

CAPITOLO 9

TRATTAMENTO DELLE COPPIE POSITIVE O SIERODISCORDANTI ALLO SCREENING VIROLOGICO

OBIETTIVI

Negli ultimi anni le coppie in cui uno o entrambi i partner sono affetti da patologie infettive quali HIV, HCV o HBV, si sono rivolte sempre più spesso alla procreazione medicalmente assistita. Il loro desiderio di genitorialità è identico a quello di qualsiasi altra coppia; inoltre, il miglioramento della qualità e della aspettativa di vita, insieme con la maggior efficacia delle terapie farmacologiche, ha fatto sì che queste coppie trovassero nella procreazione medicalmente assistita un valido strumento per la realizzazione di tale desiderio.

Tale situazione può riguardare sia coppie per le quali sia stata effettuata una diagnosi di infertilità, sia coppie potenzialmente fertili che si rivolgono appositamente ad un centro di infertilità al fine di eliminare il rischio di contagio. Essendo infatti queste infezioni virali sessualmente trasmissibili con elevato rischio anche per il feto, costituiscono una causa ostativa alla riproduzione consentendo pertanto alle coppie in cui uno o entrambi i partner sono affetti da patologie infettive di accedere alle tecniche di riproduzione medicalmente assistita.

Il centro di procreazione medicalmente assistita che decide di trattare coppie positive o sierodiscordanti deve predisporre un sistema di gestione e controllo interno, atto a garantire la sicurezza per le coppie non infette trattate nel medesimo centro, per le coppie positive o sierodiscordanti stesse, per l'eventuale nascituro e per gli operatori.

INDICE

- **Procedura generale**
- **Esami diagnostici**
- **Impianto e organizzazione del laboratorio nella gestione del materiale infetto**
- **Gestione pratica del trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti**
- **Trattamento dell'uomo infetto**
- **Trattamento della donna infetta**
- **Crioconservazione del materiale infetto**
- **Pulizia e sanificazione**
- **Riferimenti bibliografici**

IDENTIFICAZIONE DEI PAZIENTI E TRACCIABILITÀ NEL LABORATORIO

PRIMA DEL TRATTAMENTO

- Scrivere Procedure Operative specifiche e aggiornarle periodicamente
- Predisporre percorsi separati (spazialmente o temporalmente) per la gestione dei materiali e delle cellule potenzialmente infettive
- Verificare la validità esami sierologici di Anti-HIV-1,2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV Ab ed eventualmente l'HTLV-I, malaria, Zika... per i pazienti esposti alle zone a rischio: validità di 90 giorni per il primo tentativo e di 180 giorni dal secondo in poi
- Predisporre almeno una banca di quarantena per conservare temporaneamente il materiale sottoposto a trattamento e in attesa del referto
- Se possibile, vaccinare per l'epatite B il personale così come il partner di un soggetto infetto da HBV

DURANTE IL TRATTAMENTO

- Limitare l'accesso del personale autorizzato ed adeguatamente istruito a quello strettamente necessario per l'effettuazione del trattamento
- Indossare i Dispositivi Individuali di Protezione
- Prevedere il maggior impiego possibile di materiale monouso
- Lavorare in modo pulito, contaminando meno strumentazione possibile e pulendo immediatamente eventuali stravasari accidentali
- Utilizzare incubatori differenti opportunamente segnalati e ben identificati per le diverse patologie
- Utilizzare banche separate per ogni patologia opportunamente segnalate e ben identificate per la crioconservazione dei gameti e degli embrioni ottenuti

DOPO IL TRATTAMENTO

- Eliminare tutti i rifiuti negli appositi contenitori per lo smaltimento di rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo (prestare particolare attenzione al materiale pungente e tagliente)
- Pulire e sanificare tutta la strumentazione, le attrezzature e gli ambienti utilizzati per il trattamento di materiali e cellule potenzialmente infetti
- Registrare tutte le operazioni effettuate sugli appositi registri

PROCEDURA GENERALE

Il laboratorio di procreazione medicalmente assistita che tratta coppie positive o sierodiscordanti deve assicurare requisiti di sicurezza e tracciabilità particolari e mettere a punto procedure operative specifiche. Tali procedure devono essere opportunamente scritte ed inserite nel Manuale Operativo e devono essere sottoposte a revisione periodica.

In particolare, devono essere stabiliti percorsi e modalità di trattamento e conservazione dei materiali infetti diversi e separati da quelli previsti per le coppie negative. Tali percorsi riguardano sia la gestione della coppia sia quella dei campioni, e devono coinvolgere anche i materiali, la strumentazione e le attrezzature che vengono utilizzate. La separazione dei percorsi può essere sia di tipo spaziale, utilizzando laboratori od aree del laboratorio differenti, o di tipo temporale, programmando il trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti in momenti diversi dai pazienti negativi. Questo può essere realizzato mettendo le sessioni di lavoro come ultime della giornata o concentrandole in periodi particolari dell'anno, appositamente dedicate ai soli pazienti positivi. Ovviamente in qualsiasi caso alla fine di ogni singolo trattamento dovrà essere predisposta una pulizia straordinaria della strumentazione e delle attrezzature utilizzate.

ESAMI DIAGNOSTICI



Tutte le coppie in procinto di iniziare un ciclo di procreazione medicalmente assistita devono obbligatoriamente effettuare i seguenti test biologici:



Anti-HIV-1,2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV Ab (DLG-16-2010, all. III, par.2.2). In caso di positività di HBcAb devono essere eseguiti ulteriori test per definire il rischio relativo a HBV (Tab. 1).

In aggiunta, deve essere effettuato anche il test per l'HTLV-I per pazienti che vivono o sono originari di aree geografiche con alta diffusione di tale virus, o che hanno partner o genitori provenienti da tali aree (DLG-16-2010, all. III, par.2.4). I campioni di sangue vanno prelevati non oltre 90 giorni prima dell'inizio del trattamento e ripetuti ogni sei mesi durante il trattamento (Conferenza Stato Regioni del 12-03-12, sezione C, par. 1.1).

Si specifica che la prescrizione e la valutazione della sierologia è esclusivamente di competenza medica e non del personale biologico e del laboratorio. Ad ogni modo si ritiene utile inserire nel presente capitolo una cartina riportante la diffusione nel mondo del virus HTLV-I (Fig.1) e una tabella per l'interpretazione dei marcatori del virus HBV (Fig. 2), a titolo puramente informativo.

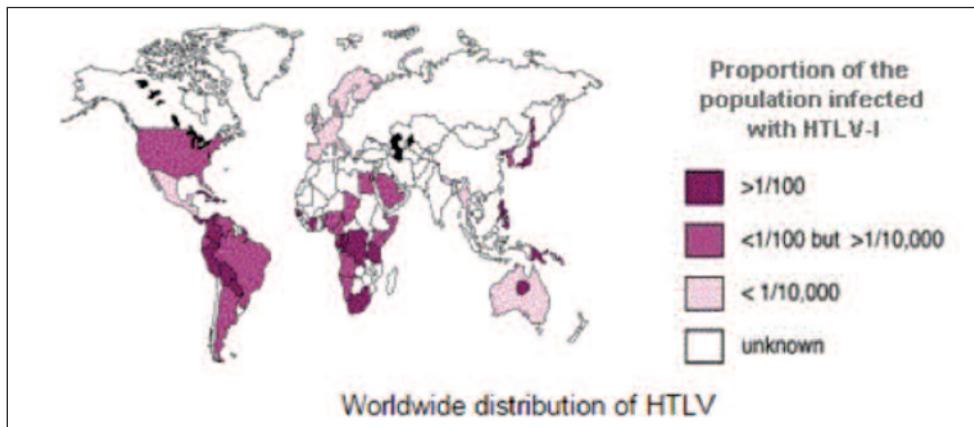


Fig. 1.
Diffusione nel mondo del virus HTLV-1.

Tabella1. L'interpretazione dei marcatori del virus HBV.

Interpretazione dei marcatori del virus HBV

HBsAg	HBcA b(IgM)	HBcAb (IgG)	HbsAb Anti-HBs	HBV- DNA	Diagnosi	Rischio contagio
+	-	-	-	-	Infezione recente (fase iniziale)	SI
+	-	-	-	+	Infezione (fase tardiva)	SI
+	+	+	-	+	Infezione attiva (+/- epatite)	SI
-	+	-	-	+	Infezione in risoluzione (+/- epatite)	SI
-	+	+	-	+/-	Infezione in risoluzione (+/- epatite)	SI
-	+/-	+	+	-	Guarigione iniziale	NO
-	-	+	+	-	Pregressa infezione	NO
-	-	+	-	-	Pregressa infezione	NO
+	-	+	-	+	Infezione cronica	SI
+	-	+	-	+/-	Portatore inattivo (HBV-DNA < 100.000 copie/ml)	SI
-	-	+/-	+/-	+	Infezione occulta	SI
-	-	-	+	-	Vaccinazione	NO

IMPIANTO E ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL MATERIALE INFETTO

Sebbene la normativa vigente non richieda spazi separati per la gestione del materiale infetto, è necessario verificare la corretta idoneità e sicurezza degli spazi e della strumentazione.



È consigliabile che il laboratorio sia equipaggiato con strumentazione e attrezzature specifiche per il trattamento e la manipolazione del materiale infetto. È quindi opportuno utilizzare strumenti dedicati e utilizzare materiali monouso in tutte le fasi di lavoro che lo consentono.

Nel caso in cui ciò non fosse possibile, bisogna predisporre una procedura di pulizia e decontaminazione appropriata e validata, che garantisca la disinfezione dopo l'uso.

Nello specifico è consigliabile utilizzare:

Materiale di consumo e piccola strumentazione: si raccomanda di utilizzare sempre se possibile materiale monouso e strumentazione dedicata. Ove questo non sia possibile, è bene identificare in modo chiaro la strumentazione necessaria, che deve comunque essere ridotta al minimo e pulita e sanificata, seguendo l'apposita procedura, dopo ogni suo impiego. In caso di separazione temporale dei trattamenti, è consigliabile identificare in modo chiaro le aree in cui verranno trattati i campioni infetti, che dovranno essere comunque il più limitate possibile e devono essere pulite e sanificate dopo ogni utilizzo. È fortemente sconsigliato l'uso di materiale tagliente

e pungente (aghi, siringhe, vetro, ecc.) per ridurre al minimo il rischio di contagio degli operatori.

Ove indispensabile, si raccomanda di utilizzare questo tipo di materiale con estrema cautela eliminandolo immediatamente dopo l'uso negli appositi contenitori per lo smaltimento di rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo taglienti e pungenti.

Cappa: nel caso in cui sia il partner maschile ad essere infetto, si raccomanda l'utilizzo di cappa a flusso laminare verticale di classe II che permette di garantire protezione sia all'operatore sia al campione trattato. La cappa deve essere utilizzata per la valutazione, la preparazione e la manipolazione di spermatozoi infetti. Nel caso in cui sia la partner femminile ad essere infetta, essendo necessario introdurre sotto cappa uno stereomicroscopio per la manipolazione di ovociti ed embrioni, la classe II non potrebbe comunque più essere garantita, pertanto è sufficiente l'impiego di una cappa a flusso laminare verticale. In entrambi i casi, deve essere garantito il grado A dell'aria, come previsto dalla normativa vigente.

Incubatori dedicati per la coltura embrionale.



All'interno dello stesso incubatore, deve essere trattata una sola patologia per volta.



Lo stesso, dopo opportuna sanificazione e pulizia, può essere riutilizzato per un'altra patologia o per coppie sieronegative. È inoltre necessario che gli incubatori destinati al trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti siano opportunamente segnalati e ben identificati quando vengono utilizzati per questo tipo di trattamenti.

Il numero di incubatori da dedicare alle coppie positive o sierodiscordanti deve essere stabilito anche sulla base del numero di cicli previsti e deve tenere conto della possibilità di avere due o più patologie in combinazione tra loro.

È consigliabile l'impiego di incubatori provvisti di ciclo di sterilizzazione.

4. Centrifuga dedicata al materiale seminale positivo.



È consigliabile disporre di una seconda centrifuga per il trattamento del seminale infetto. Qualora non fosse possibile, è consigliabile destinare alloggiamenti separati in cui gestire le diverse patologie. È buona norma procedere comunque con la sanificazione della centrifuga dopo ogni utilizzo, con le appropriate procedure di pulizia.

5. Stereo-microscopio e postazione per la micromanipolazione dedicati, se possibile.



In alternativa, prevedere la pulizia e sanificazione del piano di lavoro dopo ogni uso.

6. Micropipette e pipettatori dedicati o, dove possibile, monouso.



7. È obbligatorio l'impiego di banche separate per lo stoccaggio in azoto liquido di gameti ed embrioni (DLG-16-2010, all. III, par.2.2 e Conferenza Stato Regioni del 12-03-12, sezione B, par. 6.2).

Per escludere quindi il rischio di trasmissione di infezione tra campioni conservati.



È necessario dotarsi di banche separate e dedicate per ciascuna patologia trattata. È inoltre necessario avere almeno una banca di quarantena per conservare temporaneamente il materiale sottoposto a trattamento e in attesa del referto.



È consigliabile quando possibile impiegare dispositivi di stoccaggio ad alta sicurezza per la crioconservazione di gameti ed embrioni.

GESTIONE PRATICA DEL TRATTAMENTO DI COPPIE INFETTE O SIERODISCORDANTI

Il laboratorio di procreazione medicalmente assistita che intende trattare pazienti affetti o positivi per patologie virali, ha il compito di mettere in atto procedure di sicurezza interne specifiche e accurate al fine di garantire la sicurezza non solo dei pazienti con infettivologia negativa ma anche del personale e delle stesse coppie infette. È necessario che il centro di procreazione medicalmente assistita che tratta materiale infetto predisponga consensi informati specifici per i diversi trattamenti, che devono essere illustrati e fatti firmare dal medico responsabile del trattamento. Le coppie infette o sierodiscordanti devono essere adeguatamente ed esaustivamente informate dei possibili rischi ai quali potrebbero andare incontro, riguardanti sia il partner sano della coppia stessa sia il possibile nascituro.



A tal fine, è consigliato che una coppia sierodiscordante esegua, prima di intraprendere un percorso di procreazione medicalmente assistita, una visita da un medico infettivologo che rilasci una dichiarazione sulle condizioni di salute del/dei pazienti infetti e una specifica consulenza infettivologica. Tale consulenza è fortemente raccomandata qualora la positività dovesse riguardare la partner femminile al fine di mettere in atto tutte le terapie possibili per ridurre la viremia e tutelare l'eventuale gravidanza.

Le coppie devono essere informate circa i rischi di trasmissione verticale del virus e delle particolari procedure da effettuare in caso di parto (soprattutto in caso di donne positive). Devono inoltre essere informate anche del rischio di contaminazione orizzontale del partner sano. L'infettivologo inoltre valuterà lo stato di salute dei pazienti, prescrivendo gli esami e le eventuali terapie necessarie, e rilascerà una consulenza scritta in cui indicherà il momento più opportuno per iniziare il trattamento di procreazione medicalmente assistita. Prima di iniziare il trattamento, le coppie infette o sierodiscordanti dovranno sottoporsi agli esami clinici di laboratorio necessari. Premesso che tutti i campioni dovrebbero essere trattati come potenzialmente infetti, è comunque raccomandabile, al fine di ridurre il rischio di cross-contaminazione tra campioni biologici, che il materiale infetto che entra in laboratorio rimanga sempre confinato negli spazi appositamente dedicati. È buona norma evitare stravasi o schizzi di fluidi potenzialmente infetti (sperma e suoi derivati, fluido follicolare), nel caso in cui ciò dovesse accadere si rende necessario pulire

prontamente ed accuratamente le superfici contaminate in modo da evitare la dispersione del virus e possibili contaminazioni. Al termine delle procedure di manipolazione dei campioni bisogna pulire accuratamente tutte le superfici e gli strumenti utilizzati seguendo la corretta procedura di pulizia e sanificazione. Tutto il materiale monouso utilizzato deve essere eliminato immediatamente dopo l'uso. Inoltre, è indispensabile prestare la massima attenzione alla corretta eliminazione dei fluidi di scarto prodotti dalla pulizia e dalla coltura dei gameti e degli embrioni infetti: questi vanno chiusi in apposite provette per evitare la dispersione aerea ed eliminati con i rifiuti a rischio biologico.



Al fine di garantire la massima sicurezza per gli operatori, è bene che questi si proteggano adeguatamente durante tutte le operazioni di manipolazione del materiale biologico infetto o potenzialmente infetto, utilizzando propriamente i dispositivi di protezione individuale (DPI), che devono essere forniti dalla struttura presso la quale si lavora.

Questi sono costituiti da: guanti monouso, abbigliamento monouso da indossare sopra il normale abbigliamento da laboratorio, occhiali o visiera di protezione (prestando attenzione che sia presente anche la protezione laterale degli occhi) e mascherina. Tutti i DPI vanno regolarmente mantenuti e controllati, seguendo le specifiche istruzioni date dal fornitore.



Inoltre, è buona prassi che tutti gli operatori del centro, così come il partner di un soggetto infetto da HBV, siano vaccinati per l'epatite B.

È necessario che solo il personale autorizzato ed adeguatamente istruito si occupi della gestione del materiale infetto. In caso di contaminazione accidentale del personale con materiale infetto, è bene rivolgersi immediatamente ad un infettivologo ed avviare le adeguate procedure di profilassi. Infine è raccomandato che sia installato vicino al laboratorio un lavaocchi per consentire il lavaggio veloce in caso di contatto accidentale delle mucose con gli agenti infettivi. Il trattamento di coppie infette o sierodiscordanti può essere effettuato in un centro di PMA, purché il laboratorio sia in grado di garantire adeguati parametri di sicurezza come quelli descritti nel presente capitolo. Si riporta a titolo informativo, una rappresentazione schematica riassuntiva sulla gestione generale dei pazienti infetti (Fig. 2), specificando che la decisione di iniziare o meno un dato ciclo di trattamento è di esclusiva competenza medica.

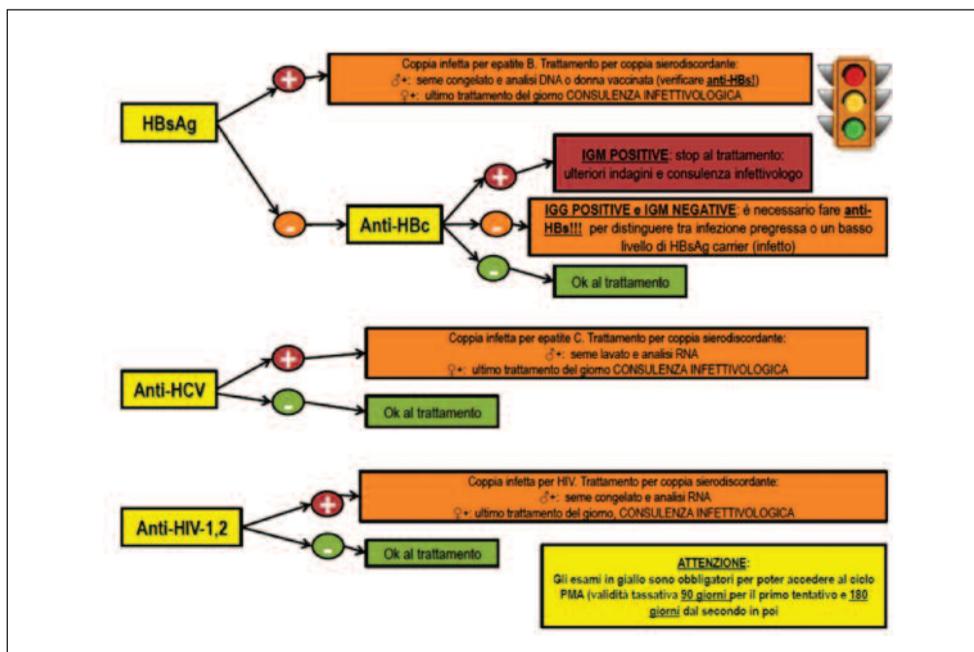


Fig. 2. Gestione dei pazienti infetti.

TRATTAMENTO DELL'UOMO INFETTO

Il contenitore del liquido seminale viene posizionato sotto la cappa dedicata e, dopo liquefazione, viene valutato per i classici parametri seminali. Il campione viene quindi sottoposto al trattamento di preparazione mediante gradiente di densità seguito da un successivo *swim-up* (preferibile) o lavaggio (a seconda delle caratteristiche di base del liquido seminale) in terreno di coltura idoneo per gli spermatozoi mediante centrifugazione (*spermwashing*). Al termine di tale procedura si valuta la concentrazione del campione, si diluisce con una quantità adeguata di terreno di lavaggio e si separa un'aliquota che viene inviata al laboratorio per la valutazione della presenza del virus mediante tecnica di PCR. La restante parte del campione viene addizionata con il crioprotettore e congelata. È consigliabile effettuare il congelamento in supporti chiusi e sigillati (*cryovials* o *paillettes* ad alta sicurezza). Il seme congelato viene quindi posizionato in un bidone di quarantena predisposto ed ad uso esclusivo del campione in esame in attesa del referto di laboratorio.

Se il referto certificherà la negatività del campione, lo stesso verrà spostato dalla quarantena alla banca predisposta per i liquidi seminali negativi, in attesa del suo utilizzo.

Se il referto certificherà la positività del campione, il campione verrà spostato dalla quarantena alla banca predisposta per i liquidi seminali positivi per la patologia in esame e la banca di quarantena sanificata e decontaminata prima di un qualsiasi successivo utilizzo. Tale operazione di pulizia può essere affidata ad una ditta specifica, che rilascerà un certificato, oppure fatta direttamente dal personale di laboratorio secondo le procedure operative scritte. È opportuno sottolineare che

nella banca di quarantena può essere contenuto un solo campione per volta in attesa di referto, per evitare la cross-contaminazione qualora solo uno dei due risultasse positivo.

TRATTAMENTO DELLA DONNA INFETTA

Il prelievo ovocitario viene eseguito secondo la normale procedura chirurgica.



È fortemente consigliato programmare l'intervento in coda all'attività clinica della giornata.

Le provette vengono portate direttamente sotto la cappa predisposta. È consigliabile che la cappa sia foderata utilizzando telini sterili monouso, lasciando scoperta solo la luce dello stereomicroscopio.

I complessi cumulo-ovocita recuperati vengono lavati sequenzialmente per almeno due volte in terreno specifico e posizionati nell'incubatore dedicato.

Tutte le procedure di manipolazione devono essere effettuate sotto cappa specifica, inclusa quella di decumulazione ed eventuale crioconservazione. Anche in questo caso è preferibile, ove possibile, effettuare la crioconservazione di ovociti ed embrioni in sistemi chiusi.

La ICSI andrà effettuata sulla stazione di micromanipolazione predisposta, avendo molta cura a non ferirsi con gli aghi da iniezione.

Nel caso di congelamento, i supporti con gli ovociti/embrioni congelati andranno posizionati nella banca preposta a seconda della patologia virale in questione.

CRIOCONSERVAZIONE DEL MATERIALE INFETTO



In caso di trattamento di coppie infette o sierodiscordanti, dato il rischio di trasmissione di infezione, è obbligatorio dotarsi di banche dedicate specifiche per la patologia infettiva. In particolare, i campioni dei soggetti positivi per HIV, HBV e HCV, devono essere conservati in banche separate da quelle contenenti campioni negativi e da quelle dei campioni di cui manca una documentazione certa di negatività. In aggiunta, il Centro può disporre un tank di quarantena per eventuali campioni in attesa di referto.

È importante sottolineare che lo stoccaggio in azoto liquido è l'unica situazione in cui grandi quantità di materiale biologico proveniente da pazienti diversi sono mantenute insieme in un liquido comune.



Pertanto, sarebbe fortemente consigliato, ove possibile, l'impiego di sistemi di crioconservazione sigillati ad alta sicurezza.

L'utilizzo di vapori di azoto per la crioconservazione è efficace per crioconservazioni a breve termine e per i trasporti. Tuttavia, non si conoscono gli effetti su gameti ed embrioni della crioconservazione a lungo termine nei vapori di azoto. Inoltre, funghi e batteri sono stati descritti anche nella fase gassosa. Un'altra soluzione proposta è la filtrazione dell'azoto liquido, che è comunque una procedura complessa e di non sicura efficacia. Infine, la sterilizzazione dell'azoto può essere impie-

gata durante le procedure di congelamento e scongelamento (è stato riportato che tre risciacqui consecutivi in azoto sterile possono eliminare funghi e batteri) ma è di difficile applicazione per lo stoccaggio nella banche a lungo termine.

Per quanto riguarda la movimentazione di campioni infetti congelati tra Centri di procreazione medicalmente assistita, va ricordato che devono essere rispettate tutte le norme prescritte per i campioni positivi e opportunamente descritte nell'apposito capitolo del presente manuale, tenendo presente che è essenziale fornire tutta la documentazione sierologica relativa al campione trasportato.



È inoltre fortemente consigliato l'utilizzo di contenitori di trasporto monouso.

PULIZIA E SANIFICAZIONE



Tutta la strumentazione e i piani di lavoro impiegati nel trattamento delle coppie positive o sierodiscordanti devono essere puliti e sanificati al termine di ogni utilizzo e comunque alla fine di ogni ciclo di trattamento, prima di poterli destinare ad un nuovo ciclo.



È fortemente consigliato che questo avvenga anche in quei laboratori in cui la strumentazione (cappe, incubatori, micromanipolatori, microscopi, centrifughe, ecc.) è interamente dedicata al trattamento delle coppie infette, diversa da quella utilizzata per il trattamento dei pazienti negativi.



È consigliabile utilizzare l'autoclave per sterilizzare tutto il materiale e la strumentazione che lo consente (ad esempio ripiani e vaschette degli incubatori, pinze per la manipolazione in azoto liquido).

Per effettuare la pulizia di materiali e strumenti non autoclavabili, è possibile procedere passando prima con garze sterili imbevute di acqua sterile, quindi utilizzare soluzioni contenenti ammonio quaternario, etanolo o ipoclorito di sodio ed infine lasciando asciugare all'aria.

Si aspettano quindi circa venti minuti prima di ricominciare una nuova attività.

Esistono in commercio diverse soluzioni già pronte all'uso, non tossiche per gli embrioni, che hanno effetto disinfettante su batteri, funghi, e alcuni virus e che possono essere utilizzate seguendo le istruzioni di uso fornite con il prodotto stesso.

È bene prestare attenzione nel pulire tutte le parti e gli interstizi di strumenti e piani di lavoro dove è stato eseguito il trattamento del materiale infetto.

L'utilizzo di sistemi a raggi ultravioletti sembra non essere particolarmente efficace per l'eliminazione di patogeni virali, in quanto hanno principalmente un'azione batteriostatica e non hanno invece grande capacità di penetrazione dei materiali. Inoltre devono essere utilizzate con cautela e a distanza dagli operatori, essendo agenti mutageni e dannosi per gli occhi.

È necessario riportare la documentazione di avvenuta pulizia e sanificazione di strumentazione e piani di lavoro in un apposito registro.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

GENERALI

- Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ, Remohí J. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2012;97(1):74-8.
- Coccia ME, Cammilli F, Ginocchioni L, Rizzello F. Role of infection in in vitro fertilization treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1034:219-35.
- Coccia ME, Ruzzello F. Management della patologia infettiva nella coppie sterile. In *Medicina della Riproduzione Umana*. Borini, Ubaldi, CIC edizioni. 2010.
- Elder K, Baker DJ, Ribes JA. *Infections, Infertility, and Assisted Reproduction*. Cambridge University Press, New York, USA. 2005.
- Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vannin AS, Emiliani S, Delbaere A. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):149-62.
- ESHRE position paper on the EU Tissues and Cells Directive EC/2004/23, November 2007.
- Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Human Immunodeficiency virus and infertility treatment. *Fertil Steril*. 2010;94(1):11-5.
- Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, van Inzen W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod*. 2000;15(10):2241-6.
- Hughes C, Grundy K, Emerson G, Mocanu E. Viral screening at the time of each donation in ART patients: is it justified? *Hum Reprod*. 2011;26(11):3169-72.
- Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L; Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1253-62.
- Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1181-8.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Guidelines for Reducing the risk of viral transmission during fertility treatment. *Fertil Steril*. 2008;90:S156-62.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Hepatitis and reproduction. *Fertil Steril*. 2008;90:S226-35.
- Shenfield F, Pennings G, Cohen J, Devroey P, Tarlatzis B, Sureau C; ESHRE ETHICS and LAW Task Force. Taskforce 8: ethics of medically assisted fertility treatment for HIV positive men and women. *Hum Reprod*. 2004;19(11):2454-6.

HIV

- Barnes A, Riche D, Mena L, Sison T, Barry L, Reddy R, Shwayder J, Parry JP. Efficacy and safety of intrauterine insemination and assisted reproductive technology in populations serodiscordant for human immunodeficiency virus: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014;102(2):424-34.
- Cardona-Maya W1, Velilla P, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT. Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: changes in the semen parameters. *Curr HIV Res*. 2009;7(4):418-24.
- Dimitrakopoulos AA. HIV and gamete interactions. *Hum Fertil (Camb)*. 2003;6(2):81-3.
- Douglas NC, Wang JG, Yu B, Gaddipati S, Guarnaccia MM, Sauer MV. A systematic, multidisciplinary approach to address the reproductive needs of HIV-seropositive women. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):257-63.
- Garrido N, Meseguer M, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod*. 2005;20(4):1028-34.
- Gilling-Smith C, Nicopoullos JD, Semprini AE, Frodsham LC. HIV and reproductive care—a review of current practice. *BJOG*. 2006;113(8):869-78.
- Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS*. 2006;24;20(7):967-73.
- Kim LU, Johnson MR, Barton S, Nelson MR, Sontag G, Smith JR, Gotch FM, Gilmour JW. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. *AIDS*. 1999;16;13(6):645-51.
- Manigart Y, Rozenberg S, Barlow P, Gerard M, Bertrand E, Delvigne A. ART outcome in HIV-infected patients. *Hum Reprod*. 2006 Nov;21(11):2935-40.
- Nicopoullos JD, Almeida P, Vourliotis M, Goulding R, Gilling-Smith C. A decade of the sperm-washing programme: where are we now? *Hum Fertil (Camb)*. 2010;13(2):90-7.
- Pasquier C, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, Massip P, Puel J, Bujan L, Izopet J. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS*. 2000 Sep 29;14(14):2093-9.
- Sauer MV. Sperm washing techniques address the fertility needs of HIV-seropositive men: a clinical review. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(1):135-40.
- Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, Albani E, Oneta M, Pardi G. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet*. 1992;28;340(8831):1317-9.

- van Leeuwen E, Repping S, Prins JM, Reiss P, van der Veen F. Assisted reproductive technologies to establish pregnancies in couples with an HIV-1-infected man. *Neth J Med*. 2009;67(8):322-7.
- Vitorino RL, Grinsztejn BG, de Andrade CA, Hökerberg YH, de Souza CT, Friedman RK, Passos SR. Systematic review of the effectiveness and safety of assisted reproduction techniques in couples serodiscordant for human immunodeficiency virus where the man is positive. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1684-90.

HBV

- Hu XL, Zhou XP, Qian YL, Wu GY, Ye YH, Zhu YM. The presence and expression of the hepatitis B virus in human oocytes and embryos. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1860-7.
- Lam PM, Suen SH, Lao TT, Cheung LP, Leung TY, Haines C. Hepatitis B infection and outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer treatment. *Fertil Steril*. 2010;93(2):480-5.
- Lee VC, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Impact of positive hepatitis B surface antigen on the outcome of IVF treatment. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(5):712-7.
- Lutgens SP, Nelissen EC, van Loo IH, Koek GH, Derhaag JG, Dunselman GA. To do or not to do: IVF and ICSI in chronic hepatitis B virus carriers. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2676-8.
- Nie R1, Jin L, Zhang H, Xu B, Chen W, Zhu G. Presence of hepatitis B virus in oocytes and embryos: a risk of hepatitis B virus transmission during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1667-71.
- Oger P, Yazbeck C, Gervais A, Dorphin B, Gout C, Jacquesson L, Ayel JP, Kahn V, Rougier N. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(2):207-12.
- Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995;15;346(8968):137-40.

HCV

- Abou-Setta AM. Transmission risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? *Hum Reprod*. 2004;19(12):2711-7.
- Devaux A, Soula V, Sifer C, Branger M, Naouri M, Porcher R, Poncelet C, Neuz A, Alvarez S, Benifla JL, Madelenat P, Brun-Vezinet F, Feldmann G. Hepatitis C virus detection in follicular fluid and culture media from HCV+ women, and viral risk during IVF procedures. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2342-9.
- Garrido N, Meseguer M, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod*. 2005;20(4):1028-34.

ALTRI PATOGENI

- Coppus SF, Land JA, Opmeer BC, Steures P, Eijkemans MJ, Hompes PG, Bossuyt PM, van der Veen F, Mol BW, van der Steeg JW. Chlamydia trachomatis IgG seropositivity is associated with lower natural conception rates in ovulatory subfertile women without visible tubal pathology. *Hum Reprod.* 2011;26(11):3061-7.
- Eggert-Kruse W, Reuland M, Johannsen W, Strowitzki T, Schlehofer JR. Cytomegalovirus (CMV) infection—related to male and/or female infertility factors? *Fertil Steril.* 2009;91(1):67-82.
- Foresta C, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Garolla A. Semen washing procedures do not eliminate human papilloma virus sperm infection in infertile patients. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1077-82.
- Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, Ferlin A. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One.* 2011;7(6):e15036.
- Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, et al. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem? *Int J Androl.* 2011;34(3):242-6.
- Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1723-7.
- Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril.* 2010;93(3):802-6.
- Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011;23(4):232-7.
- Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol.* 2013;100(1):20-9.
- Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, Surcel HM, Paavonen J, Tiitinen A. The role of Chlamydia trachomatis infection in male infertility. *Fertil Steril.* 2009;91:1448-50.

CRIOCONSERVAZIONE

- Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 2000;40(2):110-6.
- Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 2003;46(2):146-52.
- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod.* 2009;24(10):2457-67.
- Cobo A, Romero JL, Pérez S, de los Santos MJ, Meseguer M, Remohí J. Storage

- of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1903-7.
- Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;15;11:41.
 - Hashimoto S, Amo A, Hama S, Ohsumi K, Nakaoka Y, Morimoto Y. A closed system supports the developmental competence of human embryos after vitrification : Closed vitrification of human embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(3):371-6.
 - Morris GJ. The origin, ultrastructure, and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. *Cryobiology*. 2005;50:231-8.
 - Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *ReprodBiomed Online*. 2004;9(2):134-51.
 - 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. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1525-8.
 - Parmegiani L, Rienzi L. Hermetical goblets for cryostorage of human vitrified specimens. *Hum Reprod*. 2011;26(11):3204-5.
 - Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. 2012 Oct;98(4):870-5.