



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

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



Barbara Rosa Ribeiro Foizer^{a,b,*}, Kênia Rodrigues da Silva^c,
José Daniel Gonçalves Vieira^d e Waldemar Naves do Amaral^{b,e}

^a Universidade Salgado de Oliveira (UNIVERSO), Goiânia, GO, Brasil

^b Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil

^c Maternidade Dona Íris, Goiânia, GO, Brasil

^d Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil

^e Sociedade Brasileira de Ultrassonografia (SBUS), São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 11 de julho de 2014

Aceito em 13 de agosto de 2014

On-line em 6 de novembro de 2014

Palavras-chave:

Contaminação biológica

Laboratórios

Desenvolvimento embrionário

Gravidez

Fertilização

R E S U M O

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 malformação fetal. Fungicidas e bactericidas são acrescentados aos meios de cultura na tentativa de conter este crescimento microbiológico. 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.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

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

A B S T R A C T

Contamination may be present in the embryos culture arising from various sources boards, given that the materials collected male and female cannot be sterilized. This contamination can compromise embryo viability, gestational cause infection, bringing fetal malformation. Antifungal and antibiotics are increase to the culture media in an attempt to stop

Keywords:

Biological contamination

Laboratories

Embryonic development

[☆] Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Goiânia, GO, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br (B.R.R. Foizer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2014.08.005>

1413-2087/© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

Pregnancy
Fertilization

this microbiological growth. Preventive methods still under study should be evaluated. The contamination must be identified to guide the legislation that regulates protocols executed during assisted reproduction to ensure maternal fetal protection against pathogenic microorganisms of importance. Should evaluate the interference of contamination for the embryos, fetuses and infants, in an attempt to establish specific causes and consequences.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

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 relatado,¹ 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 genital 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(m³/h)/m², vazão mínima de ar exterior de 15(m³/h)/m², 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 CO² 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 CO². 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 Associação Brasileira de Normas Técnicas (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 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 espermatozoide (ICSI). Vários autores relatam terem 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 *Neisseria gonorrhoeae*, 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 com resistência ao metronidazol e à doxaciclina, 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*, *estreptobacilos* 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 homens,¹⁶ 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.¹⁸ 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 conseguirem implantar no útero. Também podem ocorrer síndromes que comprometam a saúde fetal, trazendo a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, ou nascimento de conceitos pequenos para a idade gestacional,

descritos em estudos com bovinos onde a fertilização assistida é amplamente utilizada.¹⁹ 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 diminuíram as taxas de sucesso.¹⁸

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 clamídia 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 253,7nm para obter rápida descontaminação microbiana antes da evaporação completa do nitrogênio líquido, estudo de Parmegiani et al. (2010)²⁶ encontrou eficácia para bactérias (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) e fungos (*Aspergillus niger*), 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 estreptomicina, 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 sub condição 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 malformações 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 europeus,¹⁴ 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 malformação em fetos de bovinos.¹⁹ 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.

Financiamento

Fértil Diagnósticos, Instituto de Patologia Tópica e Saúde Pública.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

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;25:679-86, <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, McMorow J, Lennon B, Fawsey M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril*. 1996;66:776-80.
4. Cottell E, Lennon B, McMorow 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.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde [internet]. 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 jun 2014]. 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;11:162-76.
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;66:335-7.
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;8:569-73.
11. Klein JU, Missmer SA, Jackson KV, Orasanu B, Fox JH, Racowsky C. In vitro fertilization outcomes after transfer of embryos contaminated with yeast. *Fertil Steril*. 2009;91:294-329, 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. *Reprod Clim*. 1996;11:203-6.
13. Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;32: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;22:2243-8, 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;94:1181-8, 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 & Fac Med Univ Fed Rio Gd do Sul*. 2002;22:19-25.
17. Ribeiro BRF, Amaral WN, Sadoyama G. Investigação bacteriológica e micológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana. *Reprod Clim*. 2011;26:12-8.
18. Pelzer ES, Allan JA, Cunningham K, Mengersen K, Allan JM, Launchbury T, et al. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. *Hum Reprod*. 2011;26:1799-812, doi:10.1093/humrep/der108.
19. Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina Ci Agr*. 2006;27:289-98, doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2006v27n2p289>.
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;27:109-16, 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. *Anim Reprod Sci*. 2009;113:283-6, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.06.010.
22. Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, 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;15:662-6, 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;68:1-22.
24. Abeysundara 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;6:152-7, 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. *Fertil Steril*. 2012;97:1050-5, 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. *Fertil Steril*. 2010;94:1525-8, doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.089.
27. Campos CO, Bernuci MP, Vireque AA, Campos JR, Silva-de-Sá MF, Jamur MC, et al. Preventing microbial contamination during long-term in vitro culture of human granulosa-lutein cells: an ultrastructural analysis. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012;2012:152781, doi:10.5402/2012/152781.
28. Nikitina TV, Lebedev IN, Sukhanova NN, Sazhenova EA, Nazarenko SA. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors. *Fertil Steril*. 2005;83:964-72.
29. Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR, Cohen J. Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 2005;84:343-55.
30. Källén B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Otterblad PO. Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88:137-43, doi: 10.1002/bdra.20645.