

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BARBARA ROSA FOIZER RIBEIRO

**Contaminação microbiológica em placas de cultivo de embriões humanos e a
interferência no sucesso da reprodução assistida**

Goiânia
2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Barbara Rosa Foizer Ribeiro				
E-mail:	wellingtonbarbara@yahoo.com.br				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo empregatício do autor	Professor (Biólogo)				
Agência de fomento:	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Bolsa), Instituto de Patologia tropical e Saúde Pública (reagentes)	Sigla:	CAPES IPTSP		
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	00889834/0001-08
Título:	Contaminação microbiológica em placas de cultivo de embriões humanos e a interferência no sucesso da reprodução assistida				
Palavras-chave:	Reprodução . Contaminação. Microbiologia. Gravidez. Nascimento. Embriões				
Título em outra língua:	Microbial contamination in dishes culture of human embryos and it's implications on success of assisted reproduction				
Palavras-chave em outra língua:	reproduction. Contamination. Microbiology. Pregnancy. Born. Embryos				
Área de concentração:	Dinâmica do processo saúde doença (Reprodução Humana)				
Data defesa:	14/03/2015				
Programa de Pós-Graduação:	Doutorado em Ciências da Saúde				
Orientador (a):	Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral				
E-mail:	waldemar@sbus.org.br				
Co-orientador (a):	Prof. Dr José Daniel Gonçalves Vieira				
E-mail:	hoo.com.bridgvieira62@ya				

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat. Data: 18 / 03/ 2015 Assinatura do (a) autor

BARBARA ROSA FOIZER RIBEIRO

**Contaminação microbiana em placas de cultivo de embriões humanos e a
interferência no sucesso da reprodução assistida**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral.

Co-orientador: Prof. Dr José Daniel Gonçalves Vieira

Goiânia

2015

Dados para ficha catalográfica

Nome:

Sobrenome:

Título do trabalho:

Subtítulo do trabalho:

Tipo do Trabalho: Tese Dissertação TCC(Especialização) TCC(Graduação)

Programa/Curso:

Unidade Acadêmica:

Regional: Goiânia Catalão Jataí Goiás

Nome do orientador: doutor

Sobrenome do orientador:

Nome do 1º coorientador: doutor

Sobrenome do 1º coorientador:

Ano:

nº de folhas em romanos: (ex: xvi)

nº de folhas em arábico: (ex: 300)

Notas:

- Siglas
- Mapas
- Fotografias
- Abreviaturas
- Símbolos
- Gráfico
- Tabelas
- Algoritmos
- Lista de Figuras
- Lista de Tabelas

Ilustrações: Sim Não

Bibliografia: Sim Não

Anexos: Sim Não

Apêndice: Sim Não

Palavras-chave(mín.1):

1.
2.
3.
4.
5.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

Aluno(a): Barbara Rosa Ribeiro Foizer

Orientador(a): Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral

Co-orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Membros:

- 1. Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral**
- 2. Prof. Dr. Eduardo Camelo**
- 3. Prof. Dr. Rui Gilberto**
- 4. Prof. Dr. Marco Túlio Antônio Garcia Zapata**

Suplentes

- 5. Prof. Dra. Zelma Bernardes Costa**
- 6. Prof. Dr. Marcelo Vigiano**

Data: 14/03/2015

*Dedico esta tese à minha família, meu esposo **Wellington Ribeiro de Sousa** e meus filhos **Arthur e Eduardo**.*

*Ainda de maneira relevante esta dedicatória a meu Pai **Ederli Foizer**, minha mãe **Elza M^a Rosa Foizer**, além de meu irmão **Edgar Rosa Foizer**.*

Também a consideração para com Dona Alda e seus cuidados especiais com minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Waldemar Naves do Amaral, que abriu as portas para a realização de um sonho pessoal, de trabalhar com Reprodução Humana. A ele minha gratidão e admiração.

Ao meu marido, Wellington Ribeiro de Sousa, que me incentivou neste trabalho e me ajudou nos momentos em que pensei que não iria conseguir concluir este doutorado. Ele foi meu consultor para assuntos tecnológicos. Aos meus filhos Arthur e Eduardo, por infinitas horas abdicadas da presença deles, querendo participar subindo no meu colo e perguntando: “Já acabou mamãe?” À minha família, meu pai Ederli, minha mãe Elza e irmão Edgar, por sempre me apoiar e incentivar na vida acadêmica.

Ao meu co-orientador, Dr. José Daniel Gonçalves Pereira, por me orientar na coleta e análise das amostras, e em especial à Dra. Leda Maria A. Valadão.

Às Clínicas Fértil Diagnósticos e Hospital das Clínicas, às embriologistas Lilian de Fátima Filetti Gomes, Jucyara do Valle Lima, dos laboratórios de reprodução humana envolvidos na pesquisa, por guardarem as placas de cultivo de embriões após a transferência.

Aos componentes das bancas da qualificação e da defesa representadas pelos presidentes: Prof. Dr. Marco Túlio Antônio Garcia-Zapata, Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral.

Agradeço a Deus que preparou este caminho e esta oportunidade, trazendo à realidade este sonho. A Ele toda glória e honra desta etapa cumprida em minha vida.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	x
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão da literatura.....	4
1.1.1Legislação vigente.....	5
1.1.2Principais fontes de contaminação.....	6
1.1.3 Consequências e medidas preventivas em estudo.....	9
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 METODOLOGIA.....	14
Tipos de pesquisa.....	14
Critérios de inclusão e exclusão.....	14
Locais de coleta.....	14

Aspectos Éticos.....	15
Cálculo da amostra.....	15
Coleta e processamento das placas de embriões.....	15
Análise dos prontuários e critérios de avaliação.....	17
Análise estatística.....	19
Testes Bioquímicos nos contaminantes encontrados.....	20
4. RESULTADOS.....	27
4.1 PUBLICAÇÕES.....	28
4.1.1 ARTIGO 1.....	29
4.1.2 ARTIGO 2.....	44
5. CONCLUSÕES.....	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7. ANEXOS.....	77
7.1 Anexo 1 - Documento de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.....	77
7.2 Anexo 2 - Protocolos de controle de qualidade.....	81
7.3 Anexo 3 - Esquemas e figuras das técnicas em reprodução assistida.....	91

7.4 Anexo 4 - Normas da Elsevier editora.....	94
7.5 Anexo 5- Manuscrito submetido à Fertility and Sterility	99
7.6 Anexo 6 - Tabelas extras	113

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1a Louise Brown, nascida em 25 de julho de 1978, representa o marco inicial da fertilização <i>in vitro</i> humana, quando bebê e atualmente.....	2
Figura 1b Ana Paula Caldeira, nascida em 1983, representa o marco inicial da fertilização <i>in vitro</i> humana no Brasil (Pinará), quando bebê e atualmente.....	2
Figura 2 Contêiner para nitrogênio líquido, à esquerda, Câmara de fluxo ao centro, microscópio invertido à direita, maquinários adequados para o uso em laboratórios de micromanipulação e criopreservação (reprodução humana).....	5
Figura 3 Localização da Clínica Fértil Diagnósticos, acima e do Hospital das Clínicas, abaixo.....	14
Figura 4 Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” à esquerda e modo “micro gotas”, à direita.....	16
Figura 5 Meio de cultivo Caldo BHI, esterilizado, e posteriormente turvado (contaminado).....	17
Figura 6 Embriões de classificação A, B, C e D, respectivamente.....	19
Figura 7 Blastocisto, de classificação 4AA	19
Figura 8 Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de Bactérias bastonetes gram negativos (acima), teste da catalase e da coagulase (abaixo) laboratório do IPTSP-UFG, Goiânia-GO.....	23
Figura 8 Colônias de Klebsiella sp (à esquerda, acima), Enterobacter sp (à direita, acima), Escherichia coli (à esquerda, abaixo) e Pseudomonas sp (à direita, abaixo).....	24
Figura 9 Bacillus gram positivos em colônias (à esquerda), foto de microscopia com coloração Gram positiva.....	25
Figura 10 Cocos gram positivos em colônias, Staphylococcus à esquerda	

e Streptococcus à direita.....	25
Figura 11 Colônias de levedura, de coloração branca.....	26
Figura 12 Aspergillus sp (esquerda) e corpo de frutificação microscópico em forma de conídio agrupado (direita).....	26
Figura 13 Penicilium sp (esquerda) e o corpo de frutificação microscópico em forma de conídio isolado (direita).....	26
Figura 14 Trichophyton rubrum com mudança de cor de branco para rubro (nas placas à esquerda) e o microconídio (corpo de frutificação à direita).	27
Tabela 1 (Artigo 2) Distribuição dos achados de Microrganismos isolados em placas de cultivo contaminadas, em laboratórios de reprodução humana, Goiânia, 2009/2014.	
Tabela 2 (Artigo 2): Distribuição dos casos de fertilização de alta complexidade segundo as placas de cultivo contaminadas ou não, para os Fatores de Esterilidade, Goiânia 2009-2014.	
Tabela 3 (Artigo 2) Distribuição dos casos de fertilização de alta complexidade segundo a qualidade embrionária e o resultado gravídico perinatal, entre os grupos contaminados e não contaminados, 2009/2014.	
Tabela 4 (Artigo 2) Distribuição dos achados de placas de cultivo contaminados e não contaminados, em laboratórios de reprodução humana, segundo o sucesso perinatal da gravidez, Goiânia 2009-2014.	
Anexo 1 Documento de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG - Hospital das Clínicas.....	76
Anexo 2 Figuras.....	80
Anexo 3 Esquemas.....	87
Anexo 4 Normas da revista Reprodução e Climatério e da Fertility and Sterility.....	90
Anexo 5 Manuscrito submetido à Fertility and sterility (em inglês).....	95
Anexo 6 - Tabelas extras	113

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASEBIR (Asociacion para El estudio de La biologia de La reproduccion)
BCTG - Bancos de Células e Tecidos Germinativos
BHI – Brain Heart Infusion
DIP- Doença Inflamatória Pélvica
FIV- fertilização in vitro
HBsAg - antígeno da hepatite B
HCG – hormônio gonadotrofina coriônica
HEPA- High Efficiency Particulate Air
HIV- vírus da AIDS
HTF- human tubal fluid - Irvine Scientific
HTLV - vírus T-linfotrópicos humanos
ICSI- injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IPTSP- Instituto de patologia tropical e saúde pública
IVF- meio de cultura – Vitro Life
LRH- laboratório de reprodução humana
mL- mililitro
NBR- Denominação de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT);
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada (Manual Brasileiro de Acreditação de organizações prestadoras de serviço de saúde e normas para o processo de avaliação – regime interno aprovado portaria 593 de 25/08/2007)
SIM- enxofre, indol e motilidade
SHEO- síndrome da hiperestimulação ovariana
TAF - tríplice açúcar ferro
UFG – Universidade Federal de Goiás
UV - Ultravioleta
° C- grau Célsius

RESUMO

Introdução: O controle de qualidade é exigência primária em laboratórios de Reprodução Humana, a realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados e na proteção materno fetal, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. **Objetivos:** Investigar a prevalência de contaminação microbiológica nas placas de cultivo de embriões humanos, identificar o microrganismo e avaliar a interferência da contaminação no sucesso em reprodução assistida. **Metodologia:** coletou-se 470 amostras do meio de cultura das placas de cultivo de embriões humanos, após a transferência para o útero materno, em dois laboratórios de reprodução humana na cidade de Goiânia-GO, no período de maio de 2009 a março de 2014. Os meios de cultivo foram inoculados em caldo BHI e as amostras positivadas foram isoladas e identificadas. Os dados dos prontuários foram coletados, analisados e os testes de regressão e ODDS RATIO aplicados com o pacote estatístico SPSS-17.0. **Resultados:** Houve uma prevalência de 6,32% de contaminação, sendo os principais microrganismos fúngicos: *Candida sp* (20%) *Penicilium sp* (13,34%), *Aspergillus sp* (10%) e bacterianos: *Bacillus sp* (16%) *E. coli* (10%), *Staphylococcus sp* (10%). A chance de não engravidar foi maior no grupo contaminado (OR=2,57, p=0,043, IC=1,03-6,41). O resultado perinatal de nascidos vivos foi de 2 (6,6%) no contaminado, e 118 (27%) no não contaminado, com diferença significativa na regressão logística, p=0,026, OR= 5,13, IC=1,39-18,97. O grupo contaminado teve maior chance de perda gestacional que o grupo não contaminado (p=0,094, OR=4,37 e IC=0,78-24,59). O fator de esterilidade mais encontrado foi o tubário (p<0,001, OR=4,18, IC=1,94-9,01), diferença altamente significativa do grupo contaminado para o não contaminado. Diferença significativa para embriões ruins (classe C e D) entre os grupos (p=0,013; OR=3,54 e IC=1,31-9,58). **Conclusão:** A contaminação microbiológica em 6,32% de prevalência, com maior incidência de *Candida sp*, *Penicilium sp*, *Bacillus*, *Aspergillus sp*, *E.coli* e *Staphylococcus sp*, aumenta o número de embriões ruins e a chance de perda gestacional, e diminui as taxas de gestação e o resultado perinatal.

Palavras-chave (descritores): Reprodução. Contaminação. Microbiologia. Gravidez. Nascimento. Embriões.

ABSTRACT

Introduction: Human reproduction laboratories perform quality control because procedures directly influence results and because certain materials, such as the vagina, follicular fluid and semen cannot be sterilized. The embryo culture dishes should be free of contamination to protect both the mother and the fetuses. **Objectives:** To investigate the prevalence of microbial contamination of human embryo culture dishes, identify the microorganisms implicated and evaluate the impact of contamination on the success of assisted reproduction. **Methods:** A total of 470 samples of culture media were obtained from Goiânia, Goiás State after the embryos were transferred to the mother's uterus, between May 2009 and March 2014. The culture medium was inoculated into BHI broth, and the positive samples were isolated and identified. Data from medical records were collected and analyzed, and regression analyses were performed during SPSS-17.0 software. **Results:** There was a 6.32% prevalence of contamination. The main fungal pathogens, which resulted in live births, were *Candida sp* (20%), and the bacterial pathogens, which did not result in live births, were *Bacillus sp* (16%), *E. coli* (10%) and *Staphylococcus sp* (10%). The chance of not getting pregnant was 2.57 (OR, $p=0.043$, CI=1.06-6.24) times higher in the infected group, the group uncontaminated. Perinatal outcome of live births was 2 (6.6%) in infected and 118 (27%) in uncontaminated, with a significant difference in the logistic regression, $p = 0.026$, OR = 5.13, CI = 1.39-18.97. The infected group had 4.37 (OR, $p=0.094$, CI=1.58-12.04) times greater chance of pregnancy loss than the group not contaminated. Female factors were the most common infertility factors, and they differed significantly between the contaminated and uncontaminated groups ($p=0.02$); tubal factor infertility ($p<0.001$, OR=4.18, CI=1.94-9.01) showed a highly significant difference between the contaminated and uncontaminated groups. A significant difference in poor embryos (Grade C and D) was observed between the groups ($p=0.013$, OR=3.54 and 95% CI). **Conclusion:** Microbiological contamination increases the number of embryos poor and the chance of pregnancy loss, and decreases pregnancy rates and perinatal outcome of births.

Keywords (descriptors): Reproduction. Contamination. Microbial. Pregnancy. Birth. Embryos.

1. INTRODUÇÃO

O decréscimo da fertilidade é um inevitável fato biológico, associado à maternidade tardia. A técnica de fertilização in vitro (FIV) avançou nestas últimas 3 décadas para ajudar os casais a resolverem o problema da infertilidade. No histórico relatado por Antunes Junior et al (2003), o bebê Louise Brown foi o primeiro a nascer de FIV (Figura1). Na FIV, os embriões são formados e cultivados em placas, fora do corpo da mãe, graças ao avanço dos meios de cultura e incubadoras, que oferecem os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento dos embriões no laboratório de reprodução humana. Estas placas de cultivo dos embriões representam o melhor local de coleta para verificar se há contaminação microbiológica eminente, por que os vários fatores prováveis de contaminação confluem todos para esta placa. A contaminação pode interferir nas taxas de gestação e nascimento (Amaral *et al*, 2009).

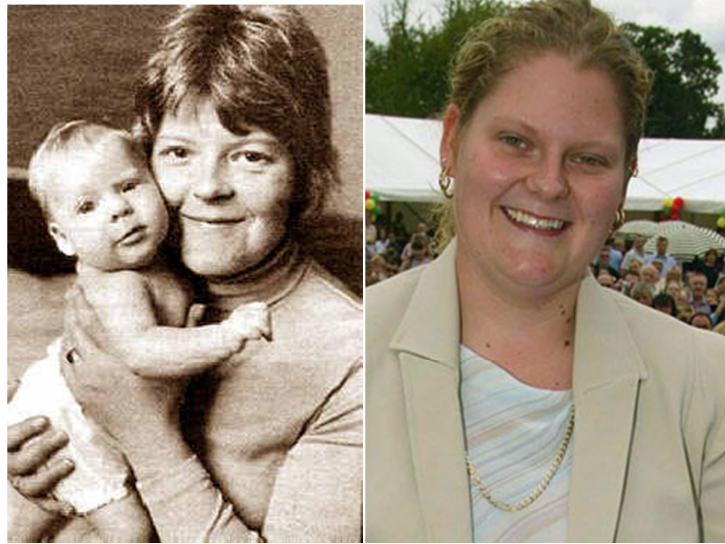
Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influi diretamente nos resultados. Principalmente porque o líquido folicular e o sêmen não são e não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação dos meios de cultura e dos equipamentos. Bactericidas e fungicidas vem sendo incorporados aos meios de cultura, à medida que aumenta a resistência dos micro-organismos. Cada passo nos procedimentos e manipulações laboratoriais devem ser executados com técnicas de assepsia rigorosamente protocoladas (Elder *et al*, 2005).

A exata frequência destas contaminações microbiológicas e a interferência nos resultados em reprodução assistida não é conhecida. (Cottell *et al*, 1996). Contaminações microbiológicas em meios de cultura tem sido rotineiramente registradas, com a finalidade de contribuir com a

qualidade do sistema de manejo em reprodução humana, o que compromete diretamente os resultados gestacionais em fertilização assistida. As principais causas desta contaminação vem sendo associadas à infecção no trato genital masculino e feminino com a consequente contaminação dos ovócitos e embriões dos pacientes. Estes embriões são transferidos para o útero, podendo causar infecção, o que poderá comprometer sua implantação e sobrevivência durante a gestação, e também causar prejuízos para a mãe. A contaminação pode vir ainda do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo (Cottell *et al* 1997).

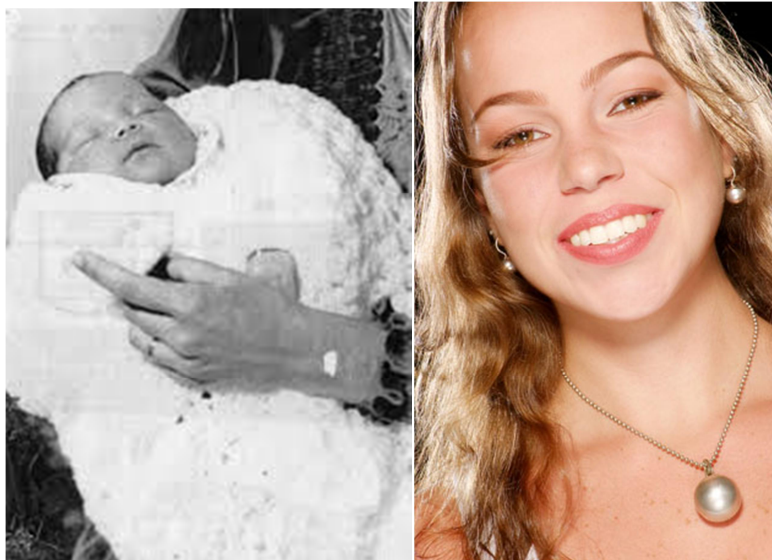
Embora haja alguns custos significativos para implementar o controle sobre os laboratórios em relação a estes fatores contaminantes, existem benefícios e retornos substanciais para a melhoria da qualidade e minimização de riscos. No entanto, há graves problemas com a viabilidade, eficácia e impactos adversos prováveis da aplicação de padrões de qualidade do ar e assepsia, comprometendo a capacidade de manter os gametas e embriões em condições ambientais ideais. A criação dos embriões da mais alta qualidade, e as crianças saudáveis, deve ser o foco principal do tratamento de concepção assistida (Mortimer et al, 2005).

Daí se estabelece a importância da pesquisa de micro-organismos em fertilização assistida durante todo o processo, que vai desde a manipulação de gametas e embriões, transferência dos embriões e gestação apropriada culminando em nascimento de bebês saudáveis. Prioriza-se o acompanhamento destas etapas, com dados sobre a gestação e o nascimento, identificando os micro-organismos (bactéria e fungo), quando encontrado na placa de cultivo dos embriões, em laboratórios de reprodução humana.



www.growingyourbaby.com www.theguardian.com Louise Brown, the first IVF baby at her 25th birthday celebration.

Figura 1a- Louise Brown, nascida em 25 de julho de 1978, representa marco inicial da fertilização in vitro humana, quando bebê e atualmente.



<http://www.abril.com.br/imagem/annacaldeira-436.jpg&imgrefurl=http://www.abril.com.br/noticias/brasil/primeiro-bebe-proveta-brasileiro-completa-25-anos>

Figura 1b-, Ana Paula Caldeira, nascida em 1983, representa o marco inicial da fertilização in vitro humana no Brasil (Pinará), quando bebê e atualmente.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Legislação vigente

Segundo a legislação RCD (resolução da Diretoria Colegiada) nº 33 de 17 de fevereiro de 2006, os laboratórios de reprodução humana devem conter câmara de fluxo positiva, filtros de ar, além de todos os cuidados pessoais de assepsia e descontaminação. O ambiente de micro manipulação de gametas não deve possuir qualquer instalação hidrossanitária, tais como: pias, ralos ou lavatórios. O sistema de climatização deve manter pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes; condições de controle da temperatura entre 21°C a 24°C; umidade relativa do ar entre 40% e 60%; vazão mínima de ar total de 45(m³/h)/m²; vazão mínima de ar exterior de 15(m³/h)/m² e filtragem mínima no insulflamento com filtros G3+carvão ativado+F8.

Durante a construção dos laboratórios de fertilização *in vitro*, o centro cirúrgico e a sala de laboratório de FIV devem ser dotados de sistema de filtração do ar, de alta qualidade, que inclui calefação, ventilação, ar condicionado, que também deve gerar pressão positiva. Os diversos tipos e contaminantes, que afetam de forma exponencial os resultados, podem ser detidos ou minimizados com filtros de ar, como o filtro HEPA e o de carvão ativado para substâncias orgânicas voláteis. Os filtros de ar devem ser particulados de alta eficiência, ou filtro de ar de ultrabaixa penetração. Este ar terá acesso às incubadoras, dependendo do tipo (aquelas com mistura de 5% de CO₂ e 95% de ar, por exemplo), que devem passar por dois testes consecutivos com embriões de camundongos, antes de serem usados para procedimentos. Estas que devem ser usadas para no máximo três pacientes. As menores estabilizam-se mais rapidamente, após abertura e fechamento. Dentro das incubadoras deve conter termômetros, verificados diariamente, assim como o CO₂. Como a qualidade do ar é um dos fatores mais importantes do laboratório, sua avaliação deve ser um procedimento de rotina. Semestralmente, a antecâmara e o laboratório de FIV são submetidos à contagem de partículas e à verificação do fluxo de ar por uma agência

certificadora. Se necessário, os filtros de ar deverão ser trocados, a cada três meses para os filtros do teto.

A manipulação das amostras somente deve ser efetuada em uma área limpa classificada, no mínimo, como ISO Classe 5, segundo a norma NBR/ISO 14644-1 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), com cabine de segurança biológica Classe II Tipo A, módulo de fluxo unidirecional ou de fluxo laminar, segundo as orientações da NBR/ISO 14644-4 da ABNT. Neste caso o BCTG deve obrigatoriamente possuir uma antecâmara de acesso à sala de processamento, além do vestiário de paramentação. Deve conter um congelador com temperatura igual ou inferior a 135°C negativos, com registro automático da temperatura e exclusivo para o armazenamento de células e tecidos germinativos liberados para uso, ou reservatório, contêiner adequado para nitrogênio líquido e exclusivo para o armazenamento de células e tecidos germinativos (Figura 2).



(<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved>)

Figura 2- Contêiner para nitrogênio líquido, à esquerda (Foto cedidas pela clínica fértil), Câmara de fluxo ao centro, microscópio invertido à direita, maquinários adequados para o uso em laboratórios de micromanipulação e criopreservação (reprodução humana)

A triagem sorológica dos pacientes, segundo a legislação, deve ser realizada no mínimo para as seguintes doenças infecto-contagiosas: Sífilis; Hepatite B (HBsAg e anti-HBc); Hepatite C (anti-HCV); HIV 1 e HIV 2; HTLV I e II, citomegalovírus e Clamídia. No caso de sêmen, ou de oócito criopreservado, a liberação da amostra só ocorrerá após os testes sorológicos serem repetidos, em um prazo nunca inferior a seis meses. Na primeira coleta de amostra de sêmen, devem ser realizados uma Triagem

Microbiológica, com exames para detecção de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae* e bactérias aeróbias. Estes testes devem ter resultados negativos para patógenos seminais, antes da liberação da amostra. Para os profissionais no laboratório de FIV, recomenda-se vacinação contra doenças virais e bacterianas, e também tratar os pacientes e amostras (fluidos corporais, fluido folicular, sêmen) como potenciais fontes de infecção (Nagy *et al*, 2010).

Para os meios de cultivo, observar o prazo de validade, ter instalações apropriadas para o armazenamento, não utilizar o soro ou fluido folicular dos doadores como aditivos para os meios de cultura, uso de óleo mineral pré-equilibrado que ajudará a manter a temperatura, a pressão osmótica e o pH. Deve haver protocolos de funcionamento, calibração, limpeza e emergência com condutas em caso de pane (com sistema de back-up elétrico para os principais equipamentos).

Semelhantemente à legislação brasileira, a legislação europeia também é citada em teses de controle de qualidade em laboratórios de reprodução e a grande preocupação é promover o maior nível de segurança possível para garantir a saúde pública (Mortimer, 2005).

1.1.2 Principais fontes de contaminação

Todo material biológico deve ser considerado como ponto inicial de infecção. (Nagy *et al*, 2010). Doenças do aparelho reprodutor masculino e feminino também podem ser a fonte de contaminação. Relatos da década de 90: “Em 50% dos ciclos de FIV foram cultivados micro-organismos de vários loci. Fluido seminal e líquido folicular são fontes potenciais de contaminação microbiológica” (Cottell *et al*, 1996).

Candida albicans é uma levedura muito encontrada entre os micro-organismos do trato genital feminino e masculino. Não há dúvidas de que este fungo, também encontrado nas contaminações dos laboratórios de reprodução assistida, possa ser proveniente de infecções no trato genital dos pacientes submetidos à FIV e ICSI. Vários autores relatam ter encontrado leveduras em seus estudos, inclusive com a classificação

Candida albicans, e avaliam vários aspectos de comprometimento dos resultados em fertilização assistida (Bem-chetric *et al*, 1996; Burrelo *et al*, 2004; Klein *et al*, 2009)

As bactérias também são encontradas no trato genital e urinário. A *Escherichia coli* mostrou-se resistente à gentamicina nos estudos de Agra *et al* (2007) e nos estudos de Ubillús *et al* (2008), em gestantes. Os gêneros *Pseudomonas sp* e *Staphylococcus sp* multirresistentes, também predominaram no diagnóstico de sepses, encontrados por Júnior *et al*, 2010 em seu estudo no Brasil. A gonorréia e doença inflamatória pélvica podem ser causadas pela *Neisseria gonorrhoeae*, um diplococo gram-negativo, aeróbico facultativo (fermentador). A uretrite inespecífica possui patógenos associados: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. A Sífilis, causada pelo *Treponema pallidum*; o Cancro Mole, causado pelo *Haemophilus ducreyi*; a Vaginose, por *Gardnerella vaginalis* em que foi encontrada resistência a metronidazol e doxaciclina, o que demonstra a vulnerabilidade da dependência de antibióticos (Larsen *et al*, 2001). O Linfogranuloma Venéreo, também causado pela *Chlamydia trachomatis*. Como este tipo de contaminação já é conhecida no trato genital, os procedimentos envolvem a utilização de antibióticos no sêmen e na cultura de embriões. Penicilina, estreptomicina e gentamicina vêm sendo utilizados, com resultados promissores de 95% de eliminação efetiva de bactérias (Cottell *et al*, 1997).

Estas bactérias, uma vez presentes na vagina, podem contaminar a pelve feminina durante os procedimentos de fertilização. A confirmação da presença de células vaginais no fluido folicular durante a punção transvaginal para recrutamento de oócitos, em maior porcentagem nos folículos inicialmente puncionados, sugere a possibilidade de contaminação pélvica pelo meio vaginal e também do ovócito (Teixeira *et al*, 1996).

A contaminação bacteriana também pode vir do ar. Isto ocorre por que nem todos os laboratórios trabalham com filtros de ar compatíveis com a descontaminação efetiva da sala de embriologia. Os gêneros que são comumente encontradas nestas condições correspondem principalmente ao gênero *Bacillus*, estreptobacilos gram-positivos de grande porte (Afonso *et al*, 2005).

Fungos como o do gênero *Aspergillus* são encontrados nas placas provavelmente vindos do óleo mineral contaminado, usado para sobreposição das gotas do meio de cultura. São fungos naturais contaminantes do ar os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Kastrop *et al*, 2007).

No campo da medicina reprodutiva existe um risco significativo de contaminação cruzada durante a criopreservação de gametas ou embriões. Em um estudo de revisão, conclui-se que há um risco negligenciado de contaminação cruzada em condições de trabalho de fertilização *in vitro* (Pomeroy *et al*, 2010; Bielanski *et al* 2009).

Passos *et al* (2002) encontraram correlação entre infertilidade e vírus da hepatite C, que pode ser transmitido de uma mulher para outra pela contaminação cruzada por equipamentos transvaginais, ou dos pais para o concepto, e recomendou que pacientes inférteis fossem rastreados antes de serem submetidos a técnicas de reprodução assistida. Este fato exemplifica a contaminação embriológica e materna de micro-organismos.

A prevalência desta contaminação vem sendo registrada rotineiramente. Incidência de 0,67% de contaminação foi encontrada nos laboratórios europeus. Sua amostra envolveu mais de 13.000 casos, que utilizavam penicilina e estreptomicina nos meios de cultivo pra conter o crescimento bacteriano (Kastrop *et al*, 2007).

Um estudo de prevalência no Brasil encontrou 4,8% de contaminação nas placas, com bactérias e fungos. Este trabalho considerou a contaminação como um fator de contribuição para os fracassos em reprodução assistida (Foizer *et al*, 2011).

1.1.3 Consequências e medidas preventivas em estudo

A primeira consequência da contaminação das placas de cultivo está na redução da formação de embriões viáveis para transferência. Os embriões podem não sobreviver nas primeiras clivagens, apresentar teratogenia, não ter sucesso na implantação. Também pode causar síndromes e comprometer a saúde do feto, aumentar a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, restrição de crescimento e

malformações; fatos descritos em estudos bovinos onde a fertilização assistida é amplamente utilizada, até mesmo para estudos e testes (Junqueira *et al*, 2006).

Em outra vertente, traz o risco de contaminar e infectar o organismo da mãe, com lesão temporária ou definitiva para a mesma. É por isso que procedimentos de controle de qualidade devem ser sempre atualizados para minimizar os riscos, já que a contaminação pode ser vertical (dos progenitores para o embrião), ou lateral (de uma mulher para outra, durante as intervenções cirúrgicas de coleta de oócitos e de transferência, por exemplo). Um estudo minucioso detectou a colonização e a contaminação do fluido folicular, concluindo que ele não é estéril, podendo ter sido contaminado em procedimentos invasivos anteriores (a própria coleta anterior de oócitos), ou ainda em casos de endometriose e síndrome dos ovários policísticos. Estes microrganismos colonizadores e as respostas imunológicas com produção de citocinas, que se seguem naturalmente no processo infeccioso, diminuíram as taxas de fertilidade (Pelzer *et al*, 2011).

O fator tubário também está relacionado com os resultados em concepção assistida, pois infecções na trompa possuem fácil acesso aos ovários e cavidade peritoneal, além de poder causar lesão definitiva na tuba uterina, o que levaria esta mulher a precisar da reprodução assistida para engravidar. Riscos de infecção pélvica aguda para a mãe, logo após a coleta de ovócitos por via vaginal são discutidos em um estudo de caso. Possível contaminação por bactérias anaeróbicas gram positivas são associadas a esterilidade tubária (Geißdörfer *et al*, 2003; Mendonça *et al*, 2012).

Com esta contaminação conhecida, a identificação microbiológica fornecerá dados para nortear as mudanças nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais, também nos meios de cultivo de embriões para que haja proteção materno-fetal. Com a prevalência contaminante conhecida poderemos analisar a interferência desta sobre o sucesso da reprodução assistida, pois o tipo de contaminação parece variar os resultados. Burrelo *et al* (2004) relata que a *Candida albicans* aumentou a fragmentação do DNA e apoptose no embrião, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida, mas Klein *et al* (2009) relata que nascimentos após a transferência de embriões inseridos em

meios contaminados com leveduras ocorrem dentro das taxas normais de frequência para reprodução assistida, e conclui que a contaminação pelo fungo não é uma razão para cancelar a transferência de embriões.

Os antibióticos penicilina G, estreptomicina e gentamicina estão no mercado dos meios de cultura. Utilizando-se uma solução misturada para lavar os oócitos antes do cultivo ou da criopreservação, contendo 10 vezes mais de antibiótico/antimicótico do que o valor encontrado no meio de cultura, foi possível a conservação da cultura de oócitos por 144 horas sem contaminação, técnica recente, que conta com os antibióticos estreptomicina e penicilina, e o antifúngico anfotericina. (Campos *et al* 2012)

Os antivirais não são aplicados na descontaminação de placas de cultivo de embriões na reprodução assistida, pela dificuldade na detecção viral e identificação dos mesmos. Os vírus podem ser detectados na sorologia exigida pela legislação durante o rastreamento inicial do casal, segundo a legislação e tratados antes dos procedimentos iniciarem. Um composto antiviral conhecido como DB 606 já foi testado em embriões bovinos, indicando que não houve diminuição das taxas de nascimento entre o grupo não tratado e o tratado, o que também não traria benefício para a reprodução humana (Givens *et al*, 2009).

O tipo de técnica utilizada na reprodução assistida também interfere nas taxas de contaminação. Não foram encontrados casos de contaminação em ICSI, onde a seleção e injeção de um único espermatozóide pode reduzir o risco de contaminação (Kastrop *et al*, 2007).

Para FIV a incidência de contaminação nas placas aumenta muito, já que a gota de sêmen sobreposta ao óvulo pode trazer uma série de microorganismos para o embrião a ser desenvolvido nas placas. A técnica que envolve a centrifugação do sêmen diminui drasticamente a contaminação bacteriana (Nicholson *et al*, 2000). Esta técnica é eficaz para reduzir a população microbiana no sêmen e é inofensiva para os espermatozoides (Bielanski, 2007).

A preparação do sêmen pode ser feita com as duas técnicas: swin up e gradiente de densidade, mas nenhuma das duas conseguiu eliminar totalmente os grupos mais encontrados (estreptococos, estafilococos, alguns coliformes) (Nishad, *et al* 2013). Alguns parâmetros seminais de

bacteriospermia e alto índice de leucócitos no sêmen foram correlacionados com a fragmentação do DNA destes espermatozóides. (Domes *et al* 2012)

No que diz respeito à descontaminação do nitrogênio líquido durante o descongelamento de gametas e embriões pela técnica de exposição à radiação Ultra Violeta em 253,7 nm, para obter uma rápida descontaminação microbiana antes da evaporação completa do nitrogênio líquido, o estudo encontrou eficácia para bactérias (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) e fungos (*Aspergillus niger*), patógenos de importância médica e normalmente encontrados em infecção hospitalar (Parmegiani *et al*, 2010). Também com o uso de UV associado a ozônio (O₃) para descontaminar as placas de embrião em incubadoras de crescimento de tecidos e embriões, seria promissor para reduzir o consumo de antibióticos (Davashi *et al* 2013).

Para a reprodução assistida, as taxas de alterações cromossômicas em embriões e fetos por si só aumentam. Anormalidades cromossômicas são encontradas em 60% dos abortos espontâneos, tornando a mais abrangente explicação biológica das falhas em gestações. (Nikitina *et al*, 2005)

Foram encontradas alterações na expressão gênica de embriões derivados de fertilização *in vitro*, sofrendo de estresse fragmentativo, provavelmente controlado pelo gene da P-53, como consequência da subcondição de cultivo. Sugerem que embriões com perfis de expressão que denotam característica morfológica boa e adequada para sua fase de desenvolvimento têm o maior potencial para implantação. (Wells *et al*, 2005)

Em 2010, um estudo longo de casuística elevada abordou as más formações congênitas em crianças nascidas de fertilização assistida, e encontrou um risco aumentado significativo para defeitos congênitos de más formações cardiovasculares e redução dos membros (Kallen *et al*, 2010).

Apesar da contaminação por bactérias e fungos no ambiente laboratorial apresentar baixa prevalência, em média abaixo de 1%, para os laboratórios europeus (Kastrop *et al*, 2007), as condições laboratoriais no Brasil, (especialmente o comprometimento da qualidade e manutenção dos filtros de ar), podem trazer um resultado depreciativo para a evolução da

vida humana já que os índices de fertilidade natural na espécie humana parecem estar diminuindo (Foizer *et al* 2011).

Como não há estudos longitudinais associando doenças com a provável contaminação na fase embriológica em técnicas de reprodução assistida, torna-se difícil a atribuição da contaminação à consequência específica. Doenças estas que possam interferir em qualquer estágio de desenvolvimento do conceito como: dificuldades na implantação, anormalidades cromossômicas, má formações congênitas, aborto, prematuridade; a qualidade dos embriões precisa ser preservada, e mesmo que ainda não possa ser corroborada por estudos em humanos, há evidência de infecção gestacional que prejudica o aparelho reprodutivo e provoca má formação no feto em animais (Junqueira *et al* 2006).

O entendimento sobre as possíveis contaminações endógenas e exógenas, do corpo materno, gametas masculino e feminino e embriões, e seus maus resultados reprodutivos, traz à luz a necessidade do rastreamento e controle dos agentes infecciosos dentro do laboratório de reprodução humana. Com este controle propomos uma análise das taxas de fatores de infertilidade, gametas, fertilização, embriões, implantação, gravidez, abortos e nascimentos em reprodução assistida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a contaminação microbiológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana, e verificar a associação com os resultados perinatais em reprodução assistida, acompanhando o desenvolvimento do conceito.

2.2 Objetivos Específicos

- Fazer uma revisão bibliográfica sobre a contaminação microbiológica e sua interferência no sucesso da reprodução assistida.
- Estabelecer a prevalência de micro-organismos nas placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana de alta complexidade.
- Identificar os agentes de contaminação das placas (bactérias e fungos).
- Avaliar a interferência da contaminação das placas de cultivo embrionário no índice de gravidez e no resultado gestacional.

3. METODOLOGIA

Tipo de pesquisa:

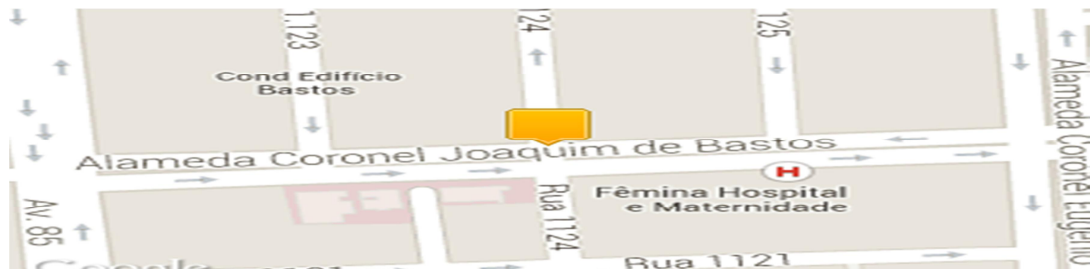
Foi desenvolvida uma pesquisa de caráter observacional, prospectiva, longitudinal, analítica, quantitativa (prevalência). Tipo de Caso Controle, com pareamento nos ítems: Idade materna, Idade paterna, indicação, resposta ovariana, número de embriões manipulados e embriões transferidos.

Critérios de inclusão

Volume considerado alto de manipulações mensais para atender ao número de amostragem necessária, realiza procedimentos de FIV e ICSI, possui um prontuário de dados pré, durante e pós procedimento. Não há critério de exclusão.

Locais de coleta:

Foi realizada a coleta do material para estudo e posterior análise dos prontuários nos laboratórios de Reprodução Humana da clínica Fértil e do Hospital das Clínicas, em Goiânia-Goiás (figura 1). Critérios de inclusão das localidades: parte da pesquisa recuperou prontuários da amostragem referente à pesquisa prévia do mestrado (ano 2009-2010).



[www.guiamais.com.br/343 x 228Pesquisa por imagem](http://www.guiamais.com.br/343x228Pesquisa%20por%20imagem)
Mapa da localização de FERTILE DIAGNOSTICOS



[labrep.hc.ufg.br/750 x 714Pesquisa por imagem](http://labrep.hc.ufg.br/750x714Pesquisa%20por%20imagem)
Mapa Google Lab Reprodução / HC - UFG

Figura 3: localização da Clínica Fértil Diagnósticos, acima e do Hospital das Clínicas, abaixo.

Aspectos Éticos:

Esta pesquisa foi aprovada na Plataforma Brasil, Comitê de Ética em Pesquisa (CONEP) do Hospital das Clínicas, Goiânia -GO, ano de 2013.

Cálculo da amostra:

A amostragem inicial proposta foi de 500 placas, com cálculo amostral baseado em 4,8% de contaminação (Foizer et al 2011), anterior a este trabalho, onde provavelmente se encontraria 25 amostras contaminadas. A recuperação de dados foi possível em 100 placas de amostras do mestrado, de um total de 125. A coleta das placas terminou em junho de 2013, com um total de 470 placas, pois já se tinha alcançado 30 placas contaminadas e o tempo de coleta havia terminado.

Coleta e processamento das placas de embriões:

Os embriões foram cultivados em meio de cultura HTF (Human Tubal Fluid – Irvine Scientific) ou IVF (Meio de cultivo de embriões - Vitrolife). As placas foram preparadas de duas formas: com gotas periféricas de meio de cultivo e cobertas com óleo mineral (Sigma), em placa única, ou placas contendo 6 poças preenchidas com meio de cultivo, com 1 cm cada de diâmetro, e óleo mineral entre as poças da placa (Figura 3). Independente da suspeita de contaminação, todas as placas de embriões, guardadas pelas embriologistas na incubadora após a transferência, foram utilizadas como amostra. O descarte de placas acontecia após a transferência e/ou congelamento dos embriões. As placas eram guardadas por até 24 horas após a transferência, para servirem de amostra.

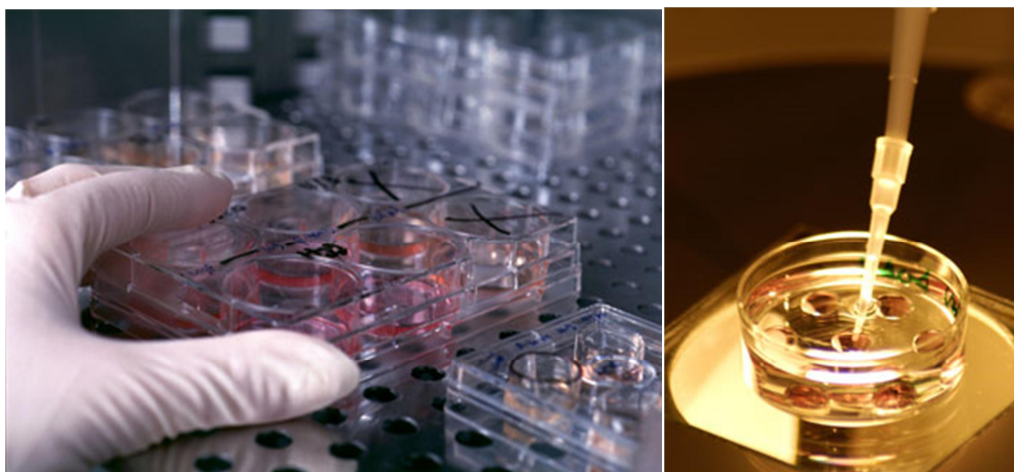


Foto cedida pela clínica Fertile diagnósticos

Figura 4- Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” à esquerda e modo “micro gotas”, à direita.

As amostras eram processadas no laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG, onde analisou-se, primeiramente, a presença de contaminação e posteriormente a identificação do gênero e espécie (quando possível), à medida que os microorganismos eram encontrados nas amostras.

Para analisar a presença de contaminação, foi utilizado o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (Figura 4). Para garantir a esterilidade dos caldos BHI, foram preparados nos tubos de ensaio e autoclavados em seguida. Os meios foram mantidos em geladeira e colocados na estufa 24 horas antes da utilização. Se estivessem pré contaminados, turvariam neste período dentro da estufa e seriam descartados.

Depois de garantida a esterilização, as amostras foram coletadas dentro da câmara de fluxo do próprio LRH, com pipetas estéreis, também autoclavadas e embaladas isoladamente, e inoculadas nestes tubos contendo 5 mL de Caldo BHI (Brain Heart Infusion) para acrescentar os nutrientes de crescimento microbiológico necessários e intensificar o crescimento dos contaminantes, a fim de facilitar a identificação. Eram então transportados em caixas de isopor imediatamente para o laboratório de microbiologia do IPTSP e incubadas por 24-48 horas a 37°C na estufa. Foi retirado todo o meio de cultura disponível nas placas. As amostras que positivaram no caldo BHI foram posteriormente subcultivadas, procedendo os testes específicos de identificação: macro e micromorfológicos,

microcultivos, testes de coloração, testes bioquímicos, descritos abaixo, que baseiam-se na presença ou ausência de substâncias, como enzimas ou produtos do metabolismo do patógeno⁽²⁵⁾.



Foto cedida pelo laboratório de microbiologia do IPTSP-UFG

Figura 5- Meio de cultivo Caldo BHI, esterilizado, e posteriormente turvado (contaminado)

A coleta das placas de estudo foi totalizada no período compreendido entre maio de 2009 e julho de 2013, nas dependências das instituições citadas, de acordo com a disponibilidade do descarte de placas de embriões.

Análise dos prontuários e critérios de avaliação:

Os prontuários foram analisados e seus dados coletados em janeiro e fevereiro de 2014, data em já havia se passado nove meses da última coleta, para que houvesse tempo de nascimento dos conceptos em gestação. Os dados foram coletados dos seguintes fatores: idade materna e paterna, fatores de esterilidade, qualidade e quantidade de óvulos recuperados, qualidade e quantidade de embriões transferidos, se houve ou não gravidez (classificação: gravidez bioquímica, com taxa de beta-HCG > 20UI), se houve aborto e em qual trimestre aconteceu, o tipo de gravidez (única, gemelar, trigemelar) os nascidos vivos e dados do concepto ao nascimento, como: peso, estatura, idade gestacional e caso houvesse, a presença ou suspeita de possíveis síndromes detectadas ao nascimento.

Os ovócitos foram identificados pelas embriologistas, utilizando a visualização em microscopia óptica (invertida), com aumento de 400 vezes com a classificação M1 (imaturos) e M2 (maduros).

A estratégia empregada para a identificação de embriões viáveis foi baseada na avaliação de critérios morfológicos, tais como o número e tamanho das células, a presença de multinucleação, o percentual de fragmentação e a taxa de clivagem (Lathi et al, 2008). Os embriões foram visualizados com microscópio óptico invertido, aumento de 200 vezes, pelas respectivas embriologistas de cada laboratório. A avaliação morfológica foi praticada em todos os laboratórios do estudo e continua a ser o esteio na avaliação do embrião segundo o consenso de Istambul (Balaban et al, 2011).

A classificação para embriões (figura 5), de 2 a 4 dias, com letras A, B, C e D significa:

- Excelente (grau A): embriões com blastômeros de diâmetro similar e número de células ideal para o dia em que se encontra, 0% de fragmentos.
- Boa (grau B): embriões com <25% de fragmentos com blastômeros de diâmetro similar.
- Insuficiente (grau C): embriões com 25-50% de fragmentos com blastômeros de diâmetro desigual . Só se devem transferir embriões C na ausência de embriões A/B
- Má (grau D): embriões com >50% de fragmentos, chances altas de anomalias genéticas.

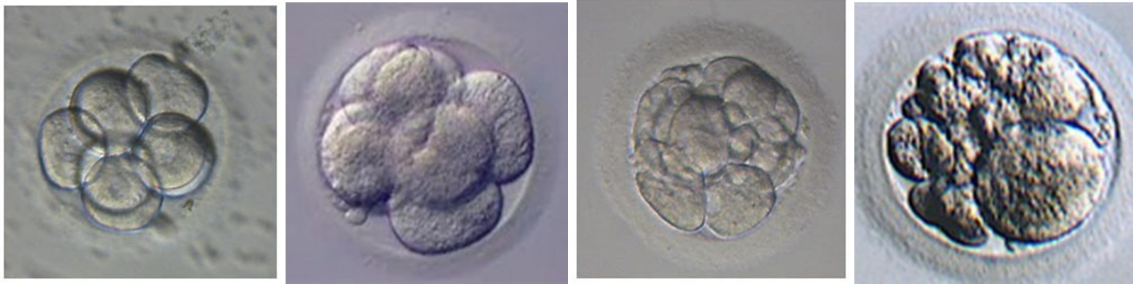
A classificação para blastocisto (figura 6), de 5 a 6 dias, é também com letras A, B, C e D, e significa:

Excelente (grau A): massa celular interna atinge pelo menos 2/3 do raio com ausência de células degenerativas; presença de trofoblasto contínuo e fino sem células degenerativas; presença de zona pelúcida fina.

Boa (grau B): massa celular interna 1/3-2/3 do raio com ausência de células degenerativas; presença de trofoblasto contínuo e fino sem células degenerativas; presença de zona pelúcida fina.

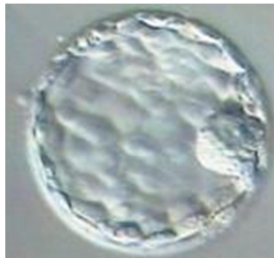
Insuficiente (grau C): massa celular interna 1/3-2/3 do raio e/ou presença de algumas células degenerativas; trofoblasto mal diferenciado (descontínuo, ou espesso ou com células degenerativas); zona pelúcida espessa. Pouco encontrado.

Má (grau D): massa celular interna <math><1/3</math> do raio; presença de múltiplas células degenerativas; trofoblasto mal diferenciado (descontínuo, ou espesso ou com múltiplas células degenerativas); zona pelúcida espessa. Pouco encontrado.



<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.bebedeproveta.com.br%2Ftransferencia.htm&ei=Tk4KVd6kK4mLNpn4gvgE&bvm=bv.88528373,d.eXY&psig=AFQjCNF1NKvQ5wGbvYKmgdhs7IDWKLWfQA&ust=1426825145688681>

Figura 6—embriões de classificação A, B, C e D, respectivamente. Visualização em microscopia óptica, aumento de 200 vezes.



<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.bebedeproveta.com.br%2Ftransferencia.htm&ei=Tk4KVd6kK4mLNpn4gvgE&bvm=bv.88528373,d.eXY&psig=AFQjCNF1NKvQ5wGbvYKmgdhs7IDWKLWfQA&ust=1426825145688681>

Figura 7—Blastocistos de classificação A. Visualização em microscopia óptica, aumento de 200 vezes.

Não houve repetição da amostra durante a coleta de dados, mesmo que houvesse várias placas por paciente (mães). Quando um paciente teve múltiplos embriões em duas ou mais placas, meios BHI foram colocados em tubos separados, mas, se a contaminação fosse confirmada em pelo menos uma das placas, o paciente seria adicionado ao grupo contaminado. Não havendo contaminação em qualquer uma das placas, o paciente seria considerado no grupo não contaminado. Um caso de contaminação em uma das duas placas da mesma paciente foi descartado porque não se sabia de qual o embrião era proveniente. Uma dupla contaminação (*E. coli* e *Aspergillus*) em placa única foi considerada a contaminação bacteriana

inicial, porque o fungo apareceu alguns dias mais tarde e já foi em microcultivo de crescimento lento.

Testes estatísticos:

Para as análises de competência estatística, realizada entre março e junho de 2014, os dados foram digitados em software Excel e analisados no SPSS17.0 (Statistical Package for Social Science). Os resultados foram apresentados com valor absoluto (f) e valor percentual (%). O teste Qui-quadrado e Fisher foram usados para verificar a existência ou não de diferença significativa entre as placas contaminadas e não contaminadas, em relação aos vários fatores estudados. A regressão logística univariada foi usada para verificar a possível existência de correlação entre o insucesso na gestação e a contaminação das placas. Foi considerado nível de 95% de confiança, ou seja, $p < 0,05$. Foi calculado o ODDS RATIO da exposição microbiana da placa com a ausência gestacional e com a perda gestacional, além de acompanhar os resultados da regressão que foram significativos.

Testes bioquímicos nos contaminantes encontrados:

Os testes bioquímicos baseiam-se na presença ou ausência de substâncias, sejam elas enzimas ou produtos do metabolismo bacteriano, sendo identificadas por métodos químicos, como indicadores de pH e mudança de coloração (Koneman, 2008), (Figura7).

As amostras em que foram encontradas contaminação foram coradas com método gram, em seguida separadas e subcultivadas no meios de cultura MacConkey, Ágar Manitol Salgado e Ágar Nutriente (Figura 8).

Na amostra contaminada por *Klebsiella sp*, houve crescimento no MacConkey, indicando a presença de bastonetes gram negativos. Passou-se para o TAF (tríplice açúcar ferro) com o indicador de pH Vermelho de Fenol, que fermentou apenas a glicose. Na leitura, o TAF apresentou inclinação alcalina (vermelha), fundo ácido (amarelo). Não houve degradação de sacarose, lactose e manitol. A produção de gás CO² pela fermentação, no ambiente anaeróbio inferior do tubo do TAF, foi elevada. No meio SIM, para detecção da produção do Indol (um produto de degradação do aminoácido triptofano), não apareceu a cor vermelha na parte superior do

tubo, indicando que não houve a produção de indol, não detectou-se a motilidade bacteriana (para a motilidade com a presença de flagelos, o meio contendo tetrazólio induz o aparecimento de rastros de cor vermelha, que ajuda a seguir a disseminação da bactéria a partir da linha de inoculação, em uma análise macroscópica), nem a produção de ácido sulfídrico (enxofre é liberado a partir da degradação de aminoácidos, com produção de precipitado negro, sulfeto de metal pesado insolúvel) como corpo de fundo no tubo. O teste foi realizado com o indicador de pH Vermelho de Metila, e o resultado foi negativo, já que não houve mudança de cor, pois a quantidade mínima de ácidos produzidos foi insuficiente para reduzir o pH, característico da família Enterobacteriaceae. No meio para Citrato, que determina a capacidade de utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono metabólico, ocorreu a produção de uma cor azul no meio, indicando resultado positivo, com presença de produtos alcalinos. No meio para fenilalanina, o aparecimento do ácido fenilpirúvico indica a degradação da fenilalanina pela enzima fenilalanina desaminase, que foi negativo. Caso fosse positivo, surgiria uma cor verde após a adição do reativo Cloreto férrico. No meio ágar ureia de Christensen para urease, a mudança de cor de rosa para vermelho indica a positividade. A superfície inclinada torna-se vermelha, em uma reação alcalina, indicando que o microorganismo hidrolisa a uréia, liberando amônia e produzindo mudança de cor vermelho rosado no meio.

Na amostra contaminada por bactérias do gênero *Enterobacter*, procedeu-se da mesma forma da *Klebsiella*, que se diferenciam apenas nos testes do TAF, que fermentou a glicose a lactose e a sacarose; no teste para urease, que foi negativo e não hidrolisa a uréia e no teste de motilidade, que foi positivo.

Na amostra contaminada por *Pseudomonas*, houve crescimento no MacConkey, indicando a presença de bastonetes gram negativos. Passou-se para o TAF, com o indicador de pH Vermelho de Fenol, onde não houve fermentação de glicose, de sacarose, de lactose e de manitol. A cor vermelha de inclinação alcalina permaneceu inalterada. No meio SIM, não houve motilidade, nem produção de indol e de ácido sulfídrico, negativo para os tres quesitos. No teste para urease, não houve mudança de cor, sendo

negativo. Positivo para citrato, com a produção de substâncias alcalina e coloração azulada no teste.

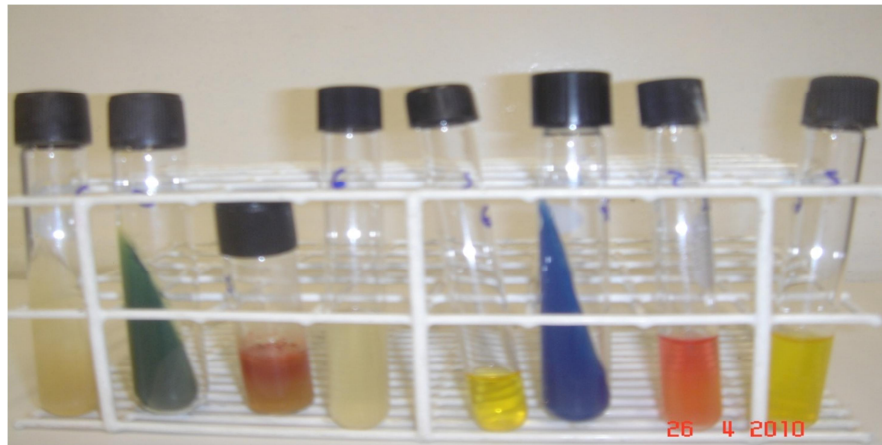
Nas amostras contaminadas por *Escherichia coli*, houve crescimento no MacConkey, indicando a presença de bastonetes gram negativos. A leitura do TAF revelou fermentação para glicose, sacarose, lactose e manitol, com mudança de cor de vermelho para amarelo, em todas as partes do tubo. Houve produção de gás. Positivo para vermelho de metila. No meio SIM, positivo para motilidade, positivo para produção de indol e negativo para produção de ácido sulfídrico. Não houve hidrolização da uréia, sendo negativo no meio contendo uréia. Não houve a utilização do citrato de sódio como fonte de carbono, sem mudança de cor, de caráter negativo. Negativo para degradação da fenilalanina.

Para a identificação das amostras contaminadas que cresceram em Agar Manitol, foram identificados cocos gram positivos do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus*, o meio manitol foi modificado, adicionando entre outros componentes, o vermelho de fenol como indicador de pH. *Staphylococcus sp* tornou o meio amarelo em condições ácidas pela fermentação do manitol. O teste da catalase, realizado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre uma lâmina com as colônias, foi positivo pois houve o borbulhamento, devido à liberação do oxigênio. O teste da coagulase, que consiste em juntar num tubo de ensaio contendo plasma sanguíneo e uma suspensão das colônias e esperar que coagulem pelas enzimas bacterianas, foi positiva. *Streptococcus sp*, teve o teste da catalase negativo (Figuras 7 e 10).

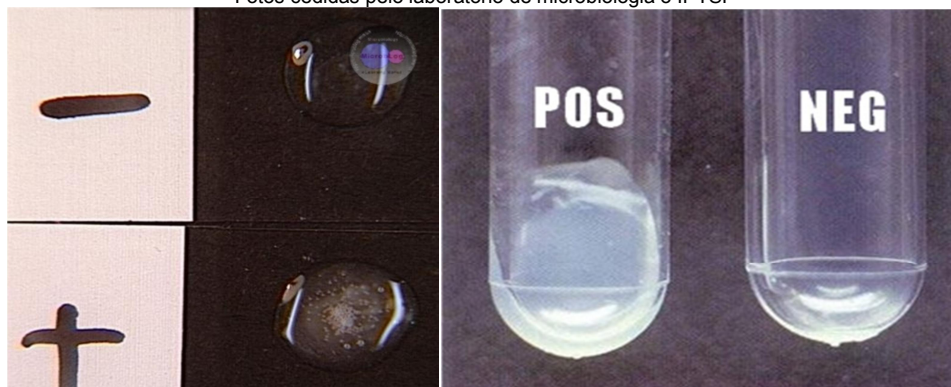
As amostras que apareceram com *Bacillus* grampositivos, cresceram no meio manitol. No método gram, todas apresentavam coloração roxa e organizavam-se também sob a forma de estreptobacilos. São grandes bactérias, presentes no ar, no solo, na água e indicam contaminação ambiental, com ausência de espécies de importância médica. (Figura 9)

Na amostra contaminada por fungos leveduras (Figura 11), houve crescimento de colônia brancas e leitosas no ágar nutriente com antibióticos, e no gram, foi observado a presença de células eucariontes, bastante coradas ao microscópio, unicelulares.

As amostras contaminadas por fungos filamentosos foram cultivadas no ágar nutriente com antibióticos, para isolar as colônias, e subcultivada em microcultivo, para detectar o tipo de corpo de frutificação, com visão microscópica das hifas. A técnica do microcultivo consiste em retirar um pedaço da cultura do bolor e semear nos 4 cantos do quadrado de agar batata que está depositado sobre a lâmina de vidro, cobrir o material semeado com lamínula, colocar um tubo de água estéril no fundo da placa para umedecer o papel de filtro, incubar à 25^oC por 7 a 14 dias. Então procedeu-se a identificação do tipo de fungo. Foram identificados 3 tipos fúngicos: *Aspergillus sp* (figura 12), *Penicilium sp* (figura 13) e *Thichophyton rubrum*(figura 14)

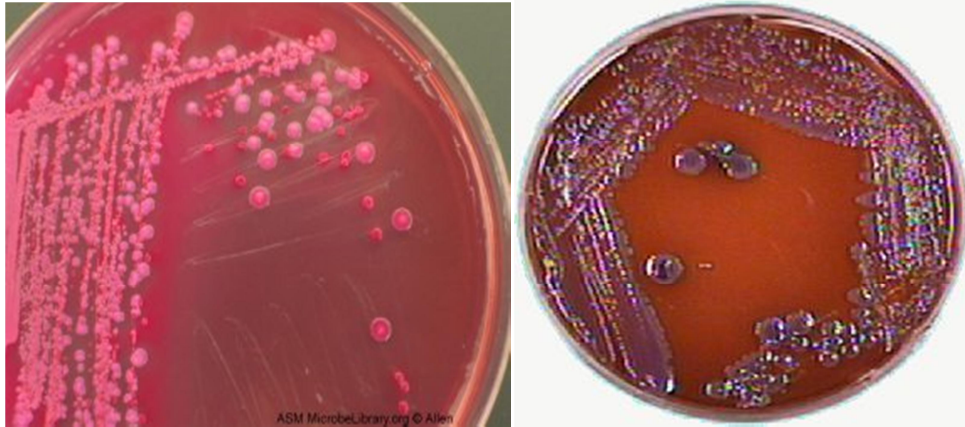


Fotos cedidas pelo laboratório de microbiologia o IPTSP



<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.bebedeproveta.com.br%2Ftransferencia.htm&ei=Tk4KVd6kK4mLNpn4gvgE&bvm=bv.88528373,d.eXY&psig=AFQjCNF1NKvQ5wGbvYKmgdhs7IDWKLWfQA&ust=1426825145688681>

Figura 8- Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de Bactérias bastonetes gram negativos (acima), teste da catalase (abaixo e esquerda) e da coagulase (abaixo e direita) laboratório do IPTSP-UFG, Goiânia-GO.



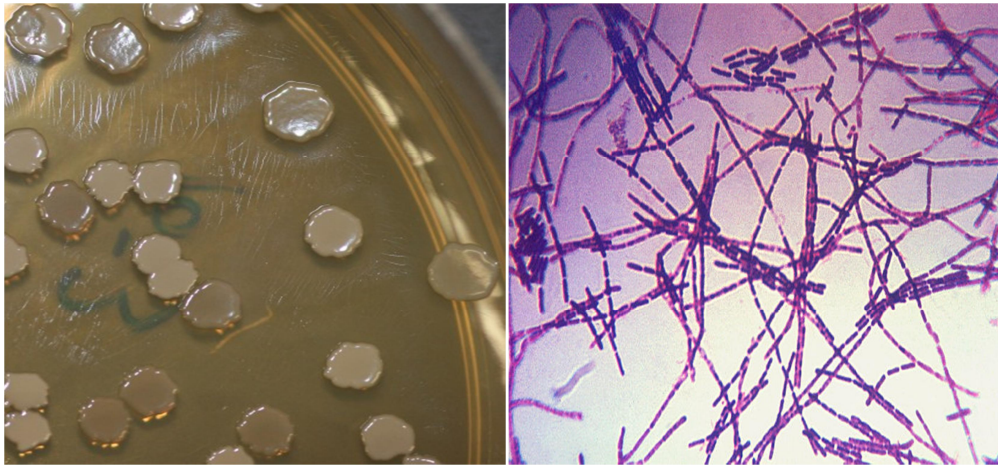
www.lookfordiagnosis.com1024 x 768 Pesquisa por imagem0c57d3e0838ebd1590280e5e9ba3b0



<http://www.keepourfoodsafes.org/2011/06/what-is-e-coli/>

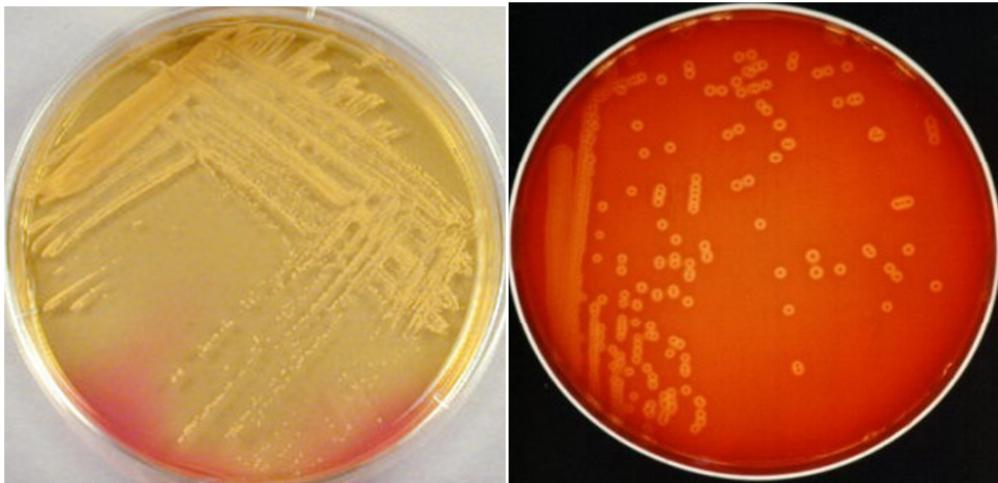
http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fbcmuladech.wikispaces.com%2FPseudomona&ei=zVAKVf6PJ8iqNtHigOAM&psig=AFQjCNFUyMiLV0AoB8kqZgHgy4a7M15_A&ust=1426825797692954

Figura 9- Placas de colônias de *Klebsiella sp* (à esquerda, acima), *Enterobacter sp* (à direita, acima), *Escherichia coli* (à esquerda, abaixo) e *Pseudomonas sp*(à direita, abaixo).



<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.infoescola.com%2F Reino-monera%2Fbacillus-subtilis%2F&ei=Y1EKVf-EJ4ibNsr9g2A&psig=AFQjCNF5uaHn0RWJbKaIVBxSaWi2Y4ID3w&ust=1426825938213174>

Figura 10 – Placas de colônias de *Bacillus* gram positivos em colônias (à esquerda), foto de microscopia óptica, aumento de 1000 vezes, com coloração Gram positiva



<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fcbtis7bacteriologia.blogspot.com%2F&ei=tVEKVZbEKYyqNorFgYgO&psig=AFQjCNHswTAcZRLbBhqL1dQJbW-YhzSBw&ust=1426826015720200>

<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fcbtis7bacteriologia.blogspot.com%2F&ei=tVEKVZbEKYyqNorFgYgO&psig=AFQjCNHswTAcZRLbBhqL1dQJbW-YhzSBw&ust=1426826015720200>

Figura 11 – Placas de colônias de *coccus* gram positivos, *Staphylococcus sp* à esquerda e *Streptococcus sp* à direita.

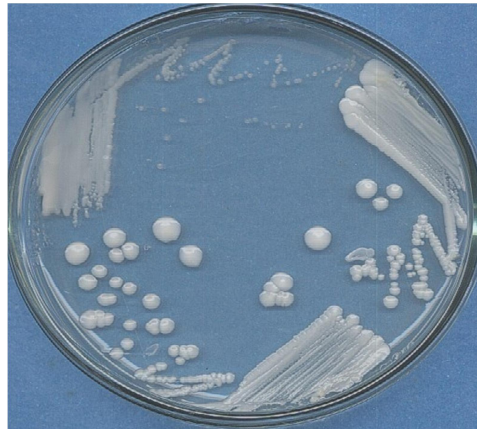


Foto cedida pelo laboratório de microbiologia o IPTSP

Figura 11–Placas de colônias de levedura, de coloração branca e leitosa.

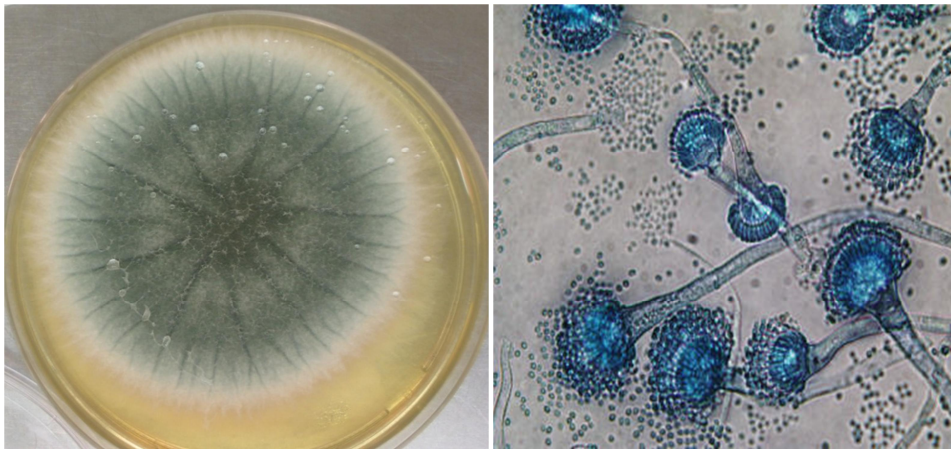


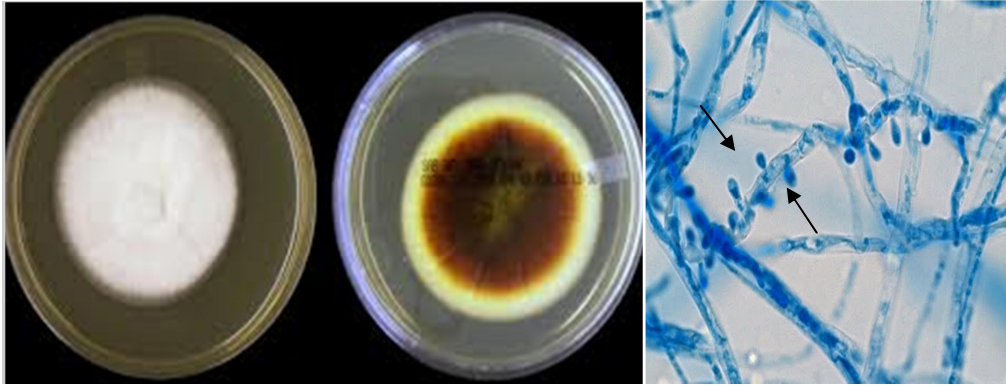
Foto cedida pelo laboratório de micologia o IPTSP

Figura 12 – Placa de colônia de *Aspergillus sp* (esquerda) e corpo de frutificação microscópico em forma de conídio agrupado, aumento de 400 vezes (direita).



http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.perubiotec.org%2FContenido5Novum%2FNovedades5.php&ei=MIMKVYb0F4ikgwS6yIPoAQ&psig=AFQjCNE6jeujTsA0MHU13SdybFOAb3L_EA&ust=1426826404034881

Figura 13–Placa de colônia de *Penicillium sp* (esquerda) e o corpo de frutificação microscópico em forma de conídio isolado (direita).



<http://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=&url=http%3A%2F%2Fimgarcade.com%2F1%2Fepidermophytonfloccosumreverse%2F&ei=01MKVdS6GYGnggSvYLAQ&psig=AFQjCNFtejVhaGbu0LMYqBJwAWy6ZQALdA&ust=1426826579766217>

Figura 14 – Placas de colônias de *Trichophyton rubrum* com mudança de cor de branco para rubro (nas placas à esquerda) e o microconídio (corpo de frutificação à direita).

4. RESULTADOS

4.1 PUBLICAÇÕES

4.1.1 ARTIGO 1

4.1.2 ARTIGO 2

4.1.1ARTIGO 1

(Publicado pela revista reprodução e climatério- SBRH, editora Elsevier,
em 28 de agosto de 2014)

Contaminação microbiológica em laboratório de reprodução humana e suas implicações no sucesso da reprodução assistida

Microbial contamination in human reproduction laboratory and its implications on the success of human reproduction

Barbara Rosa Ribeiro Foizer^{1,4}

Kênia Rodrigues da Silva²

José Daniel Gonçalves Vieira³

Waldemar Naves do Amaral^{4,5}

¹Universidade Salgado de Oliveira.

²Maternidade Dona Íris

³Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG).

⁴Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Goiás(UFG).

⁵Sociedade Brasileira de Ultrasonografia (SBUS).

Trabalho desenvolvido no programa de Pós graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, departamento de ginecologia e obstetrícia. Instituições fomentadoras: Fértil diagnóstico, IPTSP (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública).

Autor para correspondência

Barbara Rosa Ribeiro Foizer

Rua das Quaresmeiras, quadra11, lote 25, Jardim Valência, Goiânia, GO, CEP 74885-869
e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br

Conflito de interesses

não há conflito de interesse neste estudo.

Resumo

A contaminação pode estar presente nas placas de cultivo de embriões advinda de várias origens, haja vista que os materiais coletados masculino e feminino não podem ser esterilizados. Esta contaminação pode comprometer a viabilidade dos embriões, causar infecção gestacional, trazer má formação fetal. Fungicidas e bactericidas são acrescentados aos meios de cultura na tentativa de conter este crescimento microbológico. Outros métodos preventivos ainda em estudo devem ser avaliados. A contaminação deve ser identificada, para nortear a legislação vigente que regulamenta os protocolos executados durante a reprodução assistida, para garantir a proteção materno-fetal contra microrganismos de importância patogênica. Deve-se avaliar a interferência da contaminação para os embriões e fetos, na tentativa de se estabelecer causas e consequências específicas.

Palavras-chave

Contaminação biológica, laboratórios, desenvolvimento embrionário, gravidez, fertilização.

Abstract

Contamination in embryo culture dishes can be caused by several sources because the materials collected from men and women cannot be sterilized. This contamination can compromise embryo viability and cause gestational infection and fetal malformation. Fungicides and bactericides are added to the culture media in an attempt to contain this microbial growth. Other preventive methods

that are still being investigated should be evaluated. The contamination must be identified to guide current legislation that regulates the protocols performed during assisted reproduction to ensure maternal and fetal protection against pathogenic microorganisms. The impact of contamination on embryos and fetuses should be evaluated in an attempt to establish specific causes and consequences.

Keywords: Biological contamination, laboratories, Embryonic development, Pregnancy, Fertilization.

Introdução

O decréscimo da fertilidade é um inevitável fato biológico, aliado à maternidade tardia. A técnica de fertilização in vitro (FIV) avançou nestas últimas três décadas para ajudar os casais a resolverem o problema da infertilidade. Dado histórico relatado¹, o bebê Louise Brown foi o primeiro a nascer de FIV. Na FIV, os embriões são formados e cultivados fora do corpo da mulher, em placas de cultivo, graças ao avanço dos meios de cultura e estufas, que oferecem os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento dos embriões. Estas placas são o melhor local de coleta para verificar se há contaminação microbiológica eminente, pois os vários fatores prováveis de contaminação confluem todos para elas, o que interfere diretamente nas taxas de gestações e nascimentos.

Em laboratórios de reprodução humana o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta destes influi diretamente nos resultados, principalmente porque o líquido folicular e o sêmen podem sofrer contaminação e não podem ser esterilizados. Cada passo nos procedimentos e manipulações laboratoriais devem ser executados com técnicas de assepsia rigorosamente protocoladas.²

A exata frequência destas contaminações microbiológicas e a interferência nos resultados em reprodução assistida não são consenso entre os autores.³ Desde 1997, contaminações microbiológicas em meios de cultura têm sido rotineiramente registradas, contribuindo diretamente nos resultados gestacionais em fertilização assistida.⁴

As principais causas desta contaminação vêm sendo associadas à infecção nos tratos genitais masculino e feminino e à própria microbiota local, com consequente contaminação dos ovócitos e embriões. Estes, quando transferidos para o útero, podem causar infecções que poderão comprometer sua implantação e sobrevivência durante a gestação, também causando prejuízos maternos. A contaminação pode vir ainda do ar, de maquinários e de materiais utilizados.² Com isso, se estabelece a importância da pesquisa de microrganismos em fertilização assistida durante todo o processo, iniciando na manipulação de gametas, embriões e transferências.

Legislação vigente para os laboratórios de reprodução humana

Os diversos tipos de agentes contaminantes que afetam os resultados em reprodução assistida podem ser detidos ou minimizados com a execução de protocolos testados cientificamente e exigidos por lei.⁵ Os laboratórios de reprodução humana (LRH) devem conter câmara de fluxo positiva, filtros de ar e todos os cuidados de assepsia e descontaminação. O ambiente de micromanipulação de gametas não deve possuir qualquer instalação hidrossanitária, como pias, ralos ou lavatórios. O sistema de climatização deve manter pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes, controle da temperatura entre 21 a 24°C, umidade relativa do ar entre 40 e 60%, vazão mínima de ar total de $45(\text{m}^3/\text{h})/\text{m}^2$, vazão mínima de ar exterior de $15(\text{m}^3/\text{h})/\text{m}^2$, e filtragem mínima no insulfamento com filtros G3+carvão ativado+F8.

São usados filtros de ar como o HEPA e o de carvão ativado para substâncias orgânicas voláteis. Os filtros de ar devem ser particulados de alta eficiência, ou filtros de ar de ultrabaixa penetração. Este ar terá acesso às incubadoras dependendo do tipo (aquelas com mistura de 5% de CO_2 e 95% de ar, por exemplo), que devem passar por dois testes consecutivos com embriões de camundongos antes de serem usadas nos procedimentos.⁶

As incubadoras devem ser usadas no máximo para três pacientes. Aquelas menores estabilizam-se mais rapidamente quando abertas e devem conter termômetros verificados diariamente, assim como o CO_2 . As mais novas apresentam maior taxa de gestação.⁶ Como a qualidade do ar é um dos fatores mais importantes do laboratório, sua avaliação deve ser um procedimento de rotina. Semestralmente, a antecâmara e o laboratório devem ser submetidos à contagem de partículas e à verificação do fluxo de ar por uma agência certificada. Se necessário, os filtros de teto deverão ser trocados a cada três meses.

A manipulação das amostras somente deve ser efetuada em uma área limpa classificada, no mínimo, como ISO Classe 5, segundo a norma NBR/ISO 14644-1 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), com cabine de segurança biológica Classe II Tipo A, módulo de fluxo

unidirecional ou de fluxo laminar, segundo as orientações da NBR/ISO 14644-4 da ABNT. Neste caso, o banco de células e tecidos germinativos deve, obrigatoriamente, possuir antecâmara de acesso à sala de processamento, além do vestiário de paramentação. Deve conter congelador com temperatura igual ou inferior a 135°C negativos, com registro automático da temperatura e exclusivo para o armazenamento de células e tecidos germinativos liberados para uso, ou reservatório ou contêiner adequado para nitrogênio líquido e exclusivo para o armazenamento de células e tecidos germinativos.

A triagem sorológica dos pacientes, segundo a legislação, deve ser realizada no mínimo para as seguintes doenças infectocontagiosas: sífilis, hepatite B (HBsAg e anti-HBc), hepatite C (anti-HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV 1 e 2), vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV I e II), citomegalovírus e clamídia.

No caso de sêmen ou de oócito criopreservado, a liberação da amostra só ocorrerá após os testes sorológicos serem repetidos em prazo nunca inferior a seis meses. Na primeira coleta de amostra de sêmen deve ser realizada triagem microbiológica, com exames para detecção de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae* e bactérias aeróbias. Estes testes devem ter resultado negativo para patógenos seminais antes da liberação da amostra. Para os profissionais no laboratório de FIV recomenda-se a vacinação contra doenças virais e bacterianas, abordando pacientes e manejando amostras (fluidos corporais, fluido folicular ou sêmen) como potenciais fontes de infecção.⁷

Para os meios de cultivo deve-se observar o prazo de validade e instalações apropriadas para o armazenamento. Não utilizar o soro ou fluido folicular dos doadores como aditivos para os meios de cultura. O uso de óleo mineral pré-equilibrado ajudará a manter a temperatura, a pressão osmótica e o pH. Deve haver protocolos de funcionamento, calibração, limpeza e de emergência com condutas em caso de pane, com sistema de back-up elétrico para os principais equipamentos.

Semelhante à legislação brasileira, a legislação europeia também é citada em teses de controle de qualidade em LRH e a preocupação é

promover o maior nível de segurança possível para garantir a saúde pública.⁸

Principais fontes de contaminação e prevalência

Todo material biológico deve ser tratado como ponto inicial de contaminação.⁶ Doenças do aparelho reprodutor masculino e feminino também podem ser fonte de contaminação. Segundo Cottell et al. (1997)⁴, foram encontrados e cultivados micro-organismos de vários loci em aproximadamente 50% dos casos de FIV. Fluido seminal e líquido folicular são fontes potenciais de contaminação microbiológica.⁴

Candida albicans é uma levedura muito encontrada entre os microrganismos do trato genital feminino e masculino. Este fungo, também verificado nas contaminações dos laboratórios de reprodução assistida, pode ser proveniente dos pacientes submetidos à FIV e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Vários autores relatam ter encontrado leveduras em seus estudos, avaliando vários aspectos de comprometimento dos resultados em fertilização assistida.⁹⁻¹¹

Bactérias também são participantes da microbiota do trato genital. A confirmação da presença de células vaginais no fluido folicular durante a punção transvaginal para recrutamento de oócitos, em maior porcentagem nos folículos inicialmente puncionados, sugere a possibilidade de contaminação pelo meio vaginal.¹² Conhecido este tipo de contaminação, os procedimentos envolvem a utilização de antibióticos no sêmen e na cultura de embriões. Penicilina, estreptomicina e gentamicina vêm sendo utilizados com resultados promissores, com 95% de eliminação de bactérias.⁴

A doença inflamatória pélvica é causada por vários agentes, entre eles a *Neisseriagonorrhoeae*, diplococo gram-negativo aeróbico facultativo. A uretrite pode ser causada pela *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. A sífilis é causada pelo *Treponema pallidum*, o cancro mole pelo *Haemophilus ducreyi* e o linfogranuloma venéreo pela *Chlamydia trachomatis*. A vaginose bacteriana, com alteração da flora, é causada por vários agentes, entre eles a *Gardnerella vaginalis*, relacionada

a resistência ao metronidazol e à doxaciiclina, o que demonstra a vulnerabilidade da dependência de antibióticos.¹³

Outro veículo contaminante é o ar, quando os LRH não trabalham com filtros de ar compatíveis com a descontaminação efetiva da sala de embriologia. Bactérias comumente encontradas nestas condições correspondem, principalmente, ao gênero *Bacillus*, *Streptobacillus* gram-positivos de grande porte e sem importância médica. Fungos como do gênero *Aspergillus* são encontrados nas placas, provavelmente vindos do óleo mineral contaminado usado para sobreposição das gotas do meio de cultura. São fungos ambientais contaminantes do ar os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.¹⁴

Em medicina reprodutiva existe risco significativo de contaminação cruzada durante a criopreservação de gametas ou embriões. Em estudo de revisão, conclui-se que há um risco negligenciado de contaminação cruzada em condições de FIV.¹⁵ Encontrou-se relação entre infertilidade e vírus da hepatite C em um grupo de casais inférteis, com prevalência de 3,2% para as mulheres e 3,6% para os homens¹⁶, que pode ser transmitida de uma mulher para outra pela contaminação transvaginal por equipamentos ou dos pais para o conceito. Recomendou-se que pacientes inférteis fossem rastreados antes de submetidos a técnicas de reprodução assistida.

Kastrop et al. (2007)¹⁴ descrevem incidência de 0,67% de contaminação nos LRH europeus. A amostra envolveu mais de 13.000 casos.¹⁴ Um estudo de prevalência no Brasil encontrou 4,8% de contaminação nas placas por bactérias e fungos, considerando a contaminação como fator de contribuição do fracasso em reprodução assistida.¹⁷

Medidas preventivas em estudo

Com a prevalência de contaminação conhecida e com os gêneros identificados, poder-se analisar a interferência desta sobre o sucesso da reprodução assistida, pois o tipo de contaminação parece variar os resultados. Autores também divergem em seus resultados. *Candida albicans* aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter

causado fracasso após a fertilização.¹⁹ Outros autores relatam que nascimentos após a transferência de embriões inseridos em meios contaminados com leveduras ocorrem dentro das taxas normais de frequência para reprodução assistida, concluindo que a contaminação pelo fungo não é razão para cancelar a transferência de embriões.¹¹

A primeira consequência observada, quando contaminados com patógenos, está na redução da formação de embriões viáveis para transferência. Os embriões podem não sobreviver nas primeiras clivagens, apresentar teratogenia, ou simplesmente não conseguem implantar no útero. Também podem ocorrer síndromes que comprometam a saúde fetal, trazendo a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, ou nascimento de conceptos inapetentes e incompatíveis com a idade gestacional, descritos em estudos com bovinos onde a fertilização assistida é amplamente utilizada.¹⁸ Em outra vertente, existe o risco de infectar o organismo materno, com consequências temporárias ou definitivas.

Os procedimentos de controle de qualidade devem ser sempre atualizados para minimizar esses riscos, já que a contaminação pode ser vertical (dos progenitores para o embrião), ou lateral (de uma mulher para outra). Um trabalho minucioso detectou a colonização e a contaminação do fluído folicular, concluindo que ele não é estéril, podendo ter sido contaminado em procedimentos invasivos anteriores (a própria coleta anterior de ovócitos). Estes microrganismos colonizadores e as respostas imunológicas com produção de citocinas que se seguem naturalmente no processo infeccioso diminuiriam as taxas de sucesso.¹⁹

As infecções tubárias podem ser relacionadas aos ovários e cavidade peritoneal, além de poder causar lesão definitiva na tuba uterina, o que faz mulheres procurarem serviços de reprodução assistida. Riscos de infecção pélvica aguda para a mãe após a coleta de ovócitos por via vaginal são discutidos em um estudo de caso. História de violência sexual, sorologia positiva para o HIV e infecção por *Chlamydia* foram fatores preditivos para a infertilidade por fator tubário.²⁰

A investigação viral nas placas, por sua vez, é bem mais complexa. Os vírus específicos são detectados na sorologia exigida durante o rastreamento inicial do casal. Um composto antiviral conhecido como DB

606 foi testado em embriões bovinos, indicando que não houve diminuição das taxas de nascimento entre o grupo não tratado e o tratado.²¹

A técnica utilizada na reprodução assistida também interfere nas taxas de contaminação. Segundo Kastrop et al. (2007)¹⁴, não foram encontrados casos de contaminação em ICSI e a seleção de uma única injeção de espermatozoide pode reduzir o risco de contaminação.¹⁴ A técnica que envolve gradiente de centrifugação do sêmen diminui drasticamente a contaminação bacteriana.²² Esta técnica é eficaz para reduzir a população microbiana no sêmen e inofensiva para os espermatozoides.²³ A preparação do sêmen pode ser feita por “*swin up*” ou gradiente de densidade, mas nenhuma delas conseguiu eliminar totalmente os grupos mais encontrados, como estreptococos, estafilococos e coliformes.²⁴ Alguns parâmetros seminais de bacteriospermia e alto índice de leucócitos no sêmen foram relacionados com a fragmentação do DNA dos espermatozoides.²⁵

No que diz respeito à descontaminação do nitrogênio líquido durante o descongelamento de gametas e embriões pela técnica de exposição à radiação UV em 253,7 nm para obter rápida descontaminação microbiana antes da evaporação completa do nitrogênio líquido, estudo de Parmegiani et al. (2010)²⁶ encontrou eficácia para bactérias (*Stenotrophomonasmaltophilia*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Escherichia coli*) e fungos (*Aspergillusniger*), patógenos de importância médica e normalmente encontrados em infecção hospitalar.²⁶ Campos et al. (2012)²⁷ descrevem o uso de solução para lavar os ovócitos antes do cultivo ou da criopreservação contendo dez vezes mais antibiótico/antimicótico do que o valor encontrado no meio de cultura, conservando a cultura de ovócitos por 144 horas sem contaminação, técnica recente que usa estreptomina, penicilina e anfotericina.²⁷

Anormalidades cromossômicas são encontradas em 60% dos abortos espontâneos, tornando a mais abrangente explicação biológica das falhas em gestações.²⁸ Foram encontradas alterações na expressão gênica de embriões derivados de FIV, sofrendo estresse fragmentativo provavelmente controlado pelo gene P-53 como consequência da subcondição de cultivo. Há evidências de que embriões com perfis de expressão que denotam

característica morfológica boa e adequada para fase de desenvolvimento têm maior potencial para implantação.²⁹

Em 2010, um estudo longo de casuística elevada abordou as más formações congênitas em crianças nascidas de fertilização assistida e encontrou risco aumentado para defeitos congênitos cardiovasculares e redução de membros.³⁰ Não houve investigação das causas das anormalidades, mas as técnicas em FIV são suscetíveis à contaminação, em várias etapas. Apesar da contaminação por bactérias e fungos no ambiente laboratorial apresentar baixa prevalência, em média abaixo de 1% nos laboratórios europeus¹⁴, as condições laboratoriais no Brasil, especialmente o comprometimento da qualidade e manutenção dos filtros de ar, podem trazer um resultado depreciativo na reprodução assistida.

Conclusões

Como não há estudos associando doenças com a contaminação embrionária em técnicas de reprodução assistida, torna-se difícil a atribuição da contaminação à consequência específica. Mesmo que não possa ser corroborada por estudos em humanos, há evidência de infecção gestacional que prejudica o aparelho reprodutivo e provoca má formação em fetos de bovinos.¹⁸ O entendimento sobre as possíveis contaminações endógenas e exógenas do corpo materno, gametas masculino e feminino e embriões, traz à luz a necessidade do rastreamento e controle dos agentes infecciosos dentro do LRH, a fim de estabelecer associação entre contaminação microbiológica e sucesso na reprodução assistida.

Referências

1. Antunes-Júnior N, Badra GH, Cordts EB, Carvalho WAP, Wolff P, Barbosa CP, et al. Fertilização *in vitro* com ciclos programados de baixo custo-avaliação de resultados iniciais de um centro de reprodução humana de hospital de ensino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2003;25(9):679-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032003000900010>.
2. Elder K, Baker D, Ribes J. Infections, infertility and assisted reproduction. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2005.
3. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawzy M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an *in vitro* fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril.* 1996; 66(5):776-780.
4. Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. Processing of semen in an antibiotic-rich medium to minimize microbial presence during *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1997;67(1):98-103.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde [homepage: www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/13647-33]. Resolução RDC nº 33, de 17 de fevereiro de 2006. Aprova o Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos [acesso em 27/7/14]. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/13647-33>.
6. Nagy ZP, Greco E. Construção do laboratório de fertilização *in vitro*. In: Dzik A, Pereira DM, Cavagna M, Amaral W(editors). *Tratado de Reprodução Assistida*. São Paulo: Segmento Pharma; 2010. p.295-309.
7. Mizrahi FE, Antunes-Júnior N, Busso RE. Indicadores de qualidade de laboratórios de reprodução assistida. In: Dzik A, Pereira DM, Cavagna M, Amaral W(editors). *Tratado de Reprodução Assistida*. São Paulo: Segmento Pharma; 2010. p.311-26.
8. Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(2):162-76.
9. Ben-Chetrit A, Shen O, Haran E, Brooks B, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. *Fertil Steril.* 1996;66(2):335-37.
10. Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans*: a case report. *Reprod Biomed Online.* 2004;8(5):569-73.

11. KleinJU, Missmer SA, Jackson KV, Orasanu B, Fox JH, Racowsky C. In vitro fertilization outcomes after transfer of embryos contaminated with yeast. *Fertil Steril*. 2009;91(1):294-29. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.032.
12. Teixeira AMP, Ferriani RA, Soares EG, Rangel RM, Araújo MCP, Bailão LA. Detecção de células escamosas vaginais no aspirado de fluido folicular durante fertilização in vitro. *ReprodClim*. 1996;11(4):203-6.
13. Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;32(4):e69-77. doi: 10.1086/318710.
14. Kastrop PM, de Graaf-Miltenburg LA, Gutknecht DR, Weima SM. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum Reprod*. 2007;22(8):2243-8. doi: 10.1093/humrep/dem165.
15. Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, et al. **Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk.** *Fertil Steril*. 2010;94(4):1181-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.04.031.
16. Silveira TR, Passos EP, Cheinquer H, Salazar CC, Facin AC, Souza CAB, et al. Hepatite C em casais inférteis do setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev HCPA & FacMed Univ Fed Rio Gd do Sul*. 2002;22(2):19-25.
17. Ribeiro BRF, Amaral WN, Sadoyama G. Investigação bacteriológica e Micológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana. *ReprodClim*. 2011;26(1):12-18.
18. Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina Ci Agr*. 2006;27(2):289-98. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2006v27n2p289>.
19. Pelzer, E. S. et al. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. *Hum. Reprod*. 26(7) (2011): 1799-1812. doi:10.1093/humrep/der108.
20. Drezett J, Blake MT, de Lira KSF, Pimentel RM, Adami F, Bessa MMM, de Abreu LC. Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres que sofrem crimes sexuais. *Reprod Clim*. 2012;27(3):109-16. doi: 10.1016/j.recli.2013.03.004.
21. Givens MD, Marley MS, Riddell KP, Galik PK, Stringfellow DA. Normal reproductive capacity of heifers that originated from in vitro fertilized

embryos cultured with an antiviral compound. *AnimReprod Sci.*2009;113(1-4):283-6. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.06.010.

22. NicholsonCM, Abramsson L, HolmSE, Bjurulf E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Hum Reprod.* 2000;15(3):662-6. doi: 10.1093/humrep/15.3.662.
23. Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology.* 2007;68(1):1-22.
24. Abeyesundara PK, Dissanayake D, Wijesinghe PS, Perera R, Nishad A. Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. *J Hum Reprod Sci.* 2013;6(2):152-7. doi: 10.4103/0974-1208.117169.
25. Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JB, Mazzulli T, Jarvi K. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *FertilSteril.* 2012;97(5):1050-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.01.124.
26. Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. **Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos.** *FertilSteril.* 2010;94(4):1525-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.089.
27. Campos CO, BernuciMP, VirequeAA, Campos JR, Silva-de-Sá MF, JamurMC, et al. Preventing microbial contamination during long-term in vitro culture of human granulosa-lutein cells: an ultrastructural analysis. ISRN *ObstetGynecol.* 2012;2012:152781. doi:10.5402/2012/152781
28. NikitinaTV, LebedevIN, SukhanovaNN, SazhenovaEA, NazarenkoSA. **A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors.** *FertilSteril.* 2005;83(4):964-72.
29. Wells D, BermúdezMG, SteuerwaldN, MalterHE, ThornhillAR, Cohen J. **Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos.** *FertilSteril.* 2005;84(2):343-55.
30. KällénB, FinnströmO, LindamA, Nilsson E, NygrenKG, OtterbladPO. Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(3):137-43. doi: 10.1002/bdra.20645.

4.2 ARTIGO 2

(submetido à revista *Fertility and Sterility*- Qualis A2)

Título: Contaminação microbiológica em placas de cultivo de embriões humanos e sua interferência no sucesso da reprodução assistida

Title: microbial contamination in dishes culture of human embryos and it's implications on success of assisted reproduction.

Título conciso: Interferência da contaminação na reprodução assistida

Autores:

-Barbara Rosa Ribeiro Foizer (aluna do doutorado em Ciências da Saúde UFG, professora da Universidade Salgado de Oliveira, campus Goiânia)

Endereço para correspondência: Rua das Quaresmeiras, qd.11, It. 25, jardins valência, Goiânia-Goiás, Brasil, CEP 74885 869. Fone: (062) 8114-5149, e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br

- Edgar Rosa Foizer (biólogo, especialista em contaminação ambiental, Diretor da escola da prefeitura de Muriaé, Minas Gerais-Brasil) endereço para correspondência: Rua Maria Henrique Vieira, nº 34 Dornelas 2, Muriaé-MG-Brasil .ZIP code: 36880-000. Fone: (032) 8869-5869, email:edgarfooizer@hotmail.com

-Dr. Lilian de Fátima Fileti Gomes, Embriologista da clínica Fértil diagnósticos (membro do departamento de ginecologia e obstetrícia-UFG) Endereço para correspondencia: Rua T-30 nº1189 apto 1203, Bueno, Goiânia, Goiás, Brasil tel: 005562 84112011email:L.fileti@hotmail.com

- MSc. Dr. Luiz Augusto Antônio Batista Professor do departamento de ginecologia e obstetrícia, faculdade de medicina - UFG; Mestre em engenharia da computação- UFG. - responsável pelo laboratório de fertilizações de embriões da clínica Fértil diagnósticos. Endereço: Al.

Coronel Joaquim de Bastos, n 243, st. Marista, Goiania-Goiias-Brazil ZIP code 74175 150, Tel: 005562 35451709. email: luizaugusto@fertile.com.br

- PHD. Zelma Bernardes Costa- Professor do departamento de ginecologia e obstetria, faculdade de medicina - UFG - membro da sociedade norteamericana de medicina reprodutiva - ASRM - mestre em medicina pelo IPTSP-UFG - doutora em medicina pelo IPTSP-UFG - responsável pelo laboratório de fertilização e criopreservação da Clinica Fertile. Endereço: Al. Coronel Joaquim de Bastos, n 243, st. Marista, Goiania-Goiias-Brazil ZIP code 74175 150, Phone: 005562 35451718. email: zelmabc@gmail.com; zelmaconsultorio@gmail.com.

- Waldemar Naves do Amaral (professor adjunto doutor da Universidade Federal de Goiás e chefe do departamento de ginecologia e obstetria, faculdade de medicina, Diretor Técnico da Fértil Diagnósticos, presidente da sociedade brasileira de ultrasonografia). Endereço para correspondência: Al. Coronel Joaquim de Bastos, n 243, st. Marista, CEP 74175 150, Fone. (62) 3092-5407, email: waldemar@sbus.org.br

Instituições: Faculdade de Medicina- Universidade Federal de Goiás-UFG (doutorado em Ciências da Saúde)

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-IPTSP-UFG (pesquisa microbiológica)

Fértil Diagnósticos, Hospital das Clínicas - coleta de placas de Embriões, prontuários

Pesquisa financiada pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP-UFG, com fornecimento do material de coleta e reagentes de identificação microbiológica.

Autor para correspondência: Barbara Rosa Ribeiro Foizer - FOIZER, B. R. R.

Objetivos

Investigar a prevalência de contaminação microbiológica nas placas de cultivo de embriões humanos, identificar o microrganismo e avaliar a interferência da contaminação no sucesso em reprodução assistida.

Desenho

Coleta de 470 amostras do meio de cultura das placas de cultivo de embriões humanos, após a transferência para o útero materno. Os meios de cultivo foram inoculados em caldo BHI e as amostras positivadas foram isoladas e identificadas. Tabulação de dados de prontuários coletados nos laboratórios de reprodução humana, comparando dois grupos principais: contaminado e não contaminado. Aplicação de testes estatísticos de regressão com o pacote SPSS-17.0, para as diferenças encontradas entre os grupos contaminado e não contaminados.

Cenário

Laboratórios de reprodução humana de um hospital público e de uma clínica de diagnósticos particular, cidade de Goiânia-Goiás-Brasil, no período de maio de 2009 a março de 2014.

Paciente(s)

Placas provenientes do cultivo de embriões humanos, e seus respectivos progenitores, fertilizados em laboratórios de reprodução assistida

Intervenção(s)

Não há

Resultado principal medido(s)

Resultado gravídico perinatal referente aos embriões das placas de cultivo

Resultado(s)

Prevalência de 6,32 % de contaminação, sendo os principais microrganismos fúngicos: *Candida sp* (20%) *Penicilium sp* (13,34%) *Aspergillus sp* (10%); e bacterianos: *Bacillus sp* (16%) *E. coli* (10%), *Staphylococcus sp* (10%). O fator de infertilidade mais encontrado foi o tubário ($p < 0,001$, $OR=4,18$, $CI= 1.94-9.01$). O resultado reprodutivo esteve comprometido na presença da contaminação: a qualidade embrionária foi pior, com maior número de embriões C e D ($p= 0,013$, $OR=3,53$ e $IC= 1,31-9,58$), o índice de gravidez foi menor ($p=0,043$, $OR=2,57$ e $IC=1,03-6,41$), a

perda gestacional foi maior ($p=0,094$, $OR=4,37$ e $IC=0,78-24,59$), o resultado perinatal foi pior ($p= 0,026$, $OR=5,13$ e $IC=1,39-18,97$).

Conclusão(s)

A prevalência de microrganismos foi de 6,32%. Os microrganismos mais encontrados foram *Candida sp*, *penicilium sp*, *Bacillus sp*, *E. Coli*, *Staphylococcus sp*. Há interferência negativa no resultado reprodutivo, aumentando o número de embriões ruins e a perda gestacional, diminuindo as taxas de gestação e o resultado perinatal.

Palavras-chave: Reprodução humana. Contaminação. Microbiológico. Gravidez. Nascimentos. Embriões.

Introdução

O decréscimo da fertilidade é um inevitável fato biológico, aliado à maternidade tardia. Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade e a realização correta dos procedimentos é fundamental para o sucesso em reprodução assistida. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e equipamentos. ^(1,2)

Desde 1996, contaminações microbiológicas em meios de cultura de embriões tem sido rastreados e registrados para contribuir na melhora da qualidade do sistema de manejo em reprodução humana, em laboratórios de Dublin. Bactericidas e fungicidas são incorporados aos meios de cultura, à medida que aumenta a resistência destes micro-organismos⁽³⁾. As principais causas desta contaminação vem sendo associadas à infecção no trato genital masculino e feminino e conseqüente contaminação dos ovócitos e embriões. Também pode vir da contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como os catéteres de remoção do muco cervical e de transferência embrionária⁽⁴⁾, as placas de cultivo⁽⁵⁾.

A vagina, o fluido ovariano e o ejaculado não podem ser esterilizados, sendo considerados potenciais fontes de contaminação. Portanto, muito cuidado deve ser tomado para minimizar os riscos de transferência de

microrganismos durante a realização de procedimentos clínicos ou laboratoriais. Durante a coleta de ovócitos, há estudos de aparecimento de células vaginais no fluido folicular, e conseqüente de bactérias, correndo o risco de contaminar a pelve materna e os embriões⁽⁶⁾. Ocasionalmente, os microrganismos colonizam as placas de cultivo de oócitos e embriões^(4,7,8,9). Técnicas diferentes em reprodução assistida possuem índices de contaminação diferentes. Na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) a taxa de contaminação é pequena mas na fertilização in vitro (FIV), o índice de contaminação aumenta⁽⁵⁾.

A primeira consequência da contaminação está na redução da formação de embriões viáveis para transferência. Os embriões podem não sobreviver nas primeiras clivagens, apresentar teratogenia, ou não terem taxas de implantação⁽⁵⁾. Também pode trazer um aumento de natimortos, prematuridade, nascimento de conceptos pequenos e com síndromes⁽¹⁰⁾.

Em outra vertente, traz o risco de contaminar e infectar o organismo da mãe, com lesão temporária ou definitiva. A contaminação pode ser vertical (entre progenitores e embriões), ou lateral (de uma paciente para outra, durante as intervenções cirúrgicas de coleta de ovócitos e de transferência embrionária). Um estudo comprovou a colonização e a contaminação do fluido folicular, que pode ter acontecido em procedimentos invasivos anteriores, ou ainda em casos de endometriose, infecção pélvica com acesso ao útero, trompas e ovários, síndrome dos ovários policísticos. Estes microrganismos colonizadores e as respostas imunológicas, com produção de citocinas, que se seguem naturalmente no processo infeccioso, diminuíram as taxas de fertilidade⁽¹¹⁾. Uma obstrução definitiva na tuba uterina levaria a paciente a precisar dos métodos em reprodução assistida para engravidar. Riscos de infecção pélvica aguda para a mãe, logo após a coleta de ovócitos por via vaginal são discutidos em um estudo de caso. Possível contaminação por bactérias anaeróbicas gram positivas são associadas a esterilidade tubária⁽¹²⁾.

A identificação microbiológica também é necessária, uma vez que norteará mudanças nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais. Identifica-se frequentemente *Candida sp* como agente fúngico que pode ou não interferir nos resultados em reprodução^(8, 13).

Os meios de cultura destes embriões contém antibióticos para minimizar os riscos de crescimento microbiano, como IVF (com penicilina G), e o HTF (com gentamicina), também possuem o antifúngico anfotericina. Lavagens em meios de antibiótico/antimicótico vem sendo sugeridas recentemente⁽¹⁴⁾.

Encontrou-se também correlação entre infertilidade e o vírus da hepatite C, em um grupo de casais inférteis, com prevalência de 3,2% para as mulheres e 3,6% para os homens. A transmissão pode ser em procedimentos ambulatoriais, e recomendou-se que pacientes inférteis fossem rastreados antes de serem submetidos a técnicas de reprodução assistida, o que exemplifica a contaminação embriológica e materna de micro-organismos⁽¹⁵⁾.

A preparação do sêmen pode ser feita com as duas técnicas: swim up e gradiente de densidade, que diminuíram drasticamente a contaminação bacteriana⁽¹⁶⁾. São eficazes para reduzir a população microbiana no sêmen e inofensivas para os espermatozoides⁽¹⁷⁾, mas nenhuma das duas conseguiu eliminar os agentes mais encontrados (estreptococos, estafilococos, coliformes)⁽¹⁸⁾. Parâmetros seminais de bacteriospermia e leucocitose foram correlacionados com a fragmentação do DNA destes espermatozoides⁽¹⁹⁾.

É importante relatar que muitos procedimentos tem sido feitos na tentativa de descontaminação microbiológica. A exposição à radiação UV em 253,7 nm, e ao ozônio produz uma rápida descontaminação microbiana, e se mostrou eficaz para bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) e fungos (*Aspergillus niger*), de importância médica e registrados em septicemias⁽²⁰⁾.

As taxas de malformações em embriões e fetos aumentam em reprodução assistida. Anormalidades cromossômicas são encontradas em 60% dos abortos espontâneos, tornando a mais abrangente explicação biológica das falhas em gestações⁽²¹⁾. Alterações na expressão gênica de embriões, sofrendo de estresse fragmentativo, como consequência da sub-condição de cultivo, quebrando seus núcleos e perdendo fragmentos de DNA. Embriões com perfis de expressão que denotam característica morfológica adequada para sua fase têm maior potencial para implantação⁽²²⁾. Más formações congênitas (no estudo foram encontrados

em maior número as cardiovasculares e redução do número de membros) tiveram um risco aumentado significativo em crianças nascidas de fertilização assistida⁽²³⁾.

Apesar da contaminação apresentar baixa prevalência⁽⁵⁾, as condições de alguns laboratoriais no Brasil, (manutenção dos filtros de ar), podem trazer um resultado depreciativo para a reprodução. Não há estudos longitudinais que avaliam causa e consequência da contaminação na fase embriológica e o insucesso na reprodução humana assistida. Mas, há evidências de infecção gestacional que prejudica o aparelho reprodutivo e provoca má formação fetal em estudos veterinários⁽¹⁰⁾.

O entendimento sobre as possíveis contaminações endógenas e exógenas, do corpo materno, gametas masculino e feminino e embriões, e seus maus resultados reprodutivos, traz à luz a necessidade do rastreamento e controle dos agentes infecciosos dentro do laboratório de reprodução humana⁽²⁴⁾.

Propomos neste estudo, identificar a prevalência da contaminação microbiológica por bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões humanos, e a interferência no sucesso em reprodução humana assistida, com análise das taxas dos fatores de infertilidade, gametas, embriões, gravidez e nascimentos. Estas placas de cultivo dos embriões representam o melhor local de coleta, por que para ela confluem os vários fatores prováveis de contaminação.

Metodologia

Esta pesquisa, longitudinal e prospectiva, realizou-se de forma quantitativa (prevalência), com abordagem descritiva, analítica, observacional. Tipo de Caso controle com pareamento nos seguintes itens: Idade materna, Idade paterna, indicação, resposta ovariana, número de embriões manipulados e embriões transferidos . Foi realizada a coleta do material para estudo e a posterior análise dos prontuários no laboratório de Reprodução Humana da Clínica Fértil (450 amostras) e do hospital da clínicas UFG (20 amostras do trabalho de mestrado), em Goiânia. Pesquisa aprovada na Plataforma Brasil, no Comitê de Ética em pesquisa do Hospital

das Clínicas, Goiânia -GO.

A amostra foi composta por 470 placas de cultivo de embriões investigadas, e os dados recuperados após o nascimento dos conceptos.

Independente da suspeita de contaminação, todas as placas de cultivo de embriões de cada paciente foram utilizadas para as amostras. Os embriões foram implantados ou congelados, e as placas de cultivo que seriam descartadas foram usadas para coleta imediatamente ou armazenadas na incubadora por até um dia, após a transferência. Durante os anos de coleta em placas, foram descartadas algumas porque não poderiam ser guardadas além de 1 dia (procedimento laboratorial) para serem coletadas em tempo hábil, apenas a embriologista tinha acesso à incubadora do laboratório para fornecer as placas com meio de cultura.

A coleta das placas de estudo foi totalizada no período compreendido entre maio de 2009 e março de 2014, nas dependências das instituições citadas, de acordo com a disponibilidade do descarte das placas de embriões, e levadas ao laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG, onde analisou-se a presença de contaminação e posteriormente a identificação dos microorganismos encontrados nas amostras.

Para analisar a presença de contaminação, foi preparado individualmente o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Os tubos com BHI foram autoclavados, testados previamente em estufas por 24 horas e conservados em geladeira para o uso. As amostras de meios de cultura de embriões foram coletadas dentro da câmara de fluxo, com pipetas estéreis e inoculadas nestes tubos contendo 5 mL de meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion) para acrescentar os nutrientes de crescimento microbiológico necessários e intensificar o crescimento dos contaminantes, a fim de facilitar a identificação. Eram então transportados em caixas de isopor imediatamente para o laboratório de microbiologia do IPTSP e incubadas por 24-48 horas a 37°C na estufa. Foi retirado todo o meio de cultura disponível das placas. As amostras que positivaram no caldo BHI foram posteriormente subcultivadas, procedendo os testes específicos de identificação: macro e micromorfológicos, microcultivos, testes de coloração, testes bioquímicos que baseiam-se na presença ou ausência de substâncias, como enzimas ou

produtos do metabolismo do patógeno⁽²⁵⁾. Foi utilizado o método gram, em seguida separadas e subcultivadas no meios de cultura MacConkey, Ágar Manitol Salgado e Ágar Nutriente.

Nas amostras contaminadas bastonetes gram negativos (*Klebsiella sp*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*), houve crescimento no meio MacConkey. Procedeu-se a sequencia bioquímica de reações com os seguintes meios de cultivo: Meio TAF (tríplice açúcar ferro) com o indicador de pH Vermelho de Fenol (produção de ácido e base) e fermentação de açúcares (sacarose, glicose e manitol). Observa-se também a produção de gás CO² pela fermentação, no ambiente anaeróbio inferior do tubo do TAF. Meio SIM, para detecção da produção do Indol (um produto de degradação do aminoácido triptofano), aparece a cor vermelha na parte superior do tubo, detecta-se também a motilidade bacteriana (para motilidade com a presença de flagelos, o meio contendo tetrazólio induz o aparecimento de rastros de cor vermelha, que ajuda a seguir a disseminação da bactéria a partir da linha de inoculação, em uma análise macroscópica), também a produção de ácido sulfídrico (enxofre é liberado a partir da degradação de aminoácidos, com produção de precipitado negro, sulfeto de metal pesado insolúvel) como corpo de fundo no tubo. O teste foi realizado com o indicador de pH Vermelho de Metila, pois a quantidade mínima de ácidos produzidos pode ser suficiente para reduzir o pH. Meio Citrato, que determina a capacidade de utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono metabólico, ocorre a produção de uma cor azul no meio, com presença de produtos alcalinos. Meio para fenilalanina, o aparecimento do ácido fenilpirúvico indica a degradação da fenilalanina pela enzima fenilalanina desaminase. Em caso positivo, surgiria uma cor verde após a adição do reativo Cloreto férrico. Meio ágar ureia de Christensen para urease, a mudança de cor de rosa para vermelho indica a positividade. A superfície inclinada torna-se vermelha, em uma reação alcalina, indicando que o microorganismo hidrolisa a uréia, liberando amônia e produzindo mudança de cor vermelho rosado no meio.

Para a identificação das amostras contaminadas que cresceram em Agar Manitol, foram identificados cocos gram positivos do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus*, o meio manitol foi modificado, adicionando entre outros componentes, o vermelho de fenol como indicador de pH. *Staphylococcus sp* tornou o meio amarelo em condições ácidas pela fermentação do manitol. O teste da catalase, realizado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre uma lâmina com as colônias, é positivo quando há o borbulhamento, devido à liberação do oxigênio. O teste da coagulase consiste em juntar num tubo de ensaio contendo plasma sanguíneo e uma suspensão das colônias e esperar que coagulem pelas enzimas bacterianas. As amostras que apareceram com *Bacillus sp* gram positivos, cresceram no meio manitol. Apresentavam coloração roxa e organizavam-se também sob a forma de estreptobacilos. Na amostra contaminada por fungos leveduras, houve crescimento de colônia brancas e leitosas no ágar nutriente com antibióticos, e no gram, foi observado a presença de células eucariontes, bastante coradas ao microscópio, unicelulares. As amostras contaminadas por fungos filamentosos (*Aspergillus sp*, *Penicilium sp* e *Thichophyton rubrum*) foram cultivadas no ágar nutriente com antibióticos, para isolar as colônias, e subcultivada em microcultivo, para detectar o tipo de corpo de frutificação, com visão microscópica das hifas. A técnica do microcultivo consiste em retirar um pedaço da cultura do bolor e semear nos 4 cantos do quadrado de agar batata que está depositado sobre a lâmina de vidro, cobrir o material semeado com lamínula, colocar um tubo de água estéril no fundo da placa para umedecer o papel de filtro, incubar à 25°C por 7 a 14 dias. A identificação foi feita através da associação do corpo de frutificação e da morfologia da colônia.

Não houve repetição da amostra durante a coleta de dados, mesmo que houvesse várias placas por paciente (mães). Quando um paciente teve múltiplos embriões em duas ou mais placas, meios BHI foram colocados em tubos separados, mas, se a contaminação fosse confirmada em pelo menos uma das placas, o paciente seria adicionado ao grupo contaminado. Não havendo contaminação em qualquer uma das placas, o paciente seria considerado no grupo não contaminado. Um caso de contaminação em uma

das duas placas da mesma paciente foi descartado porque não se sabia de qual o embrião era proveniente. Uma dupla contaminação (*E. coli* e *Aspergillus*) em placa única foi considerada a contaminação bacteriana inicial, porque o fungo apareceu alguns dias mais tarde e já foi em microcultivo de crescimento lento.

Os prontuários referentes às placas foram analisados e seus dados coletados em 2014. Fatores analisados: idade materna e paterna, fatores de esterilidade, qualidade e quantidade de ovócitos recuperados, qualidade de embriões transferidos e o resultado gravídico, com resultados perinatais de nascidos vivos (sucesso perinatal) ou ausência de nascidos vivos (fracasso total), também as perdas gestacionais, e dados do concepto ao nascimento, como: peso, estatura, idade gestacional e o tipo de gravidez proveniente (única, gemelar, trigemelar). Foram feitas tabelas isoladas dos fatores analisados.

Os ovócitos são identificados utilizando a visualização em microscopia óptica (invertida), com aumento de 400 vezes com a classificação M1 (imaturos) e M2 (maduros). A identificação de embriões viáveis é baseada na avaliação de critérios morfológicos⁽²⁶⁾, tais como o número e tamanho das células, a presença de multinucleação, o percentual de fragmentação e a taxa de clivagem. A avaliação morfológica foi praticada nos 2 laboratórios do estudo. A classificação para embriões, de 2 a 4 dias, com letras A, B, C e D foi definida como Excelente (grau A): blastômeros de diâmetro similar e número de células ideal para o dia, 0% de fragmentos; Boa (grau B): fragmentos <25%, blastômeros de diâmetro similar; Insuficiente (grau C): 25-50% de fragmentos, blastômeros de diâmetro desigual. Só se devem transferir embriões C na ausência de embriões A/B; Má (grau D): fragmentos >50%, chances altas de anomalias genéticas. Também foram utilizados os blastocisto de 5 a 6 dias, com classificação A: massa celular interna atinge pelo menos 2/3 do raio com ausência de células degenerativas; presença de trofoblasto contínuo e fino sem células degenerativas; presença de zona pelúcida fina.

Para as análises de competência estatística, os dados foram digitados em software Excel e analisados no SPSS17.0 (Statistical Package for Social Science). Os resultados foram apresentados com valor absoluto (n) e valor

percentual (%). Para testar a significância das diferenças entre os grupos contaminado e não contaminado foram usados testes Quiquadrado (idade materna e paterna), teste Fisher (quantidade e qualidade de óvulos M1 e M2), e o teste de Regressão logística para os demais fatores estudados. Foi considerado nível de 95% de confiança, ou seja, $p < 0,05$. Foi calculada a ODDS RATIO da exposição microbiana da placa com a ausência da gravidez, e com a perda gestacional, além de acompanhar os resultados da regressão

Resultado

Das 470 amostras, 30 apresentaram contaminação, resultando em uma prevalência de 6,32% (IC= 4,26-7,98). Foi achada contaminação tanto para placas provenientes da técnica FIV ainda realizada em 2009 e 2010, quanto para ICSI (exclusiva a partir de 2011).

Foram identificadas 7 espécies bacterianas em 16 amostras (51%), e 4 espécies de fungos em 14 amostras (49%). *Bacillus sp* (5 amostras) e *Candida sp* (6 amostras) foram as espécies mais freqüentes. Os agentes encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos achados de Microrganismos de prevalência de 6,32%, isolados em placas embrionárias de cultivo contaminadas, em laboratórios de reprodução humana, Goiânia, 2009/2014.

Microrganismos	Número de amostras (n)	Percentual de amostras (%)
Leveduras (<i>Candida sp</i>)	6	20,00
<i>Bacillus sp</i>	5	16,67
<i>Penicilium sp</i>	4	13,34
<i>Escherichia coli</i>	3	10,00
<i>Staphylococcus sp</i>	3	10,00
<i>Aspergillus sp</i>	3	10,00
<i>Streptococcus sp</i>	2	6,67
<i>Klebsiella sp</i>	1	3,33
<i>Pseudomonas sp</i>	1	3,33

<i>Enterobacter sp</i>	1	3,33
<i>Trichophyton rubrum</i>	1	3,33
Total	30	100,0

Os fatores de esterilidade mais freqüentes foram o fator tubário, 14 (41%) casos para o grupo contaminado e 68 (15,5%) para o não contaminado, e a oligoastenospermia, 9 (26,3%) casos para o grupo contaminado e 142 (32,3%) para o grupo não contaminado, segundo a tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos casos de fertilização de alta complexidade segundo as placas de cultivo contaminadas ou não, para os Fatores de Esterilidade, Goiânia 2009-2014.

Fatores de Esterilidade	Contaminada		Não Contaminada		p	OR	IC
	(n)	%	(n)	%			
Idade Feminina (> 39 anos)	5	14,7	68	15,5			
Endometriose	3	8,7	54	12,3			
Tubário	13	43,3	68	15,5	<0,001	4,18	1,94-9,01
Falência Ovariana	-	0,0	10	2,3			
Útero de Substituição	-	0,0	5	1,1			
Pólipo Endometrial	1	2,9	3	0,7			
Aborto Repetição	-	0,0	4	0,9			
FSH Elevado	-	0,0	2	0,5			
Síndrome de Kalmann	1	2,9	-	0,0			
SOMP	2	5,8	13	2,9			
Fator Feminino Total	25	83,3	227	51,6	0,002	4,69	1,76-12,48
Idade Masculina (> 50 anos)	-	0,0	8	1,8			
Oligo/Astenospermia	9	26,3	142	32,3			
Azoospermia	1	2,9	31	7,1			

Fator Masculino Total	10	33,3	181	41,1	0,402	0,71	0,33-1,56
Idiopático	-	0,0	34	7,7	0,998	0,00	-

Pode haver mais de um fator de esterilidade por placa (materna e paterna) P- Regressão logística: * significativo, ** altamente significativo; (38 placas não foram avaliadas para este quesito)

Das 30 placas do grupo contaminado, a idade materna proveniente de cada uma, 3 (10%) possuem idade menor que 30 anos, 22(73,3%) possuem entre 30 e 40 anos, 5(16,7%) possuem maior que 40 anos. Das 405 placas do grupo não contaminado, 83 (20,5%) com menos de 30 anos, 232 (57,3%) entre 30 e 40 anos, 90 (22,2%) maior que 40 anos. 35 placas não foram avaliadas para este quesito. Não houve diferença significativa para as idades maternas ($p = 0,212$ Teste: Qui-quadrado) entre os grupos contaminado e não contaminado.

Das 30 placas do grupo contaminado, a idade paterna proveniente de cada uma, 11 (36,7%) possuem idade menor que 35 anos, 17(56,7%) possuem entre 36 e 50 anos, 2(6,6%) possuem maior que 50 anos. Das 342 placas do grupo não contaminado, 132 (38,6%) com menos de 35 anos, 193 (54,6%) entre 36 e 50 anos, 17 (5,0%) maior que 50 anos. 98 placas não foram avaliadas para este quesito. Não houve diferença significativa para as idades paternas ($p = 0,913$ Teste: Qui-quadrado) entre os grupos contaminado e não contaminado.

Na recuperação de ovócitos do tipo M2 (maduros) o grupo contaminado teve 19 (63%) de até 8 ovócitos e 11 (36,7%) acima de 8 ovócitos recuperados. O grupo não contaminado teve 242 (60,2%) de até 8 ovócitos e 160 (39,8%) acima de 8 ovócitos recuperados. Para os ovócitos do tipo M1, foi recuperado em quantidade bem menor, mas a proporção entre os grupos contaminado e não contaminado foi semelhante. 38 placas não foram avaliadas para este quesito. Não houve diferença significativa para a qualidade e quantidade de óvulos recuperados, dos tipos M2 ($p=0,449$) e M1 ($p=0,714$)(Teste: Fisher).

Para o grupo contaminado foram 2 nascimentos de conceptos provenientes de embriões tipo blastocisto e A. Para o grupo não contaminado, foram 146 nascimentos provenientes de Embriões tipo blastocisto (30), A (73), B (37) e C (6). Entre os nascidos, houve gêmeos

(24) e trigêmeos (2). Não foram aplicados testes estatísticos para embriões blastocistos, A e B em virtude do blastocisto ter sido cultivado nos laboratórios a partir de 2012, através de meios de cultura específicos e recentes, o que gradativamente modificou as taxas de gestação dos embriões tipo A e B. A regressão correlacionou os embriões ruins (C e D) com a contaminação de placas. Foram 6 (20%) embriões ruins no grupo contaminado e 28 (6,6%) no grupo não contaminado, $p=0,013$; $OR=3,53$ e $IC\ 95\% = 1,31-9,58$, segundo a tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos casos de fertilização de alta complexidade segundo a qualidade embrionária e o resultado gravídico perinatal, entre os grupos contaminados e não contaminados, 2009/2014.

Qualidade de embriões/Resultado gravídico	Contaminadas		Não Contaminadas	
	n	%	n	%
Blastocisto Sim	1	3,3	30	7,2
Blastocisto Não	8	26,7	34	8,4
A Sim	1	3,3	73	17,0
A Não	7	23,4	95	23,7
B Sim	-	0,0	37	9,0
B Não	7	23,3	113	28,1
C Sim	-	0,0	6	1,2
C Não	5	16,7	19	4,8
D Não	1	3,3	3	0,6
Total	30	100,0	403	100,0

Sim – resultado perinatal de nascidos vivos; Não – fracasso perinatal de nascidos vivos $P=0,013$ (regressão), $OR = 3.53$, $IC = 1.31-9.58$ para embriões ruins (C + D). 37 placas não foram avaliadas para este quesito

Das 30 placas do grupo contaminado, 24 (80%) não engravidaram, 2 (6,6%) tiveram gravidez bioquímica que não evoluiu, 2 (6,6%) tiveram aborto de 2º trimestre. Já das 440 placas do grupo não contaminado, 268 (61%) não engravidaram, 22 (5%) tiveram gravidez bioquímica, 27 (6%) abortaram no 1º trimestre, 5 (1%) abortaram no 2º trimestre. O índice de gravidez foi de 20% para o grupo contaminado e de 39% para o grupo não contaminado. A chance de não engravidar foi 2,57 ($OR, p=0,043$ e $IC=1,06-6,24$) vezes maior no grupo contaminado, que o grupo não contaminado. O resultado

perinatal de nascidos vivos foi de 2(6,6%) no contaminado, e 118 (27%) no não contaminado, com diferença significativa na regressão logística, $p=0,026$, $OR= 5,13$, $IC=1,39-18,97$. O grupo contaminado teve 4,37 ($OR, p= 0,094$ e $IC=1,58-12,04$) vezes maior chance de perda gestacional que o grupo não contaminado (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos achados de placas de cultivo contaminados e não contaminados, em laboratórios de reprodução humana, segundo o sucesso perinatal da gravidez, Goiânia 2009-2014.

Resultado gravídico	Contaminadas		Não Contaminadas	
	n	%	n	%
Não Engravidou	24	80,0%	268	61%
Gravidez Bioquímica	2	6,6%	22	5%
Aborto 1º Trim	0	0%	27	6%
Aborto 2º Trim	2	6,6%	5	1%
Total de insucesso	28	93,4%	322	73%
Sucesso gravídico perinatal				
de nascidos vivos	2(*)	6.6%	118	27%
Total	30	100%	440	100%

Testes: Qui-quadrado ($p<0,001$), Regressão logística ($p=0,026$ $OR = 5.13$, $IC = 1.39-18.97$) (resultado gravídico perinatal). (*) Agente contaminante: *Candida sp*

Para os dados do conceito ao nascimento, apenas 2 conceitos no grupo contaminado (sexo masculino, gravidez única, peso menor que 2 kg, tamanho menor que 43 cm e idade gestacional prematura) não possibilitaram a aplicação de testes de regressão, comparando com os 126 nascidos no grupo não contaminado. Estes apresentaram 51,59% masculino e 48,41% feminino; 73,47% proveniente de gravidez única e 26,53% de gravidez múltipla; 6,35% nasceram com menos de 2kg, 50% com 2 a 3 kg e 43,65% acima de 3 kg; 5,56% com tamanho menor que 43 cm e 94,44% entre 43 e 53 cm. 73,81% nasceram a termo para a idade gestacional (37 semanas ou mais) e 26,19% nasceram prematuros (até 36 semanas).

Discussão

Semelhantemente aos trabalhos anteriores^(5,9), foi encontrada contaminação nas placas de cultivo de embriões humanos, com agentes

contaminantes semelhantes, em LRH. Os microrganismos de maior prevalência e importância médica foram: *Candida sp*, família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*) e gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que são os mesmos achados de estudos europeus⁽⁵⁾, onde a prevalência foi de 0,67%, 9 vezes menor comparada a este estudo. Prevalências encontradas em estudos: de 0,69% para fungos⁽⁸⁾, de 5% em sêmens com processamento e antibióticos⁽⁴⁾, de 32% para sêmens⁽¹⁶⁾, de 0,35% e de 4,8% para placas de embriões^(3,9)

A prevalência contaminante norteou a análise da interferência sobre o sucesso da reprodução assistida, pois o tipo de contaminação parece ter variado os resultados. Os 2 nascimentos no grupo contaminado foram procedentes de placas com *Candida sp*, nasceram conceptos em 33,3% das placas com leveduras (6) e em 14,3% das placas com fungos (14). 46,7% das contaminações encontradas neste estudo foram por fungos, quase a metade das placas, alguns com crescimento mais lento quando comparados a bactérias⁽⁵⁾. Em relação aos resultados, os estudos são controversos: *Candida albicans* aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida⁽⁸⁾, mas também pode não interferir no resultado, que acontece dentro das taxas normais para reprodução assistida não sendo, portanto, razão para cancelar a transferência de embriões⁽¹³⁾. Fungos aparecem nas placas com no mínimo 2-3 dias, até mesmo após a transferência, e por isso muitas vezes não são detectados, e também provavelmente causem menor dano ao embrião⁽⁵⁾.

Os embriões de qualidade C e D foram encontrados em placas contaminadas por bactérias. Outros estudos afirmaram que a qualidade de embriões em desenvolvimento era pobre⁽⁵⁾. Embriões ruins, de classificação C e D, apresentam clivagem desequilibrada, com muitos blastômeros de tamanhos desiguais, alta fragmentação e resíduos⁽²⁶⁾. *Escherichia coli* e *Stenotrophomonas maltophilia* (*Pseudomonas*) foram as principais contaminações em amostras de embriões e sêmen congelados, as mesmas contaminantes deste estudo, capaz de suprimir significativamente a fertilização e o desenvolvimento embrionário in vitro⁽¹⁷⁾.

Quanto ao fator de esterilidade, o fator tubário foi quase 3 vezes maior nos grupos contaminados (41%) do que nos não contaminados (15,5%), sugerindo uma possível explicação para causas da contaminação. O fator tubário é encontrado para a maioria das causas de infertilidade⁽²⁸⁾. *Chlamydia trachomatis* é uma frequente causa de doença inflamatória pélvica que, com sua evolução, pode levar à gravidez ectópica e a fator de infertilidade tubária⁽²⁹⁾. Outras infecções, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e as espécies *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, estão presentes em 42,63% das mulheres inférteis. O agente mais prevalente é o *Ureaplasma urealyticum* com 29,47%, e o segundo é *Candida sp.*, com 15,26%. Acredita-se que a lesão tubária decorrente da doença inflamatória pélvica, cause infertilidade para 100 mil mulheres e gestação ectópica tubária para 70 mil, no Brasil⁽³⁰⁾. História de violência sexual, sorologia positiva para o HIV e infecção por *Chlamydia trachomatis* foram fatores preditivos para a infertilidade por fator tubário⁽³¹⁾.

Todos estes dados sugerem a investigação de uma possível causa intrínseca de contaminação prévia do trato genital feminino, que além de gerar esterilidade pela oclusão tubária, pode desencadear contaminação nos ovócitos e conseqüentemente nos embriões. Estas bactérias, *Chlamydia* e *gonococos* são os principais agentes epidemiológicos ginecológicos, são parasitas intracelulares obrigatórios, não cresce em meio de cultura de BHI⁽²⁵⁾ e, portanto, não detectadas neste estudo. Como o objetivo de analisar a interferência da contaminação (bactérias e fungos, apenas) provinda das placas, não foi feito o levantamento da contaminação encontrada na sorologia, que captura todas estas bactérias acima discutidas, além de doenças virais relevantes na esterilidade⁽²⁷⁾.

Penicilina G ainda é utilizada no meio IVF^(6,8). No meio HTF ocorreu substituição por gentamicina, em 2005, e a colonização de placas de cultivo foi observada somente por *Candida*⁽⁵⁾, não por bactérias. No entanto, é conhecida a alta frequência de adaptação e resistência bacteriana. Os antibióticos penicilina G ou gentamicina, utilizados nos meios de cultivo de embriões, foram insuficientes para conter a proliferação bacteriana, neste estudo. Entretanto, a lavagem em doses 10 vezes maior que as contidas nos meios de cultura, conservou a cultura de ovócitos por 144 horas sem

contaminação, usando estreptomicina e penicilina, e o antifúngico anfotericina⁽¹⁴⁾. Esta solução poderia causar danos aos embriões e aumentar a resistência bacteriana ao longo dos anos.

A taxa de gestação foi de 39%, e 27% de nascimento, ocorrendo dentro dos padrões altos em reprodução no Brasil e na Europa^(24,28) contra apenas 20% dentre o grupo contaminado engravidou, e 6,6% nasceu. O grupo contaminado teve menor taxa de gravidez e de nascimentos em proporção.

Comparando as amostras contaminadas com não contaminadas obtivemos 6,6% e 1% respectivamente, que tiveram aborto espontâneo no 2º trimestre. Os 2 casos de gravidez bioquímica dos contaminados estavam com o HCG muito baixos (25 e 40 UI na dosagem). É citada a contaminação microbiológica como uma das causas de aborto⁽³²⁾. Septicemia com espécies de *Candida* foram associadas a aborto por descolamento de membranas corioamnióticas, com 21 semanas, em um caso de fertilização *in vitro*⁽³³⁾

Escherichia coli e espécies de *Candida* tem causado mais de 59 % e 26 % desta contaminação, respectivamente⁽³⁴⁾. As taxas de resistência desta bactéria à gentamicina, usada nos meios de cultura, aumentaram 13%, de 2006 a 2008, e tendem a aumentar mais⁽³⁵⁾. Também apresenta resistência em estudos de infecções do trato urinário⁽³⁶⁾, e em gestantes⁽³⁷⁾. Para os gêneros *Pseudomonas sp* (1 caso) e *Staphylococcus sp* (3 casos) multirresistentes encontrados neste estudo, também predominaram no diagnóstico de sepses, em estudos no Brasil⁽³⁸⁾.

As amostras contaminadas por grandes bacilos gram positivos, normalmente presentes no ar, no solo, na água, indicam contaminação ambiental, com ausência de espécies de importância médica. Não houve nenhum trabalho que apresentasse bacilos gram positivos associados a infecção humana.

Observou-se um aumento no número de Blastocistos em detrimento de uma diminuição do número de embriões A e B, principalmente B, de 2009 a 2014, nos grupos comparados. A razão desta proporção está no crescimento do cultivo de embriões (com meios de cultivo específicos) de maior qualidade e melhores chances implantacionais a partir de 2011. Isto porque os de classe A e B estavam avançando para blastocisto, que pode

ser muito útil na seleção dos melhores candidatos para transferências individuais, otimizando assim os resultados, reduzindo os riscos associados com gravidez múltipla⁽³⁸⁾. Também para reduzir o risco de SHEO (síndrome da hiperestimulação ovariana), muito comum durante um ciclo induzido para coleta de ovócitos, com a cultura estendida por mais tempo⁽⁴⁰⁾. Portanto, não comparamos as taxas de blastulação entre os grupos, pois a taxa de contaminação não se manteve proporcional ao longo dos anos de coleta e qualquer diferença na quantidade de blastocistos poderia ser em razão do crescimento do seu cultivo, a partir de 2011.

O grupo contaminado teve 20% de embriões ruins, e o não contaminado teve 6,6%. Embriões ruins (C e D) são 3 vezes mais encontrados no grupo contaminado, com resultado significativo ($p = 0,013$). Embriões D não tiveram sucesso, nem mesmo de gestação.

A respeito da taxa de contaminação de 6,7%, considerada alta para banco de células germinativas, pode estar associada aos ar condicionados e os filtros HEPA. Os dois laboratórios passaram por adequações às normas de funcionamento de banco de células germinativas, RCD N° 23 de 27 de maio de 2011⁽⁴¹⁾, e reformas que ocorreram entre 2011 e 2012, o que pode ter causado esta contaminação alta de fungos e bactérias contaminantes do ar, neste estudo (49% de fungos e 16.67% de *Bacillus* sp). O maior número de amostras contaminadas esteve entre 2011 e 2012 (23.33% 2009-1010, 63.33% 2011-2012, 13.33% 2013). A pesquisa de comparação entre os laboratórios não foi alvo de nossos objetivos, visto que este trabalho já tenha sido contemplado no mestrado, com similaridade de contaminação (4,8% de contaminação em média) entre os 3 laboratórios ativos em Goiânia, Goiás, Brasil (2009-2010)⁽⁹⁾. Nesse período não foram encontrados contaminantes de fungos do ar.

Mesmo sendo um estudo com pouca literatura revisada sobre a interferência da contaminação que avalia o embrião e a gestação, com um número limitado de 30 amostras contaminadas e análise apenas das placas (a sorologia complementar os dados), este estudo demonstrou que a contaminação microbiológica em placas de cultivo de embriões parece interferir no sucesso perinatal, já que não houve caso de gestação e nascimento destas placas. O pequeno número de estudos que correlaciona

contaminação e sucesso em reprodução assistida deve ser um fator estimulante para estudos posteriores.

Conclusões

Houve uma prevalência de 6,32 % de contaminação em placas de cultivo de embriões de laboratórios de reprodução humana.

Os principais agentes microrganismos fúngicos: *Candida sp* (20%), *Penicilium sp* (13,34%), *Aspergillus sp* (10,0%), e bacterianos: *Bacillus sp* (16%), *E. coli* (10%), *Staphylococcus sp* (10%).

O resultado reprodutivo esteve comprometido na presença da contaminação: a qualidade embrionária foi pior, com maior número de embriões C e D ($p= 0,013$, $OR=3,53$ e $IC= 1,31-9,58$), o índice de gravidez foi menor ($p=0,043$, $OR=2,57$ e $IC=1,03-6,41$), a perda gestacional foi maior ($p=0,094$, $OR=4,37$ e $IC=0,78-24,59$), o resultado perinatal foi pior ($p= 0,026$, $OR=5,13$ e $IC=1,39-18,97$).

Referências

- (1) Samrsla M, Nunes J C, Kalume C, Cunha ACRD, & Garrafa V. Bioethical study on the expectations of women awaiting assisted reproduction in a public hospital in the Federal District, Brazil. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2007,53(1), 47-52.
- (2) Elder K, Baker D, Ribes J. *Infections, infertility and assisted reproduction*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.
- (3) Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. Processing of semen in an antibiotic-rich medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1997; 67:98–103.
- (4) Craciunas L, Tsampras N, Fitzgerald C. Cervical Mucus removal before embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and sterility*, 2014, 101 (5): 1302-1307.
- (5) Kastrop PMM, Graaf-Miltenburg LAM, Gutknecht DR, Weima SM. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum. Reprod*. 2007; 22: 2243 – 2248.

- (6) Teixeira AMP, Ferriani RA, Soares EG, Rangel RM, Araújo MCP, & Bailão LA. Detecção de células escamosas vaginais no aspirado de fluido folicular durante fertilização in vitro. *Reprod. clim*, 1996, 11(4), 203-6.
- (7) Ben-Chetrit A, Shen O, Haran E, Brooks B, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. *Fertil Steril*. 1996; 66:335–337.
- (8) Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans* a case report. *RBM Online*, 2004; 8:569–573.
- (9) Foizer BRR, Amaral WND, & Sadoyama G. Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana; Research bacteriological and mycological culture of plates from embryos in the laboratory of human reproduction. *Reprod. clim*, 2011, 26(1), 12-18.
- (10) Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina Ci Agr*, 2006, 27, 289-298.
- (11) Pelzer ES, Allan JA, Cunningham K, Mengersen K, Allan JM, Launchbury T, & Knox CL. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. *Human reproduction*, 2011, 26(7), 1799-1812. [doi:10.1093/humrep/der108](https://doi.org/10.1093/humrep/der108)
- (12) Geibd fer WC, Böhmer K, Pelz C, Schoerner W, Frobenius C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:2788-2790.
- (13) Klein JU, Missmer SA, Jackson KV, Orasanu B, Fox JH, & Racowsky C. In vitro fertilization outcomes after transfer of embryos contaminated with yeast. *Fertility and sterility*, 2009, 91(1), 294-297.
- (14) Campos CO, Bernuci MP, Vireque AA, Campos JR, Silva-de-S  MF, Jamur MC, & Rosa-e-Silva ACJS. Preventing Microbial Contamination during Long-Term In Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis. *ISRN obstetrics and gynecology*, 2012.

- (15) Silveira TRD, Passos EP, Cheinquer H, Salazar CC, Facin AC, Souza, CABD, & Freitas F. Hepatite C em casais inférteis do setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul*, 2002, 22(2): 19-25.
- (16) Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different *g* forces. *Human Reproduction*, 2000, v. 15, n. 3, p. 662-666.
doi: 10.1093/humrep/15.3.662
- (17) Bielanski, A . Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* .1 July, 2007, 68(1): 1-22)
- (18) Abeyesundara PK, Dissanayake DMAB, Wijesinghe PS, Perera RRDP, & Nishad AAN. Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. *Journal of human reproductive sciences*, 2013, 6(2): 152.
- (19) Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JBM, Mazzulli T, & Jarvi, K. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertility and sterility*, 2012, 97(5), 1050-1055.
- (20) Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertility and Sterility*, September 2010, 94 (4),1525-1528.
- (21) Nikitina TV, Lebedev IN, Sukhanova NN, Sazhenova EA, Nazarenko S A. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: Significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors. *Fertility and Sterility*, April 2005, 83 (4): 964-972.
- (22) Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR, Cohen J. Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*, August 2005, 84(2): 343-355.
- (23) Kallen B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG and Otterblad, PO. Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in

- Sweden. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2010, 88: 137–143. doi: 10.1002/bdra.20645
- (24) Ferraretti AP, Goossens V, De Mouzon J, Bhattacharya S, Castilla JA, Korsak V, Kupka M, Nigren KG & Andersen AN. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2012, 27(9), 2571-2584.
- (25) Koneman E.W. et al. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1600p.
- (26) Lathi RB, Westphal LM, Milki AA. Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*, 2008, 89: 353–357.
- (27) Nagy, Z. P.; Greco, Mizhahi, F. E.; Antunes Jr, N.; Busso, R. E. In: Amaral et al, editores. *Tratado de Reprodução Assistida*. Ed. SBRH, p. 295-316, 2010.
- (28) Freitas M, et al. Crianças Nascidas após Emprego de Técnica de Fertilização Assistida. *Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum*. 2008; 18(3): 218-228.
- (29) Mendonça CRD, Cirqueira MB, & Amaral WND. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e anticorpos contra proteína de choque térmico 60 (HPS60) associados a fator de infertilidade tubária; *Chlamydia trachomatis* and antibodies against heat shock protein 60 (HPS60) associated with tubal factor infertility. *Femina*, 2012,40(1).
- (30) Castelo, JS. Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB : qual o agente mais comum?2012 <http://hdl.handle.net/10400.6/1151>.
- (31) Drezett J, Blake MDT, Lira KSFD; Pimentel RM, Adami F, Bessa MMM, Abreu LCD. Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres que sofrem crimes sexuais. *Reproducao & Climaterio*, 2012, 27(3): 109–116.
- (32) Bellelis P, Carvalho MHBD, Zugaib M. Abortamento de causa aloimune: diagnóstico e tratamento. *FEMINA*, 2009, 37(5).
- (33) Asemota OA, Nyirjesy P, Fox R, Sobel JD. *Candida glabrata* complicating in vitro pregnancy: successful management of subsequent pregnancy. *Fertility and sterility*, 95 (2), 2011, 803-e1.

- (34) Davachi ND, Miri SM. Embryo Culture Challenge: Microbial Contamination. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2013 November; 11(4): 207-8. DOI: 10.5812 / ijb.14733
- (35) Silva MFD. Escherichia coli e a resistência antibiótica: Uma análise do padrão de evolução da resistência da Escherichia coli aos antibióticos no distrito de Castelo Branco, de 2006 a 2008, (2009).
www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana_silvapdf.pdf
- (36) Agra HNDC. Análise do perfil de resistência e genotipagem da escherichia coli na infecção do trato urinário não complicada, 2007.
Disponível em: URL:<http://hdl.handle.net/10183/8942>
- (37) Ubillús TMJ, Aranda AL. Resistencia bacteriana en las infecciones urinarias de gestantes en un hospital de Huancayo. *Rev. Soc. Peru. Med. Interna*, 2008, 21(3): 100-103.
- (38) Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCS, Japiassú A, Pinheiro C T & Luiz RR. An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 2010, 18(1): 9-17.
- (39) Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL & Van Voorhis BJ. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertility and sterility*, 2010, 94(2): 543-548.
- (40) Xin, Zhi-min, et al. "Pregnancy outcomes of day 5 embryo transfer in patients at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome and analysis of factors affecting blastocyst formation." *Journal of International Medical Research*, 2013, 41.4: 1127-1134.
- (41) *Resolução RDC n° 23, 27 de maio de 2011.*
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f7c4804986e29a8e51ff4ed75891ae/RDC_23_2011.pdf?MOD=AJPERES

5. CONCLUSÕES

A pesquisa de placa de cultivo de embriões possui importância reprodutiva. Houve uma prevalência de 6,32 % de contaminação nas placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana.

Os principais agentes microrganismos encontrados foram, fúngicos: *Candida sp* (20%), *Penicilium sp* (13,34%), *Aspergillus sp* (10%), *Trychophyton rubrum*; e bacterianos: *Bacillus sp* (16%) *E. coli* (10%), *Staphylococcus sp* (10%), *Streptococcus sp* (6,67%), família enterobacteriaceae (*Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, 3,33% cada), e *Pseudomonas sp* (3,33%).

O resultado reprodutivo esteve comprometido na presença da contaminação: a qualidade embrionária foi pior, com maior número de embriões C e D, o índice de gravidez foi menor, o resultado perinatal foi pior.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise sistemática dos meios cultivo de embriões para presença de bactérias ou fungos possui importância reprodutiva. A relação entre contaminação, desenvolvimento embrionário e sucesso reprodutivo durante a fertilização assistida é de grande interesse para os laboratórios de reprodução.

O tipo de contaminação parece variar os resultados. A contaminação fúngica por *Candida* parece não interferir nas taxas de gestação e nascimentos, mas a contaminação por outros fungos e bactérias parece alterar a qualidade embrionária, aumentando o número de embriões classe C e D, recomendando a vigilância constante nas placas de embriões, bem como os protocolos de antimicrobianos associados à resistência bacteriana, adquirida com o tempo. Recomenda-se o estudo de toxicidade dos antibacterianos e antifúngicos que estão em fase de testes e para futuras substituições dos já empregados nos meios de cultura.

Observou-se um aumento no número de Blastocistos em detrimento de uma diminuição do número de embriões A e B, principalmente B ao longo dos anos. A razão desta proporção está no crescimento do cultivo de embriões de maior qualidade e melhores chances implantacionais.

Mesmo sendo um estudo com um número limitado de 30 amostras contaminadas e análise apenas das placas (a sorologia poderia fornecer mais dados de contaminação), este estudo comprovou que a contaminação microbiológica bacteriana em placas de cultivo de embriões interfere nas taxas de gestação e deve ser considerada como fator de contribuição dos fracassos em reprodução assistida. O pequeno número de estudos que correlaciona contaminação e sucesso em reprodução assistida deve ser um fator estimulante para estudos posteriores, que acompanhe o desenvolvimento do conceito após seu nascimento. O fator tubário de infertilidade feminina e sua possível correlação com causas intrínsecas de contaminação sugere uma investigação, com dados dos exames sorológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Salas limpas e ambientes controlados associados. *NBRISO14644-1: Classificação da limpeza do ar*. 2009.

Disponível em: <URL:<http://www.abntnet.com.br/fidetail.aspx?FonteID=24169>>.

AFONSO, May Socorro Martinez et al. **A qualidade do ar em ambientes hospitalares climatizados e sua influência na ocorrência de infecções**. Revista Eletrônica de Enfermagem, v. 6, n. 2, 2006.

AGRA, H. N. C.; BARROS, E. J. G. **Análise do perfil de resistência e genotipagem da *Escherichia coli* na infecção do trato urinário não complicada**. 2007.

Disponível em: <URL:<http://hdl.handle.net/10183/8942>>.

AMARAL, Waldemar Naves do; FOIZER, Barbara Rosa. **Contaminação em laboratórios de reprodução humana; Contamination in human reproduction laboratories**. *Reprod. clim*, v. 24, n. 4, p. 147-150, 2009.

ANTUNES JUNIOR, Nelson et al. **Fertilização in vitro com ciclos programados de baixo custo - avaliação de resultados iniciais de um centro de reprodução humana de hospital de ensino**. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 9, 2003

ASEMOTA, O.A., Nyirjesy, P, Fox, R., Sobel, J. D. **Candida glabrata complicating in vitro pregnancy: successful management of subsequent pregnancy**. *Fertility and sterility*, 95 (2) , 803-e1, 2011.

BALABAN, Başak et al. **The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting**. *Human Reproduction*, v. 26, n. 6, p. 1270-1283, 2011.

BELLELIS, Patrick; Mário Henrique Burlacchini de Carvalho; Marcelo Zugaib. **Abortamento de causa aloimune: diagnóstico e tratamento**. *FEMINA* vol 37, nº 5, 2009.

BEN-CHETRIT, A. et al. **Transfer of embryos from yeast-colonized dishes**. *Fertil Steril*, v.66, p.335–337, 1996.

BIELANSKI, A . **Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals**. *Theriogenology* .1 July 2007 (Vol. 68, Issue 1, Pages 1-22)

BIELANSKI, A.; VAJTA, G. **Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units**. *Human reproduction*, v. 24, n. 10, p. 2457-2467, 2009.

BURRELLO, N. et al. **Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans* a case report.** *RBM Online*, v.8, 569–573, 2004.

CASTELO, J. S. Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB : qual o agente mais comum?<http://hdl.handle.net/10400.6/1151>.2012

CAMPOS, C. O. ; M. P. Bernuci, A. A. Vireque, et al. **Preventing Microbial Contamination during Long-Term In Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis,”** *ISRN Obstetrics and Gynecology*, vol. 2012, Article ID 152781, 6 pages, 2012. doi:10.5402/2012/152781

CORDEIRO, R. Et al. **Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un período de 5 años / Behavior of nosocomial infection at the intensive care units during 5 years.***Rev. cuba. hig. epidemiol*; v. 40, n.2, p.79-88, mayo-ago. 2002.

COTTELL, E. et al. **Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system.***Fertil Steril*, v.66, p.776–780, 1996.

COTTELL, E. et al. **Processing of semen in an antibiotic-rich medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization.***Fertil Steril*, v. 67, p. 98–103, 1997.

CRACIUNAS, L., Tsampras, N., Fitzgerald, C. **Cervical mucus removal before embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *Fertility and sterility*, 101 (5): 1302-1307, 2014.

DOMES, T, Lo KC, Grober ED, Mullen JB, Mazzulli T, Jarvi K. **The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters.***Fertil Steril*.May;97(5):1050-, 2012.

DAVACHI, Navid Dadashpour , Seyyed Mohammad Miri. Embryo Culture Challenge: **Microbial Contamination***Iranian Journal of Biotechnology*.November; 11(4): 207-8. 2013. DOI: 10.5812 / ijb.14733

DREZETT, Jefferson; Márcia de Toledo Blake ; Kennya Silva Formiga de Lira ; Renata Martins Pimentel ; Fernando Adami; Maria Misrelma Moura Bessa; Luiz Carlos de Abreu. **Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres que sofrem crimes sexuais.** *Reproducao & Climaterio*. Volume 27, Issue 3, Pages 109–116,2012.

ELDER, K.; BAKER, D.; RIBES, J. **Infections, infertility and assisted reproduction.**Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.

FERRARETTI, A. P. et al. **Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE**. Human reproduction, v. 27, n. 9, p. 2571-2584, 2012.

FOIZER, Barbara Rosa Ribeiro; AMARAL, Waldemar Naves do; SADOYAMA, Geraldo. **Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana; Research bacteriological and mycological culture of plates from embryos in the laboratory of human reproduction**. Reprod. clim, v. 26, n. 1, p. 12-18, 2011.

FREITAS M, et al. **Crianças Nascidas após Emprego de Técnica de Fertilização Assistida**. Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum.; 18(3): 218-228, 2008.

GIVENS M. D., Marley M. S.D., Riddell K. P., Galik P. K., Stringfellow D. A. **Normal reproductive capacity of heifers that originated from *in vitro* fertilized embryos cultured with an antiviral compound**. Animal Reproduction Science. Vol. 113, Issue 1, Pages 283-286, 2009.

GEIBDORFER, W., C. Böhmer, K. Pelz, C. Schoerner, W. Frobenius, and C. Bogdan. **Tubeovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery**. J. Clin. Microbiol. 41:2788-2790.2003

JÚNIOR, João Andrade L. et al. **An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study**. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2010.

JUNQUEIRA, J. R. C., ALFIERI, A. A. **Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas**. *Semina Ci Agr*, 27, 289-298. 2006.

KALLEN, B., Finnström, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.-G. and Otterblad, P. O., **Congenital malformations in infants born after *in vitro* fertilization in Sweden**. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, 88: 137–143. doi: 10.1002/bdra.20645, 2010.

KASTROP, P. M.M. et al. **Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management**. Hum. Reprod; v.22, p. 2243 – 2248, 2007.

KLEIN, Joshua U. et al. **In vitro fertilization outcomes after transfer of embryos contaminated with yeast**. Fertility and sterility, v. 91, n. 1, p. 294-297, 2009.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1600p. 2008.

LARSEN, B.; MONIF, G. R. **Understanding the bacterial flora of the female genital tract.** *Clin. Infect. Dis.*, p. 32 e77, 2001.

LATHI, R.B., L.M. Westphal, A.A. Milki. **Aneuploiy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis.** *Fertil Steril*, 89, pp. 353–357, 2008.

MARTINS, S. G. et al. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of microrganisms isolated from the lower respiratory tract of inpatients in Divina Providencia Hospital-Porto Alegre, RS.** *Rev. bras. anal. clin;* 40(2):83-86, 2008.

MENDONÇA, Carolina Rodrigues de; CIRQUEIRA, Magno Belém; AMARAL, Waldemar Naves do. **Infecção por Chlamydia trachomatis e anticorpos contra proteína de choque térmico 60 (HPS60) associados a fator de infertilidade tubária; Chlamydia trachomatis and antibodies against heat shockprotein 60 (HPS60) associated with tubal factor infertility.** *Femina*, v. 40, n. 1, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Resolução RCD nº 33, de 17 de fevereiro de 2006. Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos.* 2009. URL: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20954&word1>

MORTIMER, D. **A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells directive (2004) on laboratory practices in assisted conception.** *RBM Online*, v.11, p.162–176, 2005.

NAGY, Z. P.; Greco, Mizhahi, F. E.; Antunes Jr, N.; Busso, R. E. In: Amaral et al, editores. **Tratado de Reprodução Assistida.** Ed. SBRH, p. 295-316, 2010.

NASCIMENTO-CARVALHO, Cristiana M. **Antibioticoterapia ambulatorial como fator de indução da resistência bacteriana: uma abordagem racional para as infecções de vias aéreas.** *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre, v. 82, n. 5, Nov. 2006 .

NICHOLSON, C.M.; ABRAMSSON, L.; HOLM, S.E. **Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces.** *Human Reproduction*, v. 15, n. 3, p. 662-666, 2000.

NIKITINA, T. V. ; Lebedev, I. N.; Sukhanova, N. N.; Sazhenova, E. A.; Nazarenko, S. A. **A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: Significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors.** *Fertility and Sterility* , April, Vol. 83, Issue 4, Pages 964-972, 2005.

NISHAD, AAN Prabath K Abeysundara, DMAB Dissanayake, Prasantha S Wijesinghe, RRDP Perera. **Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human sêmen.** *J Hum Reprod Sci.* Apr-Jun; 6(2): 152–157, 2013.

OLIVEIRA, R.D.R. DE; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ, R.. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 47, n. 3, Sept. 2001.

PARMEGIANI, L.; Accorsi, A.; Cognigni, G. E.; Bernardi, S.; Troilo, E.; Filicori, M. **Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos.** *Fertility and Sterility*, Vol. 94, Issue 4, Pages 1525-1528, 2010.

PELZER, E. S. et al. **Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes** *Hum. Reprod.*, 26 (7): 1799-1812, 2011.
doi:10.1093/humrep/der108

POMEROY, K. O.; 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** .*Fertility and Sterility* , Vol. 94, Issue 4, Pag. 1181-1188, 2010.

RDC n° 23, 27 de maio de 2011.

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f7c4804986e29a8e51ff4ed75891ae/RDC_23_2011.pdf?MOD=AJPERES

SAMRSLA, M; Nunes, J. C.; Kalume, C.; Cunha, A. C. R. da; Garrafa, V. **Expectativa de mulheres à espera de reprodução assistida em hospital público do DF - estudo bioético.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 53, n. 1, Feb. 2007.

SILVEIRA, Themis R. da et al. Hepatite C em casais inférteis do setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul**, v. 22, n. 2, p. 19-25, 2002.

SILVA, Mídana Felismino da. **Escherichia coli ea resistência antibiótica: Uma análise do padrão de evolução da resistência da Escherichia coli aos antibióticos no distrito de Castelo Branco, de 2006 a 2008.** 2009.
www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana_silvapdf.pdf

SOUZA, C. O.; Martins, D. D., Barbosa, C. C. da S.; Nahum, S. R.; Shiori, P. Y. **Perfil de resistência antimicrobiana de pseudomonas aeruginosa isoladas de fezes de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana** / *Cad. saúde colet.*, (Rio J.); v.5, n.3, p.379-392, jul.-set., 2007.

TEIXEIRA, et al. **Detecção de células escamosas vaginais no aspirado de fluido folicular durante fertilização in vitro.**Reprod. clim;11(4):203-6, out.-dez. 1996.

THOMAS, Mika R. et al. **Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer.**Fertility and sterility, v. 94, n. 2, p. 543-548, 2010.

UBILLÚS TRUJILLO, Milward José; ARANDA AVILA, Liz. **Resistencia bacteriana en las infecciones urinarias de gestantes en un hospital de Huancayo.** Rev. Soc. Peru. Med. Interna, v. 21, n. 3, p. 100-103, 2008.

VIEIRA, L. A. et al. **Colonização intestinal de recém-natos por enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos em unidade neonatal.***J Pediatr* (Rio J), v.75, n.2, p. 83-90, 1999.

WASHINGTON WINN, Jr.; ALLEN, Stephen; JANDA, William; KONEMAN, Elmer; PROCOP, Gary; SCHRECKENBERGER, Paul & WOODS, Gail. Koneman.**Diagnóstico Microbiológico.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WELLS, D.; Bermúdez, M. G.; Steuerwald, N.; Malter, H. E.; Thornhill, A. R.; Cohen, J.**Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos.** *Fertility and Sterility*, August , Vol. 84, Issue 2, Pages 343-355, 2005.

XIN, Zhi-min et al. **Pregnancy outcomes of day 5 embryo transfer in patients at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome and analysis of factors affecting blastocyst formation.**Journal of International Medical Research, v. 41, n. 4, p. 1127-1134, 2013.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Documento de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Pesquisador:

Título da Pesquisa:

Instituição Proponente:

Versão:

CAAE:

ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM PLACAS DE CULTIVO DE EMBRIÕES HUMANOS PRODUZIDOS EM LABORATÓRIOS DE REPRODUÇÃO E SUA RELAÇÃO COM O SUCESSO DOS PROCEDIMENTOS DE FERTILIZAÇÃO IN

Barbara Rosa Foizer Ribeiro

Faculdade de Medicina

1

14693113.2.0000.5078

Área Temática:

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Número do Parecer:

Data da Relatoria:

307.365

13/06/2013

DADOS DO PARECER

Estudo longitudinal prosectivo, que se dará de forma qualitativa, com abordagem descritiva, observacional.

Apresentará também a prevalência de contaminação, o tipo de microorganismo encontrado nas placas de cultivo em laboratórios de Reprodução Humana.
Hipótese: existe contaminação em placas de cultivo de embriões esta contaminação é de origem bacteriana, fúngica e viral a contaminação pode prejudicar o embrião/feto/concepto em vários estágios de desenvolvimento, bem como sua mãe?

Apresentação do Projeto:

Objetivo Primário:

Estabelecer a importância da pesquisa de micro-organismos contaminantes em fertilização assistida durante a manipulação de gametas e embriões.

Acompanhar o desenvolvimento do concepto em suas várias fases de desenvolvimento, desde a fase embrionária até seus primeiros meses de vida.

Objetivo Secundário:

Objetivo da Pesquisa:

Área 2. Reprodução Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo reprodução humana não contemplada acima.);

Patrocinador Principal: Faculdade de Medicina
74.605-020

(62)3269-8338 **E-mail:** cephcufg@yahoo.com.br

Endereço:

Bairro: CEP:

Telefone:

1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

St. Leste Universitario

UF: GO Município: GOIANIA

Fax: (62)3269-8426

Página 01 de 03

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE

GOIÁS - GO

Continuação do Parecer: 307.365

1. Analisar as placas de embriões e verificar a presença de micro-organismos (bactérias e fungos) em

laboratório de reprodução humana de alta complexidade. 2. Identificar esta contaminação quando

encontrada até o nível de gênero, e quando possível, até o nível de espécie.

3. Testar os níveis de toxicidade dos antibióticos já utilizados pelos meios de cultura e de outros antibióticos ainda não utilizados. 4. Avaliar o

desenvolvimento do

concepto, na fase embrionária, no período fetal, no nascimento e em seus primeiros meses de vida.

5. Avaliar a saúde da mãe em seu período gestacional e logo após o parto.

Riscos:

A pesquisa não traz risco ao paciente. Não modifica qualquer rotina do procedimento padrão da reprodução

assistida. O material a ser utilizado no estudo, no caso o meio de cultura dos embriões, é normalmente

descartado nas rotinas laboratoriais juntamente com a placa de cultivo.

Benefícios:

Pode trazer o benefício de, nos casos alterados, o laboratório ser informado da contaminação identificada para que possa tomar as medidas ideais de controle e proteção ao paciente. O tipo de contaminação encontrada trará uma direção aos fabricantes de meios de cultura para embriões e aos laboratórios, havendo também sugestões sobre o tipo de antibiótico que deve ser acrescentado neste meio, adequando-o para aumentar proteção nos procedimentos. Possíveis alterações genéticas, cromossômicas, morfológicas, comportamentais, e até mesmo o fracasso na reprodução assistida poderá ter abrangente explicação biológica que justifique as falhas na gestação e nas alterações de várias origens.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto apresenta grande viabilidade para aumentar a proteção nos procedimentos de reprodução assistida e poderá ter abrangente explicação biológica que justifique as falhas na gestação e nas alterações de várias origens. A maior importância deste estudo é devida à contribuição do efeito da contaminação sobre seres humanos manipulados em técnicas de reprodução assistida, para que providências sejam tomadas e protocolos de controle de contaminação tornem-se mais eficientes. Assim, o sucesso dos procedimentos de FIV e ICSI aumenta à medida que aumenta a qualidade dos embriões a serem transferidos. A integridade física e mental dos seres humanos fertilizados em laboratório está em questão, bem como de suas mães.

Portanto, promoverá uma avaliação do desenvolvimento e saúde dos conceitos e de suas mães, envolvidos em fertilização assistida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

74.605-020

(62)3269-8338 E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Endereço:

Bairro: CEP:

Telefone:

1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

St. Leste Universitario

UF: GO Município: GOIANIA

Fax: (62)3269-8426

Página 02 de 03

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE

GOIÁS - GO

Continuação do Parecer: 307.365

O projeto apresenta instrução completa e adequada dos procedimentos, objetividade, fundamentação.

Identificação dos responsáveis;

Folha de rosto assinada;

Autorização para manuseio de prontuários;

Apresenta todos os termos de apresentação obrigatória.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações:

O estudo está de acordo com as recomendações da Res. CNS 466/2012 não apresentando nenhum óbice ético, consideramos aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Não

Necessita Apreciação da CONEP:

Projeto Aprovado.

Informamos que o pesquisador responsável deverá encaminhar a este Comitê, via Plataforma Brasil, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O Comitê pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 e suas complementares.

Considerações Finais a critério do CEP:

GOIANIA, 18 de Junho de 2013

JOSE MARIO COELHO MORAES

(Coordenador)

Assinador por:

74.605-020

(62)3269-8338 **E-mail:** cephcufg@yahoo.com.br

Endereço:

Bairro: CEP:

Telefone:

1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

St. Leste Universitario

UF: GO Município: GOIANIA

Fax: (62)3269-8426

Página 03 de 03

Anexo 2 - protocolo de controle de qualidade

Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 23, de 27 de maio de 2011

Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 26 de maio de 2011 adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aprovado o Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos nos termos desta Resolução.

CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES INICIAIS

Seção I

Objetivo

Art. 2º Este regulamento possui o objetivo de instituir critérios mínimos para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTG) visando a segurança e qualidade das células, tecidos germinativos e embriões utilizados.

Seção II

Abrangência

Art. 3º Este regulamento se aplica a todos os estabelecimentos de natureza pública ou privada que realizem atividades com células, tecidos germinativos e embriões, para uso próprio ou doação.

Seção II

Definições

2/19

Art. 4º Para efeito deste regulamento técnico são adotadas as seguintes definições:

I- amostra: material biológico (células ou tecidos germinativos) obtido a partir de cada coleta;

II- ambiente: espaço fisicamente determinado e especializado para o desenvolvimento de determinada(s) atividade(s), caracterizado por dimensões e instalações diferenciadas, podendo constituir-se de uma sala ou de uma área;

III- ante-câmara: área contígua à sala de processamento que garanta o acesso exclusivo de pessoas a esta.

IV-Banco de Células e Tecidos Germinativos - BCTG: serviço de saúde destinado a selecionar, coletar transportar, registrar, processar, armazenar, descartar e liberar células, tecidos germinativos e embriões, para uso próprio ou em doação, de natureza pública ou privada;

V- células germinativas: gameta masculino (espermatozóide) e gameta feminino (ovócito ou oócito);

VI- embrião: produto da fusão das células germinativas até 14 dias após a fertilização, in vivo ou in vitro, quando do início da formação da estrutura que dará origem ao sistema nervoso;

VII- fertilização in vitro convencional - FIV: técnica de reprodução humana assistida em que a fertilização do oócito pelo espermatozóide ocorre, de maneira espontânea, em laboratório;

VIII- FIV com injeção intracitoplasmática do espermatozóide - ICSI: técnica de reprodução humana assistida onde a fertilização é obtida por meio da injeção de um único espermatozóide, no citoplasma do oócito, utilizando-se da técnica de micromanipulação.

IX- gameta (ovócito ou oócito e espermatozóide): célula germinativa, que ao se unir a outra célula germinativa origina uma célula diplóide, que pode se desenvolver e resultar em um novo indivíduo;

X-garantia da qualidade: conjunto de atividades planejadas, sistematizadas e implementadas no sistema de qualidade, que venham a conferir um nível de confiança adequado aos produtos e serviços;

XI- micromanipulação: conjunto de técnicas de laboratório para a manipulação de espermatozoides, oócitos e pré-embriões com a utilização de microscópio óptico, micropipetas ou microagulhas e micromanipulador;

XII- processamento do sêmen: conjunto de técnicas laboratoriais com fins de preparo prévio a criopreservação ou para seleção e separação dos espermatozoides em técnicas de reprodução humana assistida;

XIII- reprodução humana assistida: inclui as técnicas utilizadas para obtenção de uma gravidez sem relação sexual;

3/19

XIV- sêmen: fluido composto por células germinativas, não-germinativas e secreções produzidas pela próstata, ducto deferente distal e vesículas seminais, adicionadas sequencialmente, e eliminado pela uretra durante a ejaculação;

XV- sala de coleta: unidade destinada ao desenvolvimento de atividades relacionadas à coleta de

oócitos, coleta cirúrgica de espermatozóides e coleta de tecidos germinativos;
XVI- tecido germinativo: tecido de origem ovariana ou testicular, contendo células germinativas;
XVII- treinamento: ação presencial voltada ao desenvolvimento de habilidades predominantemente motoras e ao aprendizado de atividades operacionais, sem dispensar a parte cognitiva; e
XVIII- uso terapêutico: utilização de células ou tecidos germinativos de um doador, para propiciar a capacidade reprodutiva e/ou endócrina própria ou capacidade reprodutiva de terceiros.

CAPÍTULO II

DO FUNCIONAMENTO DE BANCO DE CÉLULAS E TECIDOS GERMINATIVOS

(BCTG)

Seção I

Disposições gerais

Art. 5º O BCTG deve apresentar licença de funcionamento, licença sanitária ou alvará sanitário atualizado, emitido pelo órgão de vigilância sanitária competente, observado o disposto no parágrafo único do artigo 10 da Lei n. 6.437, de 20 de agosto de 1977, e as disposições legais estaduais ou municipais complementares.

Parágrafo único. O serviço que incluir em suas instalações um BCTG pode solicitar a inclusão da descrição desta atividade na licença sanitária do respectivo serviço, cabendo ao órgão de vigilância sanitária competente a deliberação sobre esta solicitação.

Art. 6º O BCTG é o responsável por todos os procedimentos relacionados ao preparo das células, tecidos

germinativos e embriões, incluindo a coleta, o transporte, o registro, o processamento, o armazenamento, o descarte e a liberação do material.

§1º As atividades de registro, processamento, descarte e a liberação do material são exclusivas do BCTG, sendo vedada sua terceirização.

§2º As atividades que não forem executadas diretamente pelo BCTG devem ser formalizadas por meio de contrato de terceirização com o prestador do serviço.

§3º O prestador de serviço contratado deve possuir instalações, equipamentos, conhecimento adequado, além de experiência e pessoal competente para desempenhar satisfatoriamente o serviço solicitado pelo contratante e atender aos requisitos técnicos e legais estabelecidos na legislação vigente.

4/19

§4º O contrato de terceirização deve definir as responsabilidades e atribuições específicas do contratante

E do contratado e permanecer à disposição para apresentação às autoridades sanitárias.

§5º A terceirização de atividade não exime o BCTG quanto ao cumprimento dos requisitos técnicos e legais estabelecidos na legislação vigente, respondendo solidariamente com o contratado perante as autoridades sanitárias quanto aos aspectos técnicos, operacionais e legais inerentes à atividade terceirizada.

Art. 7º Em caso de terceirização, o estabelecimento contratado pelo BCTG que passará a exercer as atividades deverá possuir a atividade executada em sua licença sanitária.

Parágrafo único. Para a atividade de armazenamento de células, tecidos germinativos e embriões, o contrato formalizado entre as partes deve prever o destino do material em caso de ausência de pagamento, conforme normas vigentes sobre o assunto.

Art. 8º Caso o BCTG encerre sua atividades, o responsável legal deverá responsabilizar-se pelo destino das células, tecidos germinativos e embriões criopreservados, bem como garantir que a documentação do casal/doador seja mantida por um período mínimo de 20 (vinte) anos.

Parágrafo único. O responsável legal pelo serviço deve convocar todos os pacientes com amostras/embriões criopreservados para assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico, prevendo o destino do material criopreservado.

Seção II

Atribuições

Art. 9º São atribuições do BCTG:

I- efetuar e garantir a qualidade do processo de seleção do paciente e/ou doador de células e tecidos germinativos;

II- obter Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme modelo padronizado pelo BCTG, de acordo com a legislação vigente;

III- orientar, viabilizar e proceder à coleta, quando necessário;

IV- avaliar, processar, armazenar e liberar as células ou tecidos recebidos ou coletados;

V- providenciar a realização dos exames laboratoriais para identificação de possíveis contraindicações e condições especiais necessárias ao uso das amostras;

VI- fornecer todas as informações necessárias a respeito da amostra a ser utilizada, respeitando o sigilo, cabendo ao médico do paciente a responsabilidade pela sua utilização, quando couber, segundo legislação vigente;

VII- manter arquivo próprio com dados sobre coleta, processamento, armazenamento, avaliação, transporte e liberação do material;

5/19

VIII- enviar relatório anual com os dados quantitativos de produção do BCTG por meio do Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio) informando:

- a) o número de ciclos realizados com pelo menos um óocito captado;
- b) o número de óocitos produzidos;
- c) o número de óocitos inseminados;
- d) o número de óocitos com 2 pró-núcleos (2PN) formados;
- e) o número de embriões clivados;
- f) o número de embriões transferidos a fresco;
- g) o número de embriões transferidos após descongelamento;
- h) o número de embriões desprezados por ausência de clivagem em período superior a 48h (quarenta e oito horas).

Seção III

Regimento Interno

Art.10 O BCTG deve possuir um regimento interno do qual conste:

I- finalidade;

II- organograma descrevendo a estrutura administrativa e técnico-científica, com definição do responsável legal e do responsável técnico;

III- relação nominal, acompanhada da correspondente assinatura de todo o pessoal administrativo e técnico-científico, indicando a qualificação, as funções e responsabilidades do responsável técnico e dos demais profissionais do serviço.

Parágrafo único. As funções de responsável legal e responsável técnico poderão ser exercidas pelo mesmo profissional.

Seção IV

Manual Técnico Operacional

Art. 11. O BCTG deve possuir Manual Técnico Operacional, definindo com detalhes todos os procedimentos de seleção de doadores e pacientes, coleta, transporte, processamento, armazenamento, liberação, descarte, registros e outros que se fizerem necessários, sob a forma de instruções escritas.

§1º Este documento deve estar acessível, a qualquer momento, a todos os funcionários e permanecer disponível nas formas impressa ou eletrônica, nos respectivos setores do serviço.
6/19

§2º O cumprimento das disposições contidas no manual técnico operacional é obrigatório para todos os profissionais do BCTG.

§3º O Responsável Técnico deve assegurar que todos os procedimentos descritos no manual técnico operacional sejam compreendidos e implementados no BCTG.

§4º Caso o serviço utilize a forma eletrônica do manual, deve existir pelo menos uma cópia impressa no serviço.

Art. 12. O manual técnico operacional deve ainda:

I- definir as atribuições dos profissionais para cada procedimento;

II- conter as condutas frente às não-conformidades;

III- conter as normas de biossegurança, tais como:

- a) condutas de segurança biológica, química, física, ocupacional e ambiental;
- b) instruções de uso para os equipamentos de proteção individual – EPI e coletiva –EPC;
- c) procedimentos em caso de acidentes; e
- d) manuseio e transporte de amostra biológica.

Parágrafo único. O manual a que se refere o *caput* deste artigo deve ser revisado anualmente ou em prazo inferior, sempre que necessário, bem como permanecer atualizado e devidamente assinado e datado pelo Responsável Técnico.

Seção V

Recursos Humanos

Art. 13 A responsabilidade técnica pelo BCTG deve ficar a cargo de profissional de nível superior com treinamento em reprodução humana assistida, legalmente habilitado e com registro no respectivo conselho de classe.

Art. 14 O BCTG deve contar, na área técnica, com recursos humanos com formação de nível superior, observada a regulamentação profissional respectiva, e treinamento comprovado para atuar na área de embriologia humana, processamento e controle da qualidade de procedimentos realizados em BCTG.

CAPÍTULO III

DOS CRITÉRIOS TÉCNICOS E OPERACIONAIS PARA SELEÇÃO DE DOADORES E PACIENTES

Art. 15 A doação de células, tecidos germinativos e embriões deve respeitar os preceitos legais e éticos sobre o assunto, devendo garantir o sigilo, a gratuidade e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

7/19

§1º Toda a informação relativa a doadores e receptores de células, tecidos germinativos e embriões deve ser coletada, tratada e custodiada no mais estrito sigilo.

§2º Não pode ser facilitada nem divulgada informação que permita a identificação do doador ou

do receptor.

§3º Na doação anônima, o receptor não pode conhecer a identidade do doador, nem o doador a do receptor.

§4º As autoridades de vigilância sanitária podem ter acesso aos registros para fins de inspeção e investigação.

§5º Em casos especiais, por motivo médico ou jurídico, as informações sobre o doador ou receptor podem ser fornecidas exclusivamente para o médico que assiste o receptor, resguardando-se a identidade civil do doador.

§6º A doação não pode ser remunerada.

Art. 16 Os projetos de pesquisa envolvendo o uso de células, tecidos germinativos e embriões somente podem ser desenvolvidos após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Parágrafo único. Os projetos de pesquisa desenvolvidos só poderão ocorrer após o consentimento do doador, conforme legislação vigente.

Art. 17 O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve ser obtido antes da coleta da amostra, por escrito, e assinado pelo médico e pelos pacientes ou doador.

Parágrafo único. Os procedimentos só poderão ser executados pelo BCTG após a assinatura do consentimento pelo doador e pacientes.

Art. 18 O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve ser redigido em linguagem clara e compreensível e deve conter, quando couber:

I- autorização para realização dos procedimentos de reprodução humana assistida;

II- autorização para transferência de embriões;

III- autorização para criopreservação das amostras e embriões;

IV- autorização para doação de óocitos, para doação de sêmen e para doação de embriões com fins terapêuticos;

V- autorização para descartar as amostras que não atenderem aos critérios para armazenamento ou uso posterior pelo BCTG;

VI- autorização para a coleta de sangue para a realização dos testes obrigatórios pela legislação e outros descritos pelo BCTG;

VII- autorização da paciente receptora, no caso de recebimento de óocitos doados a fresco, contendo informações claras sobre o risco de contrair doenças infecciosas;

8/19

VIII- manifestação da vontade de doar ou não o material para projetos de pesquisa que tenham sido previamente aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Parágrafo único. Na hipótese do inciso III deste artigo, os pacientes devem ser informados da redução da viabilidade das amostras e embriões descongelados, bem como da possibilidade de contaminação cruzada entre as unidades congeladas, com risco de contrair doenças infecciosas;

Art. 19 É candidato à doação de células e tecidos germinativos e embriões indivíduo que satisfaça pelo menos as seguintes condições:

I- maioridade civil;

II- concordar em realizar uma avaliação médico-laboratorial;

III- concordar em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

IV- se doador de sêmen, concordar em realizar os testes para marcadores de doenças infectocontagiosas, conforme artigos 21 e 22;

V- se doadora de óocito, concordar em realizar os testes para marcadores de doenças infectocontagiosas, conforme artigos 21 e 22;

VI- se doador de embriões, concordar em realizar os testes para marcadores de doenças infectocontagiosas, conforme artigos 21 e 22.

§1º Os testes a que se refere o inciso IV deste artigo devem ser repetidos num prazo nunca inferior a 6 (seis) meses, no caso de serem realizados por sorologia.

§2º Doadoras de óocito a fresco não são submetidas à quarentena nem à repetição dos testes em prazo de 6 (seis) meses, devendo os resultados dos testes laboratoriais ter prazo máximo de 30 (trinta) dias antes do procedimento da coleta oocitária.

§3º Caso haja doação de óocitos criopreservados, os testes para marcadores de doenças infectocontagiosas,

conforme art. 21, devem ser repetidos num prazo nunca inferior a 6 (seis) meses, no caso de serem realizados por sorologia.

§4º Caso haja doação de embriões criopreservados para uso terapêutico, estes testes devem ser repetidos num prazo nunca inferior a seis meses, no caso de serem realizados por sorologia.

§5º Caso sejam realizados testes de ácido nucléico (NAT), os prazos de que tratam os §§ 1º, 3º e 4º devem respeitar as instruções do fabricante quanto ao período mínimo necessário à detecção do agente.

Art. 20 Os doadores de sêmen, óocitos e embriões devem ser selecionados com base em sua idade

e condição clínica.

§1º A aplicação do questionário de triagem dos doadores deve ser realizada por profissional de nível superior, treinado e qualificado.

9/19

§2º A entrevista do potencial doador deverá considerar condições físicas e mentais debilitantes, doenças graves, doenças genéticas e outras condições clínicas que contraindiquem a doação, conforme protocolos definidos pelo serviço.

§3º É critério de exclusão de doadores as seguintes condições a triagem laboratorial reagente para as seguintes infecções transmissíveis:

I- sífilis;

II- HIV 1;

III- HIV 2;

IV- Hepatite B;

V- Hepatite C;

VI- HTLV I e II;

VII- *Chlamydia trachomatis*;

VIII- *Ureaplasma urealyticum*;

IX- *Mycoplasma hominis*;

X- *Neisseria gonorrhoeae* e

XI- bactérias aeróbias.

Art.21 Para a seleção de doadores e pacientes devem ser realizados testes laboratoriais para:

I- Sífilis;

II- Hepatite B (HBsAg e anti-HBc);

III- Hepatite C (anti-HCV);

IV- HIV 1 e HIV 2;

V- HTLV I e II.

Parágrafo único. Caso algum resultado sorológico seja reagente, o BCTG deve comunicar imediatamente ao doador, e encaminhá-lo a um serviço de assistência especializado, para que sejam tomadas as medidas cabíveis.

Art. 22 Devem ser realizados exames para a detecção de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae* e bactérias aeróbias em doadores de sêmen, óocitos e tecidos ovariano e testicular.

10/19

Art. 23 Pacientes que realizam procedimentos com células e tecidos germinativos para uso próprio devem satisfazer as seguintes condições:

I- indicação clínica do procedimento;

II- assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente ou seus responsáveis legais;

III- realização da triagem laboratorial, como descrito no art. 21.

Art. 24 O paciente será informado dos resultados dos exames, e em caso de resultados positivos, decidirá pelo processamento e/ou criopreservação do material.

Art. 25 Caso os pacientes optem pela doação, após utilizadas amostras para uso próprio, os critérios de triagem clínica, laboratorial e microbiológica devem seguir o disposto nos arts. 19, 20, 21 e 22 deste regulamento.

Art. 26 Os testes de triagem sorológica e microbiológica podem ser feitos por laboratório próprio ou por laboratório terceirizado e que atenda às exigências legais para o seu funcionamento.

§1º Os testes de triagem laboratorial devem ser realizados por laboratórios qualificados pelo BCTG.

§2º Em caso de sêmen doado, as amostras sanguíneas para triagem laboratorial deverão ser obtidas no mesmo dia da coleta do sêmen do doador.

CAPÍTULO IV

DA INFRA-ESTRUTURA E DAS CARACTERÍSTICAS DOS AMBIENTES E EQUIPAMENTOS DOS BCTG

Art. 27 O BCTG deve ser constituído por ambientes numa disposição que permita o fluxo independente dos materiais, amostras e profissionais, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada Anvisa nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre o Regulamento Técnico destinado ao planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde ou a que vier a substituí-la, bem como as exigências específicas contidas nesta resolução e demais legislações vigentes.

Art. 28 Quando o BCTG estiver instalado em um estabelecimento assistencial de saúde, ele poderá utilizar a infra-estrutura geral deste serviço, como sanitários, central de material esterilizado, depósito de material de limpeza, entre outros.

Art. 29 O BCTG deve possuir sistema de energia elétrica de emergência de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada ANVISA nº 50, de 2002, ou a que vier a substituí-la.

Parágrafo único. Para todos os ambientes devem ser utilizados sistemas de energia elétrica de emergência classificados como Classe > 15, Grupo 0, exceto a sala de processamento e o laboratório de fertilização in vitro, que devem ser classificados como Classe 15, Grupo 0.

Art. 30. A sala de coleta de oócitos e de tecidos ovariano e testicular deve apresentar:
11/19

- I - sistema de climatização com pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes;
- II - manutenção de temperatura entre 23° C a 27° C;
- III - umidade relativa 40% a 70%;
- IV - vazão mínima de ar exterior de 6 (m³/h)/m²;
- V - vazão mínima de ar total de 18 (m³/h)/m²; e
- VI - filtragem mínima de insuflamento classe G4.

Parágrafo único. A sala a que se refere o "caput" deste artigo deve possuir ainda dimensões equipamentos, instrumental, materiais e fármacos que permitam a realização dos procedimentos de coleta com segurança, bem como o atendimento em casos de situações de agravo à saúde.

Art. 31 Caso haja uso de anestésicos durante o procedimento de coleta, a sala de coleta deve, ainda, estar equipada, no mínimo, com:

- I- 1 (um) posto de utilização de oxigênio medicinal;
- II- 1 (um) posto de utilização de ar medicinal, e
- III- equipamentos, instrumental, materiais e fármacos que permitam a realização dos procedimentos de anestesia e coleta com segurança, bem como o atendimento em casos de situações de agravo à saúde.

§1º Os postos de utilização devem ser instalados conforme descrito na Resolução de Diretoria Colegiada ANVISA nº 50, de 2002, que estabelece Normas para Projetos Físicos de Estabelecimentos Assistenciais de Saúde, ou a que vier a substituí-la.

§2º O paciente anestesiado deve permanecer monitorizado até o momento de sua liberação.

§3º A coleta de oócitos pode ser realizada em centro cirúrgico ambulatorial.

Art. 32 A sala de coleta de sêmen deve garantir o conforto e a privacidade do paciente/doador e possuir um sanitário com acesso exclusivo.

Art. 33 A sala de apoio administrativo deve ser destinada a realizar serviços de documentação e informação em saúde.

Art. 34 O BCTG deve possuir vestiário de barreira no acesso às salas técnicas e à sala de coleta oocitária, dotado de lavatório e área de paramentação.

§ 1º As salas técnicas (sala de processamento e/ou laboratório de FIV) e a sala de coleta oocitária podem compartilhar o mesmo vestiário de barreira.

§ 2º Caso o BCTG possua sala de coleta oocitária, deve haver área com lavabo cirúrgico, localizada entre o vestiário de barreira e a sala de coleta.

12/19

Art. 35. Caso a sala de processamento de sêmen seja separada do laboratório de fertilização in vitro, deve possuir:

- I - sistema de climatização com condições de controle da temperatura entre 21°C a 27°C;
- II - umidade relativa do ar entre 40% a 70%; e
- III - filtragem mínima no insuflamento com filtros G3.

Art. 36 Caso o armazenamento das células ou tecidos seja efetuado em tanques de nitrogênio líquido, ou haja um sistema de segurança com nitrogênio líquido para congelador com temperatura igual ou inferior a 135°C negativos, a sala de criopreservação/armazenamento deve possuir:

- I - visualização externa do seu interior;
- II- sistema exclusivo de exaustão mecânica, para diluição dos traços residuais de nitrogênio, que possibilite a exaustão forçada de todo o ar da sala de criopreservação e armazenamento, com descarga para o ambiente externo do prédio; e
- III- sensor do nível de oxigênio ambiental com alarmes sonoro e visual.

§1º O sistema de exaustão mecânica deve manter uma vazão mínima de ar total de 75 (m³/h)/m².

§2º O ar de reposição deve ser proveniente dos ambientes vizinhos ou suprido por insuflação de ar exterior, com filtragem mínima com filtro classe G1.

§3º As grelhas de captação do sistema de exaustão mecânica devem ser instaladas próximas ao piso.

Art. 37 Caso o armazenamento seja efetuado em congelador acionado por energia elétrica ou que faça uso de nitrogênio, com temperatura igual ou inferior a 135°C negativos, a área de armazenamento deve contar com controle de temperatura ambiental.

Art. 38 O laboratório de fertilização in vitro deve possuir:

- I-sistema de climatização que mantenha pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes;
- II-condições de controle da temperatura entre 23°C a 27°C;
- III- umidade relativa do ar de 40% a 70%;
- IV- vazão mínima de ar total de 45(m³/h)/m²;
- V- vazão mínima de ar exterior de 15(m³/h)/m² e;
- VI- filtragem mínima no insuflamento com filtros G3+carvão ativado+F8.

13/19

§ 1º O ambiente a que se refere o *caput* deste artigo não deve possuir qualquer instalação hidrossanitária, tais como pias, ralos ou lavatórios.

§ 2º O insuflamento de ar do sistema de climatização da sala a que se refere o *caput* deste artigo

deve ser efetuado de forma a não interferir no fluxo do equipamento utilizado para a manipulação de amostras.

Art 39 A manipulação das amostras deve ser efetuada em uma área limpa classificada, no mínimo, como ISO Classe 5, segundo a Resolução de Diretoria Colegiada da ANVISA no 50, de 2002, ou a que vier a substituí-la, e, para a obtenção dessas condições, o BCTG deve utilizar uma das seguintes opções:

I- cabine de segurança biológica Classe II Tipo A;

II- módulo de fluxo unidirecional ; ou

III- sala classificada, como ISO classe 5 no mínimo, segundo as orientações da Resolução de Diretoria Colegiada ANVISA no 50, de 2002, ou a que vier a substituí-la.

Parágrafo único. No caso do inciso III deste artigo, o BCTG deve obrigatoriamente possuir uma antecâmara de acesso à sala de processamento.

Art. 40 O procedimento de transferência de embriões humanos pode ser realizado na sala de coleta oocitária, em centro cirúrgico ambulatorial ou em consultório ginecológico destinado para tal finalidade.

Parágrafo único. Caso a transferência de embriões seja realizada em pacientes sob anestesia, o procedimento deve ocorrer exclusivamente na sala de coleta oocitária ou em centro cirúrgico ambulatorial.

Art. 41 São requisitos mínimos adicionais dos ambientes e equipamentos do BCTG:

I- possuir os equipamentos e instrumentos específicos e em quantidade necessária ao atendimento de sua demanda;

II- manter instruções escritas e atualizadas, referentes ao uso dos equipamentos disponíveis aos funcionários do setor, as quais devem ser complementadas por manuais do fabricante em língua portuguesa;

III- manter e implementar um programa de manutenção preventiva e corretiva, onde conste um cronograma de intervenção;e

IV- manter os equipamentos de medição calibrados mantendo os respectivos registros;

Parágrafo único. Todas as intervenções realizadas nos equipamentos devem ser registradas sistematicamente, informando o dia, o responsável pela intervenção, a descrição da intervenção e em caso de substituição de peças, a lista das peças substituídas.

14/19

CAPÍTULO V

DA COLETA, PROCESSAMENTO, CRIOPRESERVAÇÃO, ARMAZENAMENTO, LIBERAÇÃO E TRANSPORTE DAS CÉLULAS, TECIDOS GERMINATIVOS E EMBRIÕES

Art. 42 Todos os procedimentos críticos realizados no BCTG, desde a coleta até a liberação das células, tecidos germinativos e embriões devem ser validados.

Parágrafo único. A validação deve ser realizada com base em estudos desenvolvidos pelo próprio serviço ou em informações publicadas de procedimentos já estabelecidos por estudos clínicos.

Art.43 Todos os materiais utilizados e que mantenham contato com as células ou tecidos germinativos, devem ser estéreis, apirogênicos, não citotóxicos e, quando couber, de uso único, devendo ser registrados a respectiva origem e o número de lote.

§ 1º Os materiais e reagentes que mantenham contato com as células, tecidos germinativos e embriões devem estar regularizados junto à Anvisa.

§2º Os materiais passíveis de processamento devem seguir o disposto em legislação específica vigente.

Art. 44 As células ou tecidos coletados e rotulados podem ser mantidos, temporariamente, até o processamento nas seguintes condições:

I – sêmen e espermatozóides: temperatura entre 25°C e 37°C, no máximo por até 2 (duas) horas ou em período superior validado pelo BCTG;

II- oócito e embriões: temperatura de 37°C ± 0,2°C, em prazo validado pelo BCTG;

III- tecido ovariano e tecido testicular: temperatura de 4°C ± 2°C, por um período de 24 horas ou período superior validado pelo BCTG.

Art. 45 Deve ser atribuída, a cada amostra coletada, uma identificação numérica ou alfanumérica.

§1º A identificação de que trata este artigo deve acompanhar toda a documentação do doador ou paciente, e o material, permitindo sua identificação e rastreabilidade, desde a coleta até a disponibilização das células, tecidos germinativos e/ou embrião.

§2º O material usado para a identificação das amostras deve ser impermeável e resistente a baixas temperaturas.

Art. 46 Todo o processamento das células e tecidos germinativos e embriões deve ocorrer exclusivamente em área classificada como ISO Classe 5 (Classe 100), conforme especificado no art. 39 e obedecer as práticas de manipulação asséptica.

Parágrafo único. A manipulação dos materiais, meios ou soluções de cultura/preservação de células, tecidos germinativos e embriões humanos também deve ser efetuada em área classificada como ISO Classe 5 (classe 100).

15/19

Art. 47 Não é permitido o processamento simultâneo de amostras de mais de um paciente/doador

no mesmo ambiente.

Art.48 O BCTG deve registrar, em formulário padronizado, a execução do processamento de cada amostra, com as seguintes informações:

- I- identificação da amostra;
- II- data e hora do início do processamento;
- III- parâmetros qualitativos iniciais;
- IV- método de processamento;
- V- parâmetros qualitativos finais;
- VI- data e hora do término do processamento; e
- VII- identificação do executor do processamento.

Art. 49 A criopreservação das amostras deve ocorrer o mais precocemente possível, com descrição do procedimento em instruções escritas e validado pelo BCTG.

§1º O BCTG deve ter reservatórios ou containers específicos para o armazenamento de sêmen, tecidos germinativos, oócitos, quando couber, e embriões.

§2º O BCTG deve manter registros da avaliação da viabilidade de cada amostra descongelada para uso.

§3º As amostras criopreservadas devem ser depositadas em um local fixo e pré-determinado que permita a sua localização com facilidade, rapidez e segurança

§4º Caso o BCTG realize atividades com doadores deverá haver congeladores ou reservatórios específicos e exclusivos para amostras processadas e ainda não liberadas (em quarentena) e para amostras liberadas.

Art. 50 O BCTG deve desenvolver um sistema de gerenciamento de risco que previna contaminação cruzada das amostras não liberadas (em quarentena).

Parágrafo único. O BCTG deve possuir instruções escritas que contenham as medidas a serem adotadas com o container de quarentena caso alguma amostra seja positiva para os exames da triagem laboratorial exigidas nos artigos 21 e 22.

Art. 51 Deve ser mantido registro diário das condições dos equipamentos, refrigeradores ou congeladores, documentando a temperatura e o nível de CO2 (para incubadora).

§1º A verificação e o registro da temperatura e do nível de CO2, quando couber, devem ser realizados, a intervalos máximos de 12 h (doze horas) para os equipamentos que não disponham de registrador automático ou em prazos superiores, desde que devidamente validados pelo BCTG. 16/19

§2º Os registros devem ser assinados e periodicamente revisados por uma pessoa qualificada;

§3º Os alarmes devem ser testados, e deve haver um procedimento escrito, definindo a conduta a ser tomada em relação ao armazenamento das amostras, em caso de falta de energia ou de defeito nos equipamentos de estocagem;

§4º O BCTG deve dispor de um sistema de segurança, incluindo monitoramento da temperatura dos equipamentos de armazenamento, alarmes em casos de mau funcionamento, ou temperaturas excedendo os limites permitidos, e instruções de procedimentos corretivos de emergência, bem como plano de remoção do material em casos de sinistros.

Art. 52 O volume de nitrogênio líquido, nos reservatórios deve ser controlado e registrado duas vezes por semana ou em prazos superiores, desde que devidamente validados pelo BCTG.

Art. 53 O BCTG deve realizar controle microbiológico de ambientes e equipamentos (incubadora de CO2) utilizados para o processamento das células, tecidos germinativos e embriões.

Parágrafo único. O controle microbiológico dos ambientes e da incubadora de CO2 deverá ser realizado semestralmente ou a intervalos de tempo menores, de acordo com protocolos validados pelo BCTG.

Art. 54 A amostra somente poderá ser liberada se atendidas as seguintes condições:

- I- observância dos critérios de triagem clínica, laboratorial e microbiológica;
- II-compatibilidade com os parâmetros mínimos de viabilidade da amostra definidos pelo BCTG; e
- III- a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do paciente ou doador.

Art. 55 O transporte das amostras deve ser validado e realizado de acordo com as especificações técnicas fornecidas pelo BCTG.

§ 1º O transporte das amostras não criopreservadas deve ser feito em recipiente térmico que mantenha a temperatura interior específica para cada tipo de amostra, segundo o art.44 desta Resolução.

§2º A amostra ou os embriões criopreservados devem ser acondicionados em reservatórios identificados e com o material refrigerante adequado para a preservação das características e funções biológicas da amostra ou do embrião.

§3º A irradiação do material é expressamente proibida.

§4º No lado externo do recipiente térmico, ou no caso de embalagem externa, deve constar o aviso "MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO. NÃO SUBMETER À RADIAÇÃO (RAIOS X)".

§5º As amostras ou os embriões transportados devem ser acompanhados de termo de transporte assinado pelo responsável pelo acondicionamento e embalagem, informando o tipo de amostra transportada, data e hora do acondicionamento, serviço de origem e destino e recomendações complementares.

17/19

§6º Todos os registros referentes ao transporte devem ser mantidos durante todo o período de armazenamento do material e por um período mínimo de 5 anos após a sua utilização terapêutica.

CAPÍTULO VI

DA COLETA, PROCESSAMENTO, CRIOPRESERVAÇÃO, ARMAZENAMENTO, LIBERAÇÃO E TRANSPORTE DAS CÉLULAS E TECIDOS GERMINATIVOS COM RESULTADO REAGENTE PARA DOENÇAS INFECCIOSAS.

Art. 56 Caso o BCTG trabalhe com amostras provenientes de pacientes com resultado positivo detectado na triagem laboratorial descrita nos artigos 21 e 22, as salas/ambientes de coleta, processamento e criopreservação das amostras e/ou dos embriões poderão ser os mesmos, desde que se cumpram normas de biossegurança adequadas à manipulação de amostras contaminadas. Parágrafo único. O BCTG deve possuir instruções escritas específicas para a realização de atividades com amostras com resultado reagente para doenças infecciosas, bem como para os processos de limpeza e desinfecção dos materiais, equipamentos e ambientes.

Art 57. Amostras para uso próprio, com resultados reagentes para infecções transmissíveis, devem ser armazenadas em reservatórios de nitrogênio líquido exclusivo para amostras contaminadas.

§1º Devem existir reservatórios exclusivos para cada tipo de resultado reagente, considerando inclusive os resultados reagentes com coinfeções.

§2º Se as amostras criopreservadas com resultado reagente para infecções transmissíveis forem acondicionadas no mesmo reservatório das amostras com resultados não reagentes/negativos, deve ser utilizado um sistema de embalagem externa ou equipamento que garanta a proteção das demais amostras.

CAPÍTULO VII

DOS REGISTROS E ARQUIVOS

Art. 58 O BCTG deve manter disponível, por todo o período de armazenamento das amostras, e por um período mínimo de 20 (vinte) anos após a sua utilização terapêutica, arquivos de documentos e registros relativos a:

I- dados dos pacientes e do doador com identificação numérica ou alfanumérica da amostra coletada;

II- dados com a característica do doador;

III- dados da triagem clínica;

IV- dados da coleta das células ou tecidos germinativos;

V- dados de acondicionamento e transporte;

VI- processamento, criopreservação e armazenamento;

18/19

VII- resultados das triagens sorológica e microbiológica e de viabilidade;

VIII- data e motivo do descarte das amostras, quando couber;

IX- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido;

X- relatório médico da realização ou não do procedimento de reprodução humana assistida, com identificação da receptora; e

XI- resultado da gestação.

Art. 59 Os arquivos de registros podem ser mantidos em meio eletrônico, microfilmagem ou em livros de registro manual.

Parágrafo único. No caso de uso de informática ou microfilmagem, os dados devem ser armazenados em duas cópias e o BCTG deve comprovar que o sistema não permite fraudes ou alterações de dados.

CAPÍTULO VIII

DA GARANTIA DA QUALIDADE

Art.60 O BCTG deve manter um sistema de gestão da qualidade, o qual deve estar documentado, ser de conhecimento do pessoal administrativo e técnico-científico e incluir:

I - a equipe técnica e os recursos necessários para o desempenho de suas atribuições;

II - a proteção das informações confidenciais;

III - a supervisão do pessoal técnico por profissional de nível superior legalmente habilitado durante todo o período de funcionamento do serviço;

IV- treinamento periódico de pessoal;

V - os equipamentos, instrumentos e materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro utilizados, bem como sua qualificação e verificação antes de entrar em uso;

VI - a utilização de técnicas conforme recomendações do fabricante dos equipamentos e produtos ou conforme validação realizada pelo serviço;

VII – a realização de procedimentos, com base em protocolos definidos, e validados quando couber;

VIII- procedimentos para detecção, registro, correção e prevenção de erros e não conformidades;

IX- a rastreabilidade de todos os seus processos e;

X- auditorias internas periódicas, para verificar conformidade com as normas técnicas.

19/19

Parágrafo único. Os resultados dos procedimentos descritos no inciso VIII deste artigo devem ser analisados e, quando estiverem fora dos critérios predefinidos, devem ser realizadas ações para corrigir o problema e evitar resultados incorretos, mantendo-se os registros das nãoconformidades

e das medidas adotadas.

CAPÍTULO IX

DO DESCARTE DE RESÍDUOS

Art.61 O descarte de amostras de células ou tecidos germinativos e de resíduos de laboratório do BCTG deve estar descrito no Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), e deverá ser feito de acordo com as normas vigentes.

CAPÍTULO X

DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 62 Os estabelecimentos abrangidos por esta Resolução terão o prazo de 120 (cento e vinte) dias contados a partir da data de sua publicação para promover as novas adequações necessárias ao Regulamento Técnico por ela aprovado.

Parágrafo único. A partir da publicação desta Resolução, os novos estabelecimentos e aqueles que pretendam reiniciar suas atividades, devem atender na íntegra as exigências nela contidas, previamente ao seu funcionamento.

Art.63 O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº 6.437 de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.

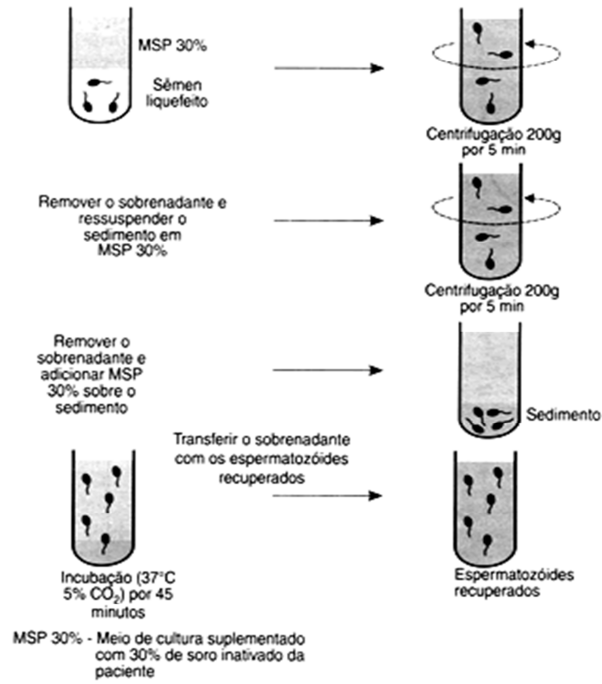
Art. 64 Fica revogada a Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa- RDC no 33, de 17 de fevereiro de 2006.

Art. 65 Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação, produzindo efeitos, em relação ao art. 64, em 120 (cento e vinte) dias contados da data da sua publicação.

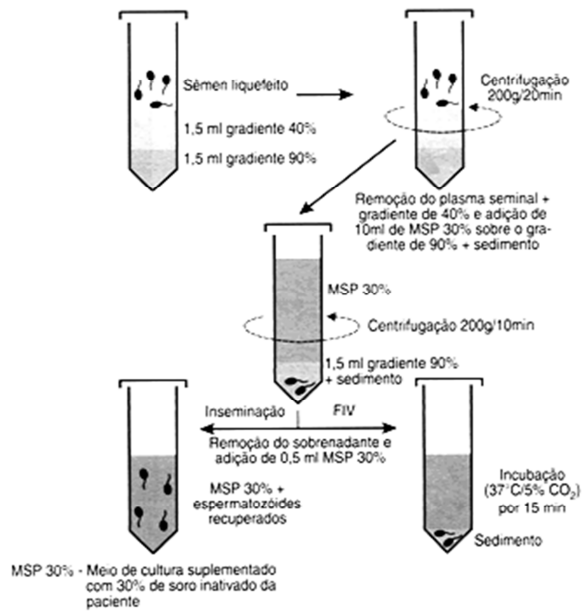
DIRCEU BRÁS APARECIDO BARBANO

Anexo 3 - Esquemas de técnicas citadas nos artigos

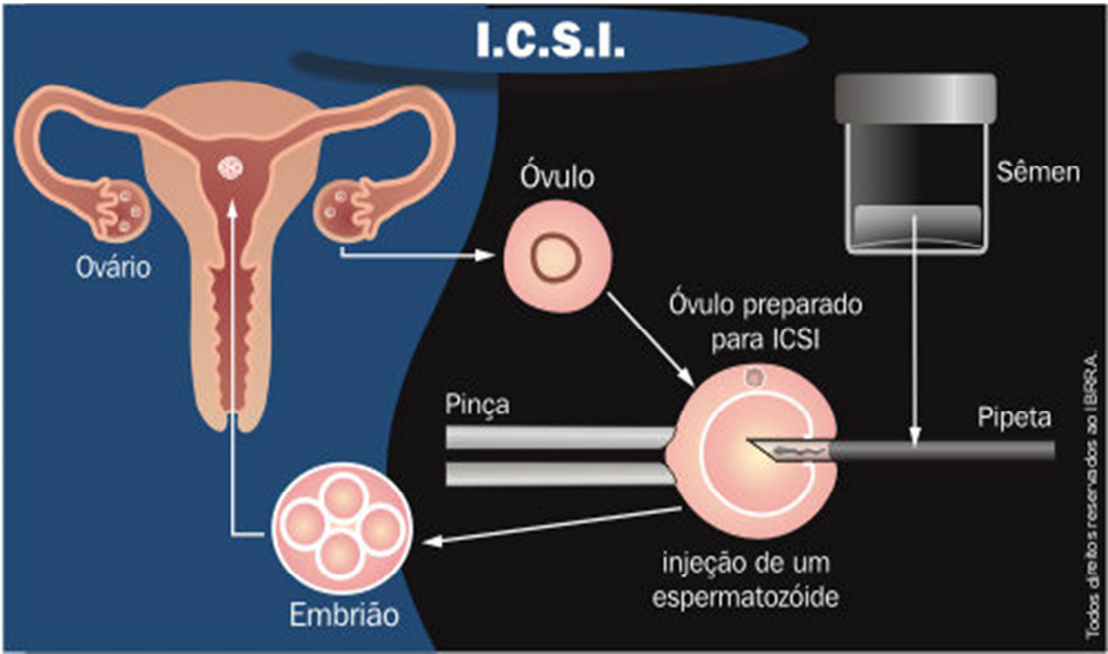
Swin-up



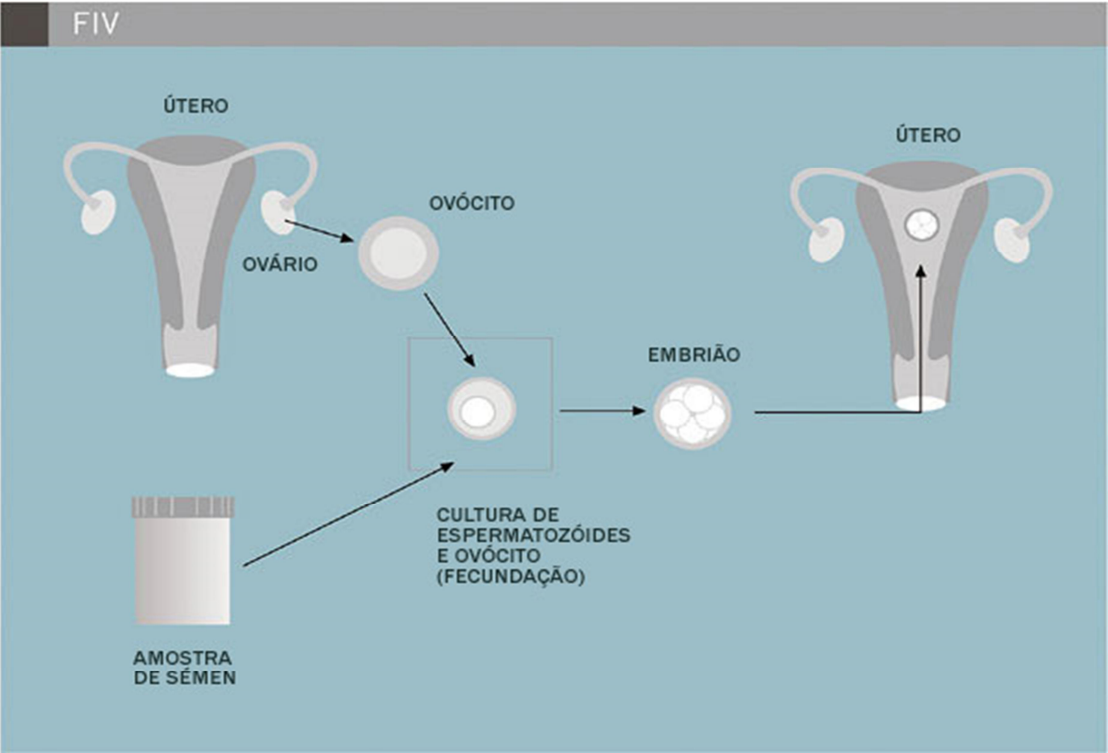
Gradiente descontínuo de percol



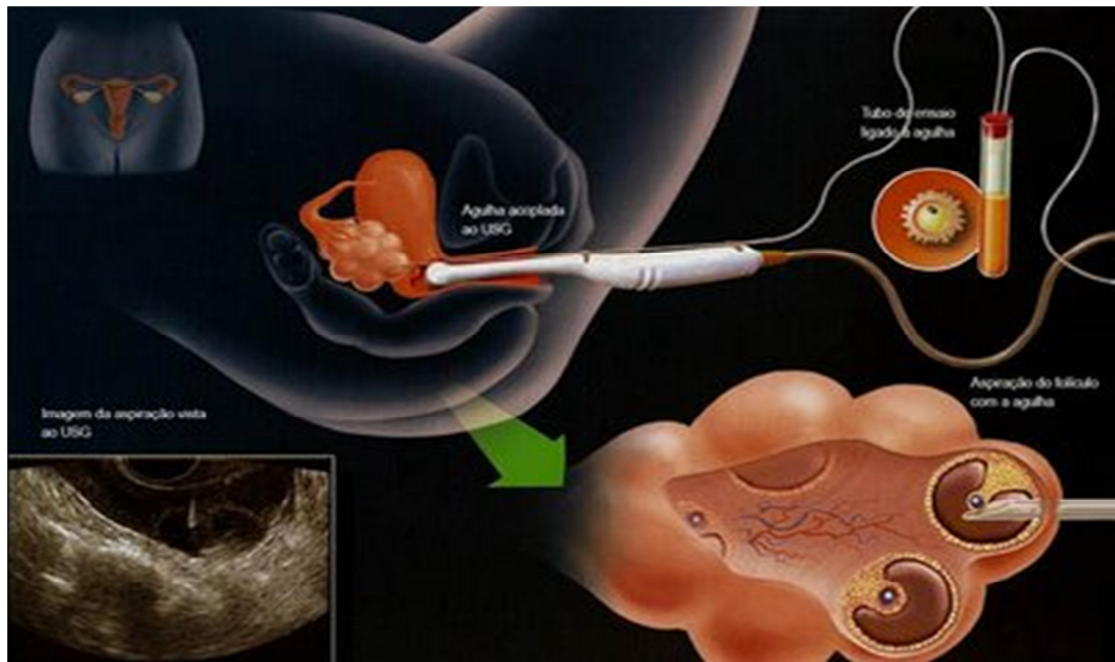
ICSI



FIV



Coleta de ovócitos



Anexo 4 – Normas da Elsevier editora

Guide for authors (fertility and sterility)

PREPARATION

Use of Wordprocessing Software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should

be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes

will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's

options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts,

superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each

individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts

(see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>).

Note that

source files of figures, tables, and text graphics will be required whether or not you embed your

figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are

strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls*

(<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and

BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see

<http://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading.

Each heading

should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing

text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature

survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be

indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

A statement of Institutional Review Board (IRB) status must be included. Similarly, a statement

of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) approval must be provided for research

involving animals.

Results

Results should be clear and concise.

AUTHOR INFORMATION PACK 27 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/fertnstert 11

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential Title Page Information

- **Running title.** A short version of your title, consisting of 40 characters or less, including spaces.

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was

done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after

the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each

affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing

and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area**

code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was

done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as

a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be

retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Capsule

A summary of the abstract of 30 words or less, this will be published in the table of contents. It should

describe the final conclusion(s) of the paper.

Structured Abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for

the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory

animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their

statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important

aspects of the study or observations.

Required headings are Objective (beginning with a phrase like "To study..."), Design, Setting, Patients/

Animals, Intervention(s), Main Outcome Measure(s), Results, and Conclusion.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and

avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing

with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help or writing assistance or proofreading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

AUTHOR INFORMATION PACK 27 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/fertnstert 12

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is

finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
- TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these

figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A

caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables

below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be

sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results

described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice

versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal

communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these

references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the

journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or

'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted

for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to

the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as

Scopus, CrossRef, and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please

note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year, and pagination may prevent link

creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the

DOI is encouraged.

AUTHOR INFORMATION PACK 27 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/fertnstert 13

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any

further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.),

should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a

different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

References follow style of "Uniform

Requirements" (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Examples:

Journal article: 10. Fortier KJ, Haney AF III. The pathologic spectrum of utero-tubal junction obstruction. *Obstet Gynecol* 1985;65:93–8.

Journal article—volume with supplement: 10. Friesen H, Tollis G. Use of bromocriptine in the galactorrhea-amenorrhea syndromes: the Canadian Cooperative Study. *Can Endocrinol* 1977;6 Suppl 5:915–20.

Journal article—issue with supplement: 10. Gardos, G, Cole JO. The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 1988;8(Suppl 4):31S–7S.

Journal article—letter: 10. Spargo PM, Manners JM. DDAVP and open heart surgery [letter]. *Anesthesia* 1989;44:363.

Journal article in press: 10. Donald JA. Pulmonary blood flow regulation in aquatic snake. *Science*. In press.

Books and other monographs: 10. Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. New York: McGraw-Hill, 1956.

Book, edited: 10. Diener HC, Wilkinson M, eds. *Drug-induced headache*. New York: Springer-Verlag, 1988.

Book, edition: 10. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1983.

Book, chapter: 10. Coutts JRT. The abnormal luteal phase. In: Jeffcoate SL Jr, Smith GS, eds. *The luteal phase*. Chichester: John Wiley and Sons, 1985:101–10.

Book, volume: 10. Colton T. *Statistics in medicine*. Vol. 1. Boston: Little Brown and Co., 1974.

Scientific and technical report: 10. Akutsu T. Total heart replacement device. Bethesda (MD): National Institutes of Health, National Heart and Lung Institute; 1974 Apr. Report No.: NIH-NHLI-69-2185-4.

Thesis or dissertation: 10. YoussefNM. *School adjustment of children with congenital heart disease* [dissertation]. Pittsburgh (PA): Univ. of Pittsburgh, 1988.

Conference proceedings: 10. Vivian VL, editor. *Child abuse and neglect: a medical community response*. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect; 1984 Mar 30–31; Chicago. Chicago: American Medical Association, 1985.

Conference paper: 10. Harley NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, editors. *Indoor air and human health*. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 October 29–31; Knoxville (TN). Chelsea (MI): Lewis, 1985:69–78.

Web site: 10. Harley NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. Available at: <http://evernqeust-cgi.org>. Accessed January 9, 2010.

Reference List

AUTHOR INFORMATION PACK 27 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/fertnstert 14

References are numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order of text citation, including citations in figure legends and tables at first mention in text. List up to six authors, followed by a comma and et al. Journal article titles are initial cap/lower case. Use lower case letter after colon in journal article title. Abbreviate journal names according to the current *Index Medicus*. Do not use an ampersand in journal names. Delete issue number in parentheses after volume. Page ranges use only the numbers that change.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Anexo 5 – manuscrito submetido à Fertility and Sterility em inglês

Authors:

- PhD. Barbara Rosa Ribeiro Foizer, PHD, Author of the original article resulting a doctoral in human reproduction (doctoral in Health Sciences at Federal University of Goiás [*Universidade Federal de Goiás – UFG*] and lecture at Salgado de Oliveira University-UNIVERSO, Goiânia-GO Brazil).

Correspondence address: Street of Quaresmeiras, qd.11, It. 25, jardins valência, Goiânia-Goiás, Brazil, ZIP code 74885 869. Phone: 005562 8114-5149, e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br

Author for correspondence: Barbara Rosa Ribeiro Foizer - FOIZER, B. R. R.

- MSc. Edgar Rosa Foizer, article's co-author organization of data, and inputs the calculation of percentages, with prior statistical analysis. (biologist, MSc. in environmental contamination, director of public schools Muriaé: Gilberto Tanus Brás, Minas Gerais State, Brazil). Correspondence address: Street Maria Henrique Vieira, nº 34 Dornelas 2, Muriaé-MG-Brasil. ZIP code: 36880-000. Phone: 005532 8869-5869, email:edgarfooizer@hotmail.com

-Dr. Lilian de Fátima Fileti Gomes, Embriologist of Fértil clinical diagnostic (member of the Department of Gynecology and Obstetrics-UFG) address for correspondence: Street T-30 nº1189 apto 1203, Bueno, Goiânia, Goiás, Brazil phone number: 005562 84112011email:L.fileti@hotmail.com

- MSc. Dr. Luiz Augusto Antônio Batista Professor of the department of the Medical School, Federal University of Goiás - UFG; Master in Computer Engineering from the UFG. - Responsible for laboratory IVF and cryopreservation of embryos Fertile Clinic. Correspondence adress: Al. Coronel Joaquim de Bastos, n 243, st. Marista, Goiania-Goiias-Brazil ZIP code 74175 150, Phone: 005562 35451709. email: luizaugusto@fertile.com.br

_PHD. Zelma Bernardes Costa- Professor Department of Gynecology and Obstetrics of medical school UFG - Member of the North American Society

for Reproductive Medicine - ASRM - Master in medicine by IPTSP of UFGO - PhD in medicine at the IPTSP UFGO - Responsible for laboratory fertilization in vitro and cryopreservation of Clinical fertile. Correspondence adress: Al. Coronel Joaquim de Bastos, n 243, st. Marista, Goiania-Goias-Brazil ZIP code 74175 150, Phone: 005562 35451718. email: zelmabc@gmail.com; zelmaconsultorio@gmail.com.

- PhD. Waldemar Naves do Amaral, guiding the doctoral student Barbara Rosa Ribeiro Foizer and co-author of the article (associate professor at Federal University of Goiás and head of the Department of Gynecology and Obstetrics, Medical School, technical director of *Fértil* Diagnostics and Dona Íris Maternity, President of the Brazilian Society of Ultrasound). Correspondence address: Al. Coronel Joaquim de Bastos, n 243, st. Marista, Goiania-Goias-Brazil ZIP code 74175 150, Phone: 005562 30925407, email: waldemar@sbus.org.br

The material contained in the manuscript has not been published, has not been submitted, or is not being submitted elsewhere for publication. Work was shown at the Brazilian Congress Human Reproduction. All authors' agreement to submission of the manuscript. There is not conflicts of interest. Institutions: Medical School of the Federal University of Goiás (*Universidade Federal de Goiás – UFG*), Health Sciences Doctoral Program, with CAPES scholarship.

Institute of Tropical Pathology and Public Health (*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-IPTSP-UFG*), microbiological research. *Fértil* Diagnostics, Clinics Hospital _UFG, collection of embryo culture dishes and medical records.

Research funded by the Institute of Tropical Pathology and Public Health (IPTSP-UFG), which provided the **supplies** needed to collect the samples and the microbial identification reagents.

Title: Microbial contamination of human embryo culture dishes and its impact on the assisted reproduction

Abbreviated Title: Impact of microbial contamination on assisted reproduction

Design

Case control, with pairing between groups, 470 samples of culture medium collected from human embryo culture dishes and inoculated into BHI broth, and the positive samples were isolated and identified. Data from medical records obtained from the human reproduction laboratories were analyzed, and two groups were compared: contaminated and uncontaminated.

Facilities

The analyses were performed at human reproduction laboratories, Brazil, 2009-2014.

Patients

Culture dishes used to grow human embryos that were fertilized in assisted reproduction laboratories and the respective parents.

Interventions

No intervention

Main analyzed outcome

Perinatal outcome of the embryos grown in the analyzed culture dishes

Results

There was a 6.32% (IC= 4.26-7.98) prevalence of contamination, that resulted in live births were *Candida sp* (20%), and the main bacterial pathogens that did not result in live births were *Bacillus sp* (16%), *Escherichia coli* (10%) and *Staphylococcus sp* (10%). Female tubal factors were the most common infertility factor, between groups ($p < 0.01$). A significant difference in poor embryos (Grade C and D) was observed between the groups ($p = 0.013$; OR=3.53 and CI=1.31-9.58). The chance of not getting pregnant was 2.57 (OR, $p = 0.043$, CI=1.03-6.41) times higher in the contaminated group. Perinatal outcome of live births was 2 (6.6%) in contaminated, and 118 (27%) in uncontaminated ($p = 0.026$, OR = 5.13, CI = 1.39-18.97).

Conclusion

The contaminated group increases the number of poor embryos, decrease pregnancy rates and the perinatal outcome of live births, compared with the uncontaminated group.

Keywords: Human Reproduction. Contamination. Microbial. Pregnancy. Births. Embryos.

Introduction

Quality control and the proper performance of procedures are essential for the success of assisted reproduction in human reproduction laboratories. A high level of hygiene and cleaning and the appropriate disposal of the material should be observed to avoid culture media and equipment contamination^(1,2).

Since 1996, microbial contamination of embryo culture media has been tracked and recorded to improve the quality management system in human reproduction lab in Ireland Dublin. Bactericides and fungicides are added to the culture media as the resistance of these microorganisms increases⁽³⁾. The main causes of this contamination have been associated with infections in the male and female genital tract and the consequent contamination of the oocytes and embryos⁽⁴⁾. Microbial contamination is also associated with contaminated air, equipment and materials used in the procedures, such as the catheters used to remove cervical mucus and for embryo transfer and the culture dishes⁽⁵⁾.

The vagina, ovarian fluid and semen cannot be sterilized and represent potential sources of contamination. Therefore, great care is required to minimize the risk of transferring microorganisms during clinical or laboratorial procedures. Vaginal cells and the resulting bacteria have been observed in follicular fluid during oocyte retrieval, which leads to the risk of contamination of the maternal pelvis and the embryos⁽⁶⁾. Occasionally, microorganisms colonize culture dishes containing oocytes and embryos^(4,7,8,9). Contamination rates vary according to the technique used for

assisted reproduction. The contamination rate observed in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is small; however, *in vitro* fertilization (IVF) techniques have a higher contamination rate⁽⁵⁾.

The first consequence of contamination is a reduction in the number of viable embryos to transfer. Embryos may not survive the first cleavages, may be susceptible to teratogenesis or may fail to implant in the uterus⁽⁵⁾. In addition, contamination can increase the rate of stillbirths, preterm birth, **low birth weight** and syndromes⁽¹⁰⁾.

Another aspect is the risk of contaminating and infecting the mother's body, which can lead to a temporary or permanent lesion. The contamination can be either vertical (between parents and embryos) or lateral (from one patient to another during the oocyte retrieval and embryo transfer procedures)⁽¹¹⁾. One study reported finding women with colonized or contaminated follicular fluid, possibly as a result of previous invasive procedures or cases of endometriosis; pelvic inflammatory disease that affects the uterus, fallopian tubes and ovaries; and polycystic ovary syndrome. A previous study has demonstrated that these colonizing microorganisms and the immune responses and cytokine production that naturally follow the infectious process decreased fertility rates⁽¹¹⁾. Patients with a definite blockage of the fallopian tube require assisted reproduction techniques to achieve pregnancy. The risks of acute pelvic inflammatory disease in mothers immediately after transvaginal oocyte retrieval are discussed in a case study⁽¹²⁾, where possible contamination with Gram-positive anaerobic bacteria is associated with tubal factor infertility.

Microbial identification is also required because it will guide changes in laboratory and outpatient procedures. *Candida sp* are often identified as fungal agents that may or may not affect reproduction outcomes^(8, 13).

Embryo culture media contain antibiotics, such as penicillin G (IVF) and gentamicin (Human Tubal Fluid-HTF), to minimize the risk of microbial growth. In addition, these media also contain the antifungal amphotericin. Recently, washes with media containing antibiotic/antimycotic have been suggested⁽¹⁴⁾.

A correlation between infertility and the hepatitis C virus was also found in a group of infertile couples, with a prevalence of 3.2% for women

and 3.6% for men⁽¹⁵⁾, and the transmission may occur during outpatient procedures, and a screening evaluation of infertile patients is recommended before they undergo assisted reproduction techniques that could contaminate embryos and mothers with microorganisms.

Semen can be prepared according to two methods, swim-up and density gradient, which significantly decrease bacterial contamination⁽¹⁶⁾. These methods are harmless and can effectively reduce the microbial population in the semen⁽¹⁷⁾; however, neither method can eliminate the most common agents (streptococci, staphylococci, coliforms)⁽¹⁸⁾. Bacteriospermia and seminal leukocytes in semen parameters have been correlated with sperm DNA fragmentation⁽¹⁹⁾.

Is important to note that many procedures have been done in an attempt to microbiological decontamination. Exposure to UV radiation (253.7 nm wavelength) and ozone produce rapid microbial decontamination and can effectively kill bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) and fungi (*Aspergillus niger*) of medical importance that are reported in sepsis cases⁽²⁰⁾.

The rates of **malformations** in embryos and fetuses are higher in assisted reproduction. Chromosomal abnormalities are found in 60% of miscarriages and are the most comprehensive biological explanation for pregnancy loss⁽²¹⁾. Changes in gene expression result from fragmentation stress, **where embryos respond negatively to subcondition cultivation, breaking their nucleus and losing pieces of DNA**. Embryos with expression profiles that indicate proper morphology for their developmental stage have greater potential for implantation⁽²²⁾. The risks of congenital malformations **(in the study were found more cardiovascular and a reduced number of limbs)** are significantly higher in children born after assisted reproductive technology⁽²³⁾.

Despite the low prevalence of contamination⁽⁵⁾, the conditions of laboratories in Brazil (air filter maintenance) can result in an unfavorable outcome for reproduction. There are no longitudinal studies that assess the causes and consequences of contamination during the embryonic stage and the failure of assisted human reproduction. However, there is evidence of

gestational infection that impairs the reproductive tract and causes birth defects in animals⁽¹⁰⁾.

Knowledge about the possible endogenous and exogenous contamination in the maternal body, male/female gametes and embryos and the unfavorable reproductive outcomes resulting from these contaminations indicate the need to track and control infectious agents in human reproduction laboratories⁽²⁴⁾.

In this study, we propose to identify the prevalence of bacterial and fungal contamination of human embryo culture dishes and its impact on the success rate of assisted human reproduction, analyzing the rates of infertility, gametes, embryos, pregnancy and birth. These embryo culture dishes represent the best site for collection because they contain the various factors for probable contamination of semen, follicular fluid, media, environment, handling.

Methodology

Search type:

This was a prospective and **longitudinal quantitative study** using descriptive, analytical and observational approaches. Type Case Control, with the pairing items: maternal age, paternal age, indication, ovarian response, number of manipulated embryos and embryos transferred. This study also shows the contamination rates in embryo culture dishes and the identification of genera of microorganisms that are often found in embryo culture dishes in human reproduction laboratories.

Inclusion criteria:

Considered high volume of monthly manipulations to meet the required sample number, performs procedures of IVF and ICSI, has a medical record data before, during and after the procedure. There is no exclusion criteria.

Ethical aspects:

Was approved in Brazil Platform, the Research Ethics Committee (CONEP) of the University Hospital, Goiania GO, 2013.

Collection and processing of embryo culture dishes:

The material collected for the study and the medical records for the subsequent analysis were collected from the human reproduction laboratories of both the *Fértil* Clinic (450 samples) and the Clinics Hospital of the Federal University of Goiás (UFG) (20 samples from the master's work) (*Universidade Federal de Goiás – UFG*), Goiania, Goiás-State, Brazil. The research was approved by the Brazil Platform (*Plataforma Brasil*) of the Research Ethics Committee of the Clinics Hospital, Goiania, Goiás-State, Brazil. The sample consisted of 470 culture dishes and the data recovered after the birth of the fetuses.

Regardless of suspected contamination, all embryos culture dishes per patient were used for the samples. The embryos were implanted or frozen, and the culture dishes that would otherwise be discarded immediately or were stored in the incubator for one day after the transfer. During the five years of collecting plates representing patients were discarded because they could not be saved, also the time of the entry procedures differ and only the embryologist in the lab manipulation of embryos to provide the plates with culture media.

The culture dishes used in this study were collected between May 2009 and March 2014 at the abovementioned institutions as the embryo culture dishes became available for disposal. The dishes were taken to the Microbiology Laboratory of the Institute of Tropical Pathology and Public Health - IPTSP at UFG, where the samples were analyzed for contamination, and any contaminating microorganisms were identified.

To verify contamination, brain-heart infusion (BHI) medium was individually prepared. Tubes containing BHI were autoclaved, pretested in incubators for 24 hours and then kept in the refrigerator for later use (positive and negative controls included when samples were run). Samples obtained with sterile pipettes were inoculated in these tubes with 5 mL of BHI medium to add the nutrients necessary microbiological growth and enhance the growth of contaminants in order to facilitate identification. They were then transported in polystyrene boxes immediately to the microbiology laboratory of IPTSP incubated at 37°C for 24 to 48 hours. All culture medium was removed from the dishes. Positive BHI medium samples were further subcultured, and the following specific identification tests were performed:

macro- and micromorphological analysis, microcultivations, stain tests, and biochemical tests based on the presence or absence of substances such as enzymes or products of pathogen metabolism⁽²⁵⁾. Samples that were positive in BHI (clouded) were stained with Gram stain, then separated and transplanted in the culture medium MacConkey agar, Mannitol Salt and Agar Nutrient.

All samples contaminated Gram negative (Klebsiella, E. coli, Enterobacter sp, Pseudomonas sp), there was growth in MacConkey middle. We carried out the biochemical sequence: TAF (triple sugar iron) with the Red pH indicator Phenol (of acid production and base) and fermentation of sugars (sucrose, glucose and mannitol). It is also noticed CO² gas production by fermentation in anaerobic environment TAF bottom of the tube. In the middle YES, to detect indole production (a product of tryptophan degradation of the amino acid), the red color appears at the top of the tube, it also detects the bacterial motility (motility for the presence of flagella, the medium containing tetrazolium induces the appearance of red traces, which helps following the spread of bacteria from the line of inoculation in a macroscopic analysis) also the production of hydrogen sulfide (sulfur is released from the degradation of amino acids, producing precipitate black, heavy metal sulfide insoluble) as background in the tube body. The test was conducted in red pH indicator Methyl since the minimum amount of acid produced may be sufficient to reduce the pH. In Citrate means for determining the usability of sodium citrate as a sole source of carbon metabolism occurs to produce a blue color on medium with presence of alkali. Means for phenylalanine in the appearance of phenylpyruvic acid indicates the degradation of phenylalanine for phenylalanine deaminase enzyme. If so, would appear a green color upon addition of the ferric chloride reagent. In agar Christensen urea to urease, the pink color change to red indicates positivity. The inclined surface becomes red in an alkaline reaction, indicating that the microorganism hydrolyzed urea, releasing ammonia and producing change rosy red color in the middle.

For the identification of contaminated samples grown in mannitol agar, Gram positive cocci were identified from the genus Staphylococcus and Streptococcus, mannitol medium was modified by adding other ingredients of the phenol red as a pH indicator. Staphylococcus sp become yellow under

acidic conditions by means of fermentation mannitol. The catalase test was performed with hydrogen peroxide (H₂O₂) on a slide with the colonies was positive, as the bubbling was due to the release of oxigênio. Coagulase test consists of bringing together a test tube containing the blood plasma and a suspension the colonies and expect coagulate by bacterial enzymes.

Samples that appeared with Bacillus sp gram positive, grew in the middle mannitol. Had a purple color and also organized in the form of estreptobacilos. In sample contaminated by yeast fungi, growth was milky white and the nutrient agar colony with antibiotics and gram was observed the presence of eukaryotic cells under the microscope stained very unicellular.

Samples contaminated by molds (Aspergillus, Penicillium sp and Thichophyton rubrum) were grown in nutrient agar with antibiotics to isolate the colonies, and subcultured microcultivation to detect the type of fruiting body with microscopic view of hyphae. The microculture technique involves removing a piece of the mold culture and sow the 4 corners of the square agar potato that is deposited on the glass slide, cover the seeded material with cover slip, place a sterile water pipe on the board background to wetting the filter paper, incubated at 250C for 7 to 14 days.

There was no repeat sampling during data collection, even if there were multiple cards per patient (mothers). When a patient had multiple embryos into two or more plates BHI media were placed in separate tubes, but if contamination was confirmed in at least one of the plates, the patient would be added to the contaminated group. There being no contamination of the plates, the patient would be considered in the non contaminated. A case of contamination in one of the two plates of the same patient was discarded because it was not known which of the embryo came from. A double contamination (E. coli and Aspergillus) single board was considered the initial bacterial contamination, because the fungus appeared a few days later and has been slow growth in microculture.

Analysis of medical records and evaluation criteria:

The medical records related to the culture dishes were analyzed, and data were collected in 2014. There was no repetition of the sample during

data collection, even if there were several plates per patient (mothers). When a patient had multiple embryos in two or more culture dishes, means BHI were placed in separate tubes, but if contamination was confirmed in at least one of the plates, the patient would be added to the contaminated group. No contamination in any of the boards, the patient would not be contaminated to the group. A case of contamination with dual culture dishes was discarded because it does not know whether the embryo was coming from contaminated or not. A dual-contamination (E. coli and Aspergillus) on a single was considered the initial bacterial contamination, because the fungus appeared a few days later and was already in microculture of slow growth.

The following variables were analyzed: maternal and paternal age, infertility factors, the quality and quantity of oocytes retrieved, the quality of the transferred embryos and the pregnancy outcome, with perinatal outcomes of live birth (perinatal success) or absence of live births (total failure), also the pregnancy loss perinatal outcomes in addition to newborn data, such as weight, height, gestational age and type of pregnancy (single, twin, triplet). Individual tables were prepared with the analyzed variables.

Oocytes were identified with an optical microscope (inverted) with 400x magnification and classified as M1 (immature) and M2 (mature). Viable embryos were identified based on morphological criteria assessment⁽²⁶⁾, such as the number and size of cells, the presence of multinucleation, the percentage of fragmentation and the cleavage rate. Morphological evaluations were performed in the two laboratories of this study. On Days 2 to 4, the embryos were classified as follows: Excellent (Grade A): blastomeres with similar diameters and the proper number of cells for that stage, no fragmentation; Good (Grade B): <25% fragmentation, blastomeres with similar diameters; Inadequate (Grade C): 25-50% fragmentation, blastomeres with unequal diameters (Grade C embryos should be transferred only in the absence of Grade A and B embryos); Poor (Grade D): >50% fragmentation, with a high likelihood of genetic abnormalities. Grade A blastocysts on Days 5-6 were also used; those blastocysts were characterized by an inner cell mass with at least 2/3 of the radius with no **degenerative** cells, the presence of a continuous thin layer of trophoblast cells without degenerative cells and the presence of a thin zona pellucida.

For the statistical analysis, the data were entered into an Excel spreadsheet and analyzed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0 software. The results are presented as absolute values (n) and percentages (%). To determine the significant differences between the contaminated and uncontaminated groups, the chi-squared test (for maternal and paternal age) and Fisher's test (for the quantity and quality of M1 and M2 oocytes) were used. Logistic regression was used to analyze the other variables. A 95% confidence level ($p < 0.05$) was considered statistically significant. Was calculated ODDS RATIO of microbial exposure in culture dishes with the absence of pregnancy, and the pregnancy loss, keeps track of the results of the regression.

Result

Of the 470 samples, 30 were contaminated, which represents a prevalence of a 6.32% (IC= 4.26-7.98) Contamination was found in dishes from both IVF procedures, which were performed in 2009 and 2010, and ICSI procedures, which were exclusively performed starting in 2011.

A total of seven bacterial species were found in 16 samples (51%), and four fungi species were found in 14 samples (49%). *Bacillus sp* (five samples) and *Candida sp* (six samples) were the most frequently occurring species of contaminating microorganisms. The microorganisms are shown in table 1.

The most common causes of infertility were tubal factor infertility, with 14 cases (41%) in the contaminated group and 68 cases (15.5%) in the uncontaminated group ($p < 0.001$, OR= 4.18, CI= 1.94-9.01), and oligoasthenospermia, with 9 cases (26.3%) in the contaminated group and 142 cases (32.3%) in the uncontaminated group, as shown in table 2.

Regarding the maternal age of the patients from the group with contaminated culture dishes (30 culture dishes), three (10%) were younger than 30 years old, 22 (73.3%) were between 30 and 40 years old and five (16.7%) were older than 40 years. For the patients from the group with uncontaminated culture dishes (405 culture dishes), 83 (20.5%) were

younger than 30 years old, 232 (57.3%) were between 30 and 40 years old and 90 (22.2) were older than 40 years. A total of 35 plates were not evaluated for this analysis. There was no significant difference in maternal age ($p=0.212$; chi-squared test) between the contaminated and uncontaminated groups.

Regarding the paternal age of the patients, in the contaminated culture dishes group (30 culture dishes), 11 (36.7%) fathers were younger than 35 years, 17(56.7%) were between 36 and 50 years old and two (6.6%) were older than 50 years. Among the fathers in the uncontaminated culture dishes group (342 culture dishes), 132 (38.6%) were younger than 35 years old, 193 (54.6%) were between 36 and 50 years old and 17 (5.0%) were older than 50 years. A total of 98 plates were not evaluated in this analysis. There was no significant difference in paternal age ($p=0.913$;chi-squared test) between the contaminated and uncontaminated groups.

Regarding mature oocyte retrieval (M2 stage), the contaminated group presented 19 cases (63%) in which up to eight oocytes were retrieved and 11 cases (36.7%) in which more than eight oocytes were retrieved. The uncontaminated group presented 242 cases (60.2%) in which up to eight oocytes were retrieved and 160 cases (39.8%) in which more than eight oocytes were retrieved. The number of immature oocytes (M1 stage) retrieved was smaller, but the ratios of the contaminated and uncontaminated groups were similar. A total of 38 culture dishes were not evaluated in this analysis. There was no significant difference in the quality and quantity of oocytes retrieved at the M2 stage ($p= 0.449$) and the M1 stage ($p=0.714$; Fisher's test).

In the contaminated group, there were two births **resulting from** blastocysts and Grade A embryos. In the uncontaminated group, there were 146 births **resulting from** blastocysts (30) and Grade A (73), Grade B (37) and Grade C (6) embryos. The births included twins (24) and triplets (2). Blastocysts and Grade A and B embryos were not statistically analyzed because starting in 2012, blastocysts were cultured in the laboratories using specific new culture media that gradually changed the pregnancy rates resulting from Grade A and Grade B embryos. The regression analysis demonstrated a correlation between poor embryos (Grades C and D) and

culture dish contamination. A total of six (20%) poor embryos in the contaminated group and 28 (6.6%) in the uncontaminated group was observed ($p=0.013$; $OR=3.53$ and $CI=1.31-9.58$), as shown in table 3.

Among the patients whose culture dishes were contaminated (30), 24 (80%) did not become pregnant, two (6.6%) had a biochemical pregnancy, two (6.6%) had a second trimester miscarriage and two (6.6%) had live births with perinatal success. In comparison, among the patients whose culture dishes were uncontaminated (440), 268 (61%) did not become pregnant, 22 (5%) had a biochemical pregnancy, 27 (6%) had a first trimester miscarriage, five (1%) had a second trimester miscarriage, and 118 (27%) had live births with perinatal success. Logistic regression indicated a significant difference in the perinatal outcome between the contaminated and uncontaminated groups, with $p=0.026$, $OR=5.13$, $CI= 1.39-18.97$. The pregnancy rate was 20% for contaminated and 39% for the uninfected group. The chance of not getting pregnant was 2.57 (OR , $p=0.043$, $CI=1.03-6.41$) times higher in the contaminated group, the group uncontaminated. The infected group had 4.37(OR , $p=0.094$, $CI=0.78-24.59$) times greater chance of pregnancy loss than the uncontaminated group, data in table 4.

Regarding the analysis from conception to birth, the two fetuses in the contaminated group (males, singleton pregnancies, weight less than 2 kg, size smaller than 43 cm and preterm birth) did not allow for the application of regression tests. In comparison, there were 126 births in the uncontaminated group. These consisted of 51.59% males and 48.41% females; 73.47% from singleton pregnancies and 26.53% from multiple pregnancies; 6.35% were born weighing less than 2 kg, 50% weighing 2 to 3 kg and 43.65% weighing more than 3 kg; 5.56% measured less than 43 cm, and 94.44% measured between 43 and 53 cm; 73.81% were at full term (37 weeks or more), and 26.19% were premature (up to 36 weeks).

Discussion

Similar to previous findings^(5,9), human embryo culture dishes showed evidence of contamination with microorganisms similar to those found in

human reproduction laboratories. The medically important microorganisms with the highest prevalence were *Candida sp*, family Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp* and *Enterobacter sp*) and genera *Staphylococcus* and *Streptococcus*. These findings are in agreement with findings from European studies⁽⁵⁾ in which the prevalence was 0.67%, a value nine times lower than was found in the present study. The following prevalences were found in previous studies: 0.69% for fungi⁽⁸⁾, 5% for processed and antibiotic-treated semen⁽⁴⁾, 32% for semen⁽¹⁶⁾ and 0.35% and 4.8% for embryo culture dishes^(3,9)

This contamination impacted the success of assisted reproduction, and the results seem to depend on the type of contamination. The two births observed in the contaminated group resulted from culture dishes contaminated with *Candida sp*, and 33.3% of the culture dishes contaminated with yeast (6) and 14.3% of cultures dishes with fungi (14) resulted in births. This study's analysis revealed that almost half (46.7%) of contaminations were caused by yeast, some with slower growth compared with bacteria⁽⁵⁾. Studies related to these results are controversial: *Candida albicans* is reported to increase DNA fragmentation and apoptosis, damage that may cause failure after fertilization in assisted reproduction treatment⁽⁸⁾; however, *Candida albicans* cannot affect results that are within normal rates for assisted reproduction and therefore is not a reason to cancel an embryo transfer⁽¹³⁾. Fungi appear in culture dishes within at least 2 to 3 days, even after the embryo transfer; therefore, they are often not detected and most likely cause less damage to the embryo⁽⁵⁾.

Grade C and D embryos were found in culture dishes contaminated with bacteria. Previous studies reported a poor quality of developing embryos⁽⁵⁾. Poor embryos (Grade C and D - Figure 2) displayed unequal cleavage, with several blastomeres of different size, high fragmentation and residues⁽²⁶⁾. *Escherichia coli* and *Stenotrophomonas maltophilia* (*Pseudomonas*) were the main contaminants in samples of embryos and frozen semen. Moreover, these were the same pathogens observed in the present study, and they are able to significantly suppress *in vitro* fertilization and embryo development⁽¹⁷⁾.

Regarding the infertility factor, tubal factor infertility was almost three times more common in the contaminated groups (41%) than in the uncontaminated group (15.5%), suggesting a possible explanation for the causes of contamination. Tubal factor infertility is one of the most common causes of infertility⁽²⁸⁾. *Chlamydia trachomatis* is a common cause of pelvic inflammatory disease that can lead to ectopic pregnancy and tubal factor infertility⁽²⁹⁾. Other infections, such as *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* and the species *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*, are present in 42.63% of infertile women. *Ureaplasma urealyticum* is the most common agent (29.47%) followed by *Candida sp* (15.26%). It is believed that in Brazil, tubal damage caused by pelvic inflammatory disease is the cause of infertility for 100.000 women, and ectopic pregnancy causes infertility for 70.000 women⁽³⁰⁾. A history of sexual assault, HIV infection and *Chlamydia trachomatis* infection were predictive factors for tubal factor infertility⁽³¹⁾.

All of these data support the hypothesis that in addition to infertility caused by tubal occlusion, previous female genital tract infection may contaminate the oocyte and consequently the embryos. These bacteria are obligate intracellular parasites and do not grow in BHI culture medium⁽²⁵⁾; therefore, they were not detected in this study. Because the aim of this study was to analyze the impact of the culture dish contamination (i.e., only bacteria and fungi) on the success of assisted reproduction, contamination present in the serological tests was not analyzed; however, such an analysis would detect all of the bacteria discussed above in addition to viral diseases relevant to fertility⁽²⁷⁾.

Penicillin G is still used in IVF medium^(6,8). It was replaced by gentamicin in the HTF medium in 2005, after which only colonization with *Candida* was observed in the culture dishes, with an absence of bacteria. However, high bacterial adaptation and resistance is known. The antibiotics penicillin G or gentamicin used in embryo culture media was not effective for containing the proliferation of bacteria in the present study. However, washes containing doses 10 times higher than those found in the culture media were effective in keeping oocyte cultures free from contamination for 144 hours, using streptomycin and penicillin and the antifungal amphotericin⁽¹⁴⁾.

However, this solution could cause damage to the embryo and increase bacterial resistance over the years.

The pregnancy rate was 39%, and the live birth rate was 27%, which meets the high standards for reproduction in Brazil and Europe^(24,28); in the contaminated group, these rates were 20% and 6.6%, respectively. Proportionally, the contaminated group presented lower rates of pregnancies and live births.

Second trimester miscarriages were observed in 6.6% and 1% of samples from the contaminated and uncontaminated groups, respectively. In the two cases of biochemical pregnancy that were observed in the contaminated group, very low human chorionic gonadotropin (HCG) levels (25 and 40 IU) were detected. Microbial contamination is cited as one of the causes of miscarriage⁽³²⁾. In one case of *in vitro* fertilization, septicemia was associated with *Candida* species and miscarriage at 21 weeks caused by chorioamniotic membrane separation⁽³³⁾.

Escherichia coli and *Candida* species cause more than 59% and 26% of embryo culture contamination, respectively⁽³⁴⁾. The rate of *E. coli* resistance to gentamicin (the antibiotic used in the culture media) increased 13% from 2006 to 2008, and this rate is likely to increase further⁽³⁵⁾. Resistance has also been observed in studies addressing urinary tract infections⁽³⁶⁾ and pregnant women⁽³⁷⁾. The multidrug-resistant bacteria of the genera *Pseudomonas sp* (1 case) and *Staphylococcus sp* (3 cases) found in this study were also predominant in the diagnosis of sepsis in studies conducted in Brazil⁽³⁸⁾.

Samples contaminated with large gram-positive bacilli that are normally present in air, soil and water indicate environmental contamination, with an absence of species of medical importance. There is no study reporting an association between gram-positive bacilli and human infection. In the analyzed groups, there was an increase in the number of blastocysts from 2009 to 2014 as the result of a decrease in the number of Grade A embryos and, particularly, Grade B embryos. This proportion changed because of an increase in cultures with higher quality embryos that have better chances of implantation from 2011. This is because the class A and B were advancing to blastocyst, can be very helpful for selecting the best

candidates for individual transfers, thereby optimizing the results and reducing the risks associated with multiple pregnancies⁽³⁸⁾. It is also important to reduce the risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), which is very common when a cycle is induced to collect oocytes and more time is used to culture embryos⁽⁴⁰⁾. **Therefore do not compare rates blastulation between groups because the contamination rate was not maintained proportional over the years of collecting and any difference in the number of blastocysts could be due to the growth of your culture, from 2011.**

The contaminated group presented 20% poor embryos, while the uncontaminated group presented 6.6%. Poor embryos (Grades C and D) were three times more frequent in the contaminated group than in the uncontaminated group, and the difference was significant ($p=0.038$). Grade D embryos did not have success, even when pregnancy was established.

Regarding the 6.32% contamination rate, considered high for bank germ cells, may be associated with air conditioners and HEPA filters. The two laboratories have undergone adjustments to germ cell bank operating standards, RCD 23 of May 27, 2011 (41), and reforms that occurred between 2011 and 2012, which may have caused the high contamination of fungi and bacteria air contaminants in this study (49% of fungi and 16.67% of Bacillus sp). The largest number of contaminated samples was between 2011 and 2012 (23:33% from 2009 to 2010, 63.33% from 2011 to 2012, 13:33% in 2013). The comparison research between laboratories was not the subject of our goals, since this work has already been contemplated in the master, with contamination of similarity (4.8% contamination on average) between the 3 active laboratories in Goiânia, Goiás, Brazil (2009-2010) (9). In this period were not found contaminant air fungi.

Although there are some study limitations, such as the limited number of reports in the literature analyzing the impact of contamination on embryos and gestation, the use of a limited number of contaminated samples (30) and analyses that were performed only in the culture dishes (serologic test results would complement the data), this study showed that bacterial contamination in embryo culture dishes seems to impact the perinatal outcome because no cases of pregnancy and birth resulted from these culture dishes. The fact that

there are a small number of studies correlating contamination and success in assisted reproduction should be a stimulating factor for subsequent studies.

Conclusions

The systematic analysis of culture media for presence of bacteria or fungi as presented in the present study is thus potentially of interest. The relationship between contamination, embryo development, and development potential during ART is of great importance and interest to human reproduction laboratories. There was a 6.32% (IC= 4.26-7.98) prevalence of contamination in embryo culture dishes from human reproduction laboratories.

The main microorganisms fungal agents were found: *Candida* spp (20%), *Penicillium* sp (13.34%), *Aspergillus* (10%) and bacterial agents: *Bacillus* sp (16%) *E. coli* (10%), *Staphylococcus* sp (10%) *Streptococcus* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, and *Pseudomonas* sp.

The reproductive outcome was committed in the presence of contamination: embryos quality was worse, with the largest number of C and D combined ($p = 0.013$, OR = 3.53, CI = 1.31-9.58), the pregnancy rate was lower ($p=0.043$, OR = 2.57, CI = 1.03-6.41), the pregnancy loss was higher but not significant ($p=0.094$, OR = 4.37, CI = 0.78-24.59), the perinatal outcome of live births was worse ($p = 0.026$, OR = 5.13, CI = 1.39-18.97). The factor infertility was found over the tubal factor ($p < 0.01$, OR = 4.18, CI=1.94-9.01) with a highly significant difference, between contaminated and uncontaminated group.

References

- (1) Samrslá M, Nunes J C, Kalume C, Cunha ACRD, & Garrafa V. Bioethical study on the expectations of women awaiting assisted reproduction in a public hospital in the Federal District, Brazil. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2007,53(1), 47-52.
- (2) Elder K, Baker D, Ribes J. *Infections, infertility and assisted reproduction*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.

- (3) Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. Processing of semen in an antibiotic-rich medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1997; 67:98–103.
- (4) Craciunas L, Tsampras N, Fitzgerald C. Cervical Mucus removal before embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and sterility*, 2014, 101 (5): 1302-1307.
- (5) Kastrop PMM, Graaf-Miltenburg LAM, Gutknecht DR, Weima SM. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum. Reprod*. 2007; 22: 2243 – 2248.
- (6) Teixeira AMP, Ferriani RA, Soares EG, Rangel RM, Araújo MCP, & Bailão LA. Detecção de células escamosas vaginais no aspirado de fluido folicular durante fertilização in vitro. *Reprod. clim*, 1996, 11(4), 203-6.
- (7) Ben-Chetrit A, Shen O, Haran E, Brooks B, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. *Fertil Steril*. 1996; 66:335–337.
- (8) Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans* a case report. *RBM Online*, 2004; 8:569–573.
- (9) Foizer BRR, Amaral WND, & Sadoyama G. Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana; Research bacteriological and mycological culture of plates from embryos in the laboratory of human reproduction. *Reprod. clim*, 2011, 26(1), 12-18.
- (10) Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina Ci Agr*, 2006, 27, 289-298.
- (11) Pelzer ES, Allan JA, Cunningham K, Mengersen K, Allan JM, Launchbury T, & Knox CL. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. *Human reproduction*, 2011, 26(7), 1799-1812. [doi:10.1093/humrep/der108](https://doi.org/10.1093/humrep/der108)

- (12) Geibdöfer WC, Böhmer K, Pelz C, Schoerner W, Frobenius C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:2788-2790.
- (13) Klein JU, Missmer SA, Jackson KV, Orasanu B, Fox JH, & Racowsky C. In vitro fertilization outcomes after transfer of embryos contaminated with yeast. *Fertility and sterility*, 2009, 91(1), 294-297.
- (14) Campos CO, Bernuci MP, Vireque AA, Campos JR, Silva-de-Sá MF, Jamur MC, & Rosa-e-Silva ACJS. Preventing Microbial Contamination during Long-Term In Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis. *ISRN obstetrics and gynecology*, 2012.
- (15) Silveira TRD, Passos EP, Cheinquer H, Salazar CC, Facin AC, Souza, CABD, & Freitas F. Hepatite C em casais inférteis do setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul* , 2002, 22(2): 19-25.
- (16) Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different *g* forces. *Human Reproduction*, 2000, v. 15, n. 3, p. 662-666.
doi: 10.1093/humrep/15.3.662
- (17) Bielanski, A . Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* .1 July, 2007, 68(1): 1-22)
- (18) Abeyesundara PK, Dissanayake DMAB, Wijesinghe PS, Perera RRDP, & Nishad AAN. Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. *Journal of human reproductive sciences*, 2013, 6(2): 152.
- (19) Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JBM, Mazzulli T, & Jarvi, K. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertility and sterility*, 2012, 97(5), 1050-1055.
- (20) Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. **Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos.** *Fertility and Sterility*, September 2010, 94 (4),1525-1528.

- (21) Nikitina TV, Lebedev IN, Sukhanova NN, Sazhenova EA, Nazarenko S A. **A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: Significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors.** *Fertility and Sterility*, April 2005, 83 (4): 964-972.
- (22) Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR, Cohen J. **Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos.** *Fertility and Sterility*, August 2005, 84(2): 343-355.
- (23) Kallen B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG and Otterblad, PO. Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2010, 88: 137–143. doi: 10.1002/bdra.20645
- (24) Ferraretti AP, Goossens V, De Mouzon J, Bhattacharya S, Castilla JA, Korsak V, Kupka M, Nygren KG & Andersen AN. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2012, 27(9), 2571-2584.
- (25) Koneman E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1600p.
- (26) Lathi RB, Westphal LM, Milki AA. Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*, 2008, 89: 353–357.
- (27) Nagy, Z. P.; Greco, Mizhahi, F. E.; Antunes Jr, N.; Busso, R. E. In: Amaral et al, editores. *Tratado de Reprodução Assistida*. Ed. SBRH, p. 295-316, 2010.
- (28) Freitas M, et al. Crianças Nascidas após Emprego de Técnica de Fertilização Assistida. *Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum.* 2008; 18(3): 218-228.
- (29) Mendonça CRD, Cirqueira MB, & Amaral WND. Infecção por Chlamydia trachomatis e anticorpos contra proteína de choque térmico 60 (HPS60) associados a fator de infertilidade tubária; Chlamydia trachomatis and antibodies against heat shock protein 60 (HPS60) associated with tubal factor infertility. *Femina*, 2012, 40(1).

- (30) Castelo, JS. Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB : qual o agente mais comum?2012 <http://hdl.handle.net/10400.6/1151>.
- (31) Drezett J, Blake MDT, Lira KSFD; Pimentel RM, Adami F, Bessa MMM, Abreu LCD. Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres que sofrem crimes sexuais. *Reproducao & Climaterio*, 2012, 27(3): 109–116.
- (32) Bellelis P, Carvalho MHBD, Zugaib M. Abortamento de causa aloimune: diagnóstico e tratamento. *FEMINA*, 2009, 37(5).
- (33) Asemota OA, Nyirjesy P, Fox R, Sobel JD. Candida glabrata complicating in vitro pregnancy: successful management of subsequent pregnancy. *Fertility and sterility*, 95 (2), 2011, 803-e1.
- (34) Davachi ND, Miri SM. Embryo Culture Challenge: Microbial Contamination. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2013 November; 11(4): 207-8. DOI: 10.5812 / ijb.14733
- (35) Silva MFD. Escherichia coli e a resistência antibiótica: Uma análise do padrão de evolução da resistência da Escherichia coli aos antibióticos no distrito de Castelo Branco, de 2006 a 2008, (2009).
HTTP://www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana_silvapdf.pdf
- (36) Agra HNDC. Análise do perfil de resistência e genotipagem da escherichia coli na infecção do trato urinário não complicada, 2007.
<http://hdl.handle.net/10183/8942>
- (37) Ubillús TMJ, Aranda AL. Resistencia bacteriana en las infecciones urinarias de gestantes en un hospital de Huancayo. *Rev. Soc. Peru. Med. Interna*, 2008, 21(3): 100-103.
- (38) Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCS, Japiassú A, Pinheiro C T & Luiz RR. An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 2010, 18(1): 9-17.
- (39) Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL & Van Voorhis BJ. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertility and sterility*, 2010, 94(2): 543-548.
- (40) Xin, Zhi-min, et al. "Pregnancy outcomes of day 5 embryo transfer in patients at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome and

analysis of factors affecting blastocyst formation." *Journal of International Medical Research*, 2013, 41.4: 1127-1134.

(41) Resolution RDC n° 23, May/27/2011.

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f7c4804986e29a8e51ff4ed75891ae/RDC_23_2011.pdf?MOD=AJPERES

Anexo 6 – Tabelas extras

Distribuição dos casos de fertilização de alta complexidade para os dados dos Conceptos ao Nascimento, segundo os grupos contaminado e não contaminado, 2009/2014.

Tabela de Dados dos Conceptos Nascidos				
Características	Contaminadas		Não Contaminadas	
	n	%	n	%
Sexo				
Masculino	2	100%	65	51,59%
Feminino	0	0%	61	48,41%
Tipo Gravidez				
Única	2	100%	72	73,47%
Gemelar	0	0%	24	24,49%
Trigemelar	0		2	2,04%
Peso ao Nascer				
1 a 2 Kg	1	50%	8	6,35%
2 a 3 Kg	1	50%	63	50,00%
3 a 4 Kg	0	0%	53	42,06%
> 4 Kg	0		2	1,59%
Tamanho ao Nascer				
< 43 cm	1	50%	7	5,56%
43 a 53 cm	1	50%	119	94,44%
> 53 cm	0		0	0,00%
Idade Gestacional				
. Prematuros		100%		26,19%
< 30 semanas	0		3	2,38%
30 a 35 semanas	0		18	14,29%
36 semanas	2	100%	12	9,52%
. A termo		0%		73,81%
37 semanas	0		21	16,67%
38 semanas	0		38	30,16%
39 semanas	0		26	20,63%
40 e 41 Semanas	0		8	6,35%
Total Bebés	2	100%	126	100%

