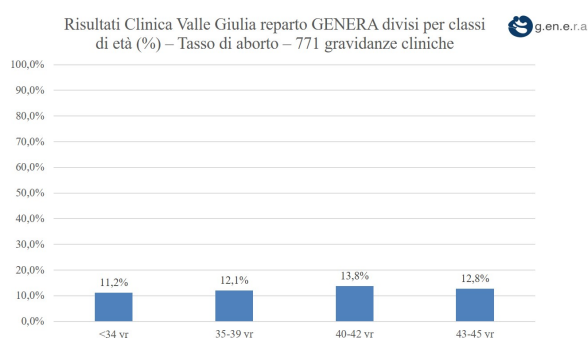


Figura 5. Tasso di aborto per età della donna al prelievo ovocitario.

- **PGT-SR**

Nel corso di 104 cicli effettuati da 85 pazienti portatori di riarrangiamenti strutturali nel cariotipo materno o paterno (età media della donna: 35 anni) presso il nostro centro, sono state analizzate 420 blastocisti. Il 37% di queste non presentavano sbilanciamenti cromosomici. Il 75% dei cicli si è risolta con almeno una blastocisti trasferibile. Ad oggi, 90 trasferimenti di 92 blastocisti euploidi sono esitati in 1 solo aborto (3% per gravidanza clinica) e un **tasso di gravidanza a termine per trasferimento del 43%**.

- **PGT-M**

58 pazienti (età media della donna: 36 anni) hanno effettuato 71 cicli. Il 66% delle blastocisti si sono rivelate non-afette per la specifica patologie monogenica in esame. Il 50% delle blastocisti non affette sono state anche diagnosticate euploidi. Ciò si è tradotto nel 76% dei cicli con almeno una blastocisti non-afetta e cromosomicamente normale. Il tasso aborto è stato 12%. **Il tasso di gravidanza a termine per trasferimento è stato del 44%**.

IX. Informazioni di carattere economico

I prezzi in vigore in questo centro sono indicati in modo dettagliato nel preventivo qui allegato (modulo ALL-05-CdS - Costi economici PGT o modulo ALL-06-CdS - Costi economici PGT), facendo presente che è impossibile stabilire in anticipo il costo totale delle ricerche diagnostiche, poiché variano per ogni paziente.

IX. Limiti di responsabilità

Il laboratorio GENERA è responsabile esclusivamente della produzione di embrioni mediante tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita e non ha alcuna responsabilità circa l'operato del Laboratorio di Diagnosi molecolare IGENOMIX riguardante il test genetico effettuato sulle cellule (**vedi consenso specifico IGENOMIX**).

Dopo aver letto e compreso quanto sopra indicato, dichiariamo di essere stati debitamente informati riguardo a quanto segue:

- Le indicazioni, le procedure e le probabilità di successo del programma di PGT proposto.
- Che le procedure possono essere interrotte in qualunque momento della loro realizzazione, sia per motivi medici che su richiesta dei pazienti, purché ciò non comporti alcun danno agli stessi o agli embrioni vitali prodotti.
- Il costo economico del trattamento.

		<p style="text-align: center;">CONSENSO INFORMATO PER TEST GENETICO PREIMPIANTO Clinica Ruesch- Codice Centro ISS 150063</p>
---	---	---

- La disponibilità del personale sanitario di questo centro ad approfondire qualunque aspetto delle informazioni che non sia sufficientemente chiaro.
- Di essere favorevole allo scongelamento, analisi cromosomica e ricongelamento di embrioni che sono risultati senza risultato o che necessitano di una successiva valutazione.

Dichiarano inoltre:

- di essere in trattamento per una procreazione medicalmente assistita: fecondazione in vitro ed embryo transfer presso il centro GENERA di Napoli.
- di voler (come da articolo 14, punto 5, legge 40/2004) essere informati sul numero e sullo stato di salute degli embrioni prodotti prima del loro trasferimento in utero.
- di essere a conoscenza che il centro GENERA si avvale della collaborazione del Laboratorio di Diagnosi molecolare iGENOMIX per l'analisi diagnostica dello stato di salute embrionale.
- Di essere a conoscenza che i dati personali saranno trattati in conformità Ai sensi dell'articolo 23 del D.Lgs. 30 giugno 2003, n. 196.

Abbiamo compreso le spiegazioni ricevute, che ci sono state fornite in un linguaggio chiaro e semplice; inoltre il medico che ci ha assistito ci ha permesso di rivolgere tutte le osservazioni al riguardo ed ha chiarito ogni nostro dubbio. Le informazioni ci sono state fornite con sufficiente anticipo in modo da poter riflettere con calma e decidere in modo libero e responsabile. Comprendiamo inoltre che, in qualsiasi momento e senza fornire spiegazioni, possiamo revocare il consenso prestato in questo momento. A tal fine dichiariamo di essere soddisfatti riguardo alle informazioni ricevute e comprendiamo la portata e i rischi del trattamento. Inoltre ci impegniamo a comunicare al centro GENERA gli eventuali cambiamenti d'indirizzo ai fini di future comunicazioni.

Con la presente richiediamo al personale del centro GENERA di eseguire il programma di diagnosi preimpianto proposto.

Luogo _____, il ____ / ____ / ____

Firmato: la paziente

Firmato: il paziente

Firmato: il medico