

Sida y Hepatitis en Técnicas de Reproducción Asistida

AIDS & hepatitis in assisted reproductive techniques

Marques de Oliveira N, Rodríguez R.

Hospital Universitario de Canarias. Servicio de Ginecología/Obstetricia. Unidad de Reproducción Humana. Santa Cruz de Tenerife. España

Resumen

El número de parejas serodiscordantes ha ido rápidamente en aumento en los últimos años. Los avances en las terapias antirretroviral han permitido incrementar la expectativa de vida así como disminuir la morbimortalidad en la transmisión horizontal y vertical y como consecuencia el deseo de tener hijos. El virus del Sida está presente en el plasma seminal y en las células redondas del mismo, mientras que con el virus hepatitis C hay más controversia. Con relación al virus hepatitis B tenemos menos problema para tratarlo ya que hay vacuna efectiva contra este virus. Nosotros hemos hecho una revisión bibliográfica de los tres casos virales y las posibles formas de tratarlos con Técnicas de Reproducción Asistida.

Palabras clave: HIV. Hepatitis B y C. fertilización in vitro.

Summary

In recent years, a increasingly number of serodiscordant couples has been observed. Advances in antiretroviral therapies have allowed to enhance life expectancy, and to decrease morbimortality in both horizontal and vertical transmission, and as a consequence of that, the desire of having a son. AIDS virus is present in the seminal plasma and in its round cells, while Hepatitis C virus is much more controversial to figure out. Regarding to Hepatitis B virus, it is simpler to deal with since there is an effective vaccine. We have undergone a bibliographic review concerning to these three viral situations, and their possible methods of treatment by Assisted Reproduction Techniques.

Key words: VIH; Hepatitis B and C, In vitro Fertilization.

Correspondencia: Dra. Neuda Marques de Oliveira
C/ Fernando Primo de Rivera nº 99
38006 Santa Cruz de Tenerife.
neudam@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

A partir del conocimiento de la transmisión del VIH a través de la vía sexual, los especialistas en Infertilidad se han enfrentado al riesgo de contagio por medio de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

Cuando comenzaron a publicarse casos de mujeres infectadas a partir de la inseminación artificial con el semen de donante, comenzó a sistematizarse la realización de pruebas para identificar anticuerpos de VIH en el plasma sanguíneo de los donantes. El análisis se repetía a los 6 meses en la misma muestra que se había criopreservado, antes de decidir el procedimiento para su utilización.

En España, la incidencia anual de casos de SIDA fue en aumento hasta mediados de los noventa. Así, en 1994 se produjo el punto de máxima incidencia, y a partir de 1996 la extensión de los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia dieron lugar a una caída del 28%, produciéndose un descenso todas las categorías de transmisión: Homosexuales, Heterosexuales, Transmisión Vertical y Adicción a Drogas por Venopunción (ADVP).

En cuanto a casos pediátricos, el 91% ocurren por transmisión vertical. El mejor predictor de la transmisión vertical del VIH es la carga viral materna. Se ha visto que con cargas de 1000 VIH-RNA copias/ml, el porcentaje de transmisión es del 2%, del 11% para 10.000 copias/ml, y del 40% para 100.000 copias/ml. Por tanto, para evitar la transmisión efectiva, una carga viral indetectable en el momento del parto sería lo ideal en la gestante.

La transmisión de la Hepatitis C es predominantemente parenteral (1), aunque se ha detectado el virus RNA en saliva y en fluido seminal. Por tanto, la transmisión por relación sexual o por exposición familiar es aún controvertida (2). Hay autores que han sido incapaces de detectar el virus RNA en el plasma seminal (3, 4), mientras que otros claramente han demostrado su presencia en el semen (5, 6).

El número de parejas serodiscordantes ha ido rápidamente en aumento en los últimos años (7). Además, los avances en terapia antirretroviral han permitido incrementar la expectativa de vida. Asistimos pues a una disminución franca de la morbimortalidad y de la transmisión horizontal y vertical desde la aplicación de estas terapias, (8) y, como consecuencia de ello, -en muchos casos-, el desear tener un hijo.

Las investigaciones realizadas para entender los factores que influyen en la infectividad del semen no

se han desarrollado hasta hace pocos años. Se ha utilizado cultivos virales y ensayos de PCR para detectar el virus en los distintos compartimentos, tanto en células seminales como en el plasma seminal. Los resultados de cultivos de tejidos fueron positivos entre el 9 y el 55% de muestras de líquido seminal. La forma proviral del VIH se detectó por PCR con índices similares en células seminales no seleccionadas, (9, 10) y más frecuentemente en fracciones enriquecidas de linfocitos y monocitos (11), así como en el núcleo de células germinales en todos los estadios de su diferenciación.

El RNA viral puede cuantificarse por RT-PCR, detectándose con frecuencia en la mayoría de los hombres seropositivos (12). El plasma seminal humano contiene inhibidores de la reacción de PCR, lo cual puede alterar el resultado de la detección y cuantificación del RNA viral (13).

La detección del VIH en el semen puede asociarse a leucocitos seminales, inflamación uretral, uretritis gonocócica, depleción de linfocitos T CD4+ en sangre periférica, o a un estadio clínico avanzado. Se relaciona en forma inversa con la terapia antirretroviral, y con todos factores que influyen en la transmisión sexual.

Se ha constatado una falta de asociación entre cultivos positivos en semen y cuantificación del RNA viral en sangre. (14) Igualmente existen evidencias de una distribución discordante del fenotipo viral y una débil correlación entre niveles del RNA en semen y niveles de linfocitos T CD4+, o incluso diferencias entre niveles de RNA detectados y la respuesta a las drogas antirretrovirales (13). Sin embargo, hay estudios que demuestran que los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia pueden reducir los niveles de la carga viral en el semen hasta valores no detectables (15, 16).

En el análisis de la cantidad de virus en fracciones celulares del semen en 52 individuos seropositivos se encontró que la carga viral del plasma seminal se correlaciona significativamente con la carga viral en sangre periférica y con el recuento de células CD4. Se puede distinguir 2 grupos: 1º) aquél cuyos niveles de virus en plasma seminal son más bajos que en sangre periférica; 2º) aquél cuyos niveles de virus en plasma seminal son iguales o más elevados que en sangre periférica. En este segundo grupo se detectó el virus en el 100% de las células seminales (espermatozonias y espermatozoides), en tanto que sólo en el 40% del primer grupo. Estos resultados sugieren que algunos hombres podrían tener un alto potencial para transmitir sexualmente el VIH, lo cual podría revelar una posible producción independiente del virus en el

tracto genital. El semen de los hombres infectados podría contener altos niveles de VIH, y dichos virus infectantes podrían ser recuperados de las células seminales o del plasma seminal (17, 18).

Las células seminales son mezclas de espermatozoides precursores de células germinales, linfocitos, macrófagos y células epiteliales. En varios de estas células se ha detectado el provirus del VIH (18, 19).

Las células germinales -tales como las espermatogonias y su progenie- pueden asimismo contener provirus, aunque las secuencias de éstos en aquéllas pueden encontrarse defectuosas o incompletas. Las células germinales no tienen moléculas CD4 en su superficie (20) y de alguna forma el virus no sería capaz de infectarlas, a menos que hubiera mecanismos de entrada independientes del CD4.

Los hombres VIH+ que están recibiendo tratamiento antirretroviral, aunque la carga viral en plasma sea negativa, el virus puede estar presente en las células seminales y es probable que incluso pueda transmitirse por vía sexual.

En algunas publicaciones se ha demostrado que a través del procesamiento del semen se logra disminuir los niveles de RNA y DNA del VIH, con lo cual se consigue reducir el riesgo de transmisión sexual por inseminación intrauterina en parejas serodiscordantes.

SITUACIONES A PLANTEARSE EN PAREJAS SERODISCORDANTES

Desde el principio de la epidemia se conoció la importante morbimortalidad en la mujer, con una incidencia global de transmisión vertical de un 25-30% sin tratamiento antirretroviral. Esto motivó que la mayoría de los ginecólogos y biólogos que trabajaban en TRA se negasen en tratar mujeres no fértiles.

Desde 1994 se conoce el beneficio que se logra con la administración de AZT a la madre VIH+ durante el embarazo, durante el trabajo de parto y al recién nacido durante las 6 primeras semanas de vida. Esto ha supuesto una importante disminución de la incidencia de transmisión vertical al 8,3%.

Las nuevas estrategias terapéuticas que han ido apareciendo con el desarrollo de otras drogas antirretrovirales, así como su asociación, junto con la implementación de la cesárea programada antes de que se inicie el trabajo de parto o antes de la ruptura de las membranas ovulares, han sido de enorme eficacia en cuanto a seguridad para evitar la transmisión. Esto último, en madres VIH+ que reciben AZT ha reducido la transmisión vertical a un 0,8%.

Cada vez con mayor frecuencia, la población VIH+ que desea tener hijos sin contagiar a su pareja ni al producto de la concepción defienden los argumentos expuestos, lo que pone en evidencia cuestiones éticas dirigidas desde los pacientes a la comunidad médica. Estas cuestiones se basan en que no hay en la mujer VIH+ razones para discutir una procreación asistida para reducir el riesgo de transmisión vertical, pues se relaciona fundamentalmente con el periodo perinatal y durante el parto mismo, destacando lo importante que es evitar el contagio al hombre.

1) Mujer VIH+ / Hombre VIH-

Los métodos por los cuales se puede lograr el embarazo en esta situación, siempre y cuando la mujer sea fértil, son el coito programado y la inseminación vaginal. Para las dos técnicas se requiere detectar previamente el momento de la ovulación de la paciente.

El coito programado se refiere a las relaciones sexuales sin protección durante el periodo fértil. Las posibilidades de embarazo con este método es de solamente 16%, lo que nos llevaría a continuar intentando en caso de no obtener embarazo, favoreciendo con ello el contagio. Asimismo, debe tenerse en cuenta que con este método se utiliza semen no procesado, y debemos asegurarnos que las parejas que opten por él sean fértiles.

La inseminación intravaginal consiste en depositar el semen en la vagina con un capuchón de plástico para su retención. También se puede instruir a la pareja para que ellos mismos realicen este procedimiento. Este es el método de elección, ya que no representa ningún riesgo de transmisión al varón VIH negativo.

2) Mujer VIH- / Hombre VIH+

En las parejas serodiscordantes con el hombre VIH+ hay razones que podrían justificar una inseminación artificial intrauterina, ya que el virus está presente tanto en plasma seminal como en células seminales. También se ha demostrado que el esperma de hombres infectados puede transferir partículas VIH-like (VIH like particles) al ovocito humano in vitro (21). Aún no se ha descrito la transmisión vertical directa de un hombre infectado a su hijo. Por lo tanto, el propósito principal es evitar la transmisión horizontal del hombre infectado a su pareja durante la concepción.

En 1992, Seprini et al. (22), demuestran que por el método de gradiente de centrifugación seguido por swim-up se eliminaban eficientemente las células in-

fectadas del semen de varones VIH+. Otros estudios demostraron también que mediante el lavado con gradiente de Percoll del semen se lograban niveles indetectables de RNA extracelular y provirus en relación con las muestras prelavadas (23).

Seprini et al (1992), realizaron inseminaciones artificiales con esperma aislado del plasma seminal en 29 parejas, y obtuvieron 17 embarazos de 59 inseminaciones con espermatozoides seleccionados por gradiente de centrifugación y swim-up. No observaron seroconversiones de madres o hijos. Recientemente, este mismo grupo ha publicado unos resultados similares (24). Marina S. et al (1998) utilizaron el mismo método de preparación de esperma para 101 inseminaciones, de las cuales se obtuvo 31 embarazos sin detectar contagio en las madres o los hijos (25). En este estudio se comprobó la presencia de RNA y de DNA del VIH en la fracción de espermatozoides móviles después del lavado, y fue positiva en seis casos en los cuales no se realizó la inseminación. Estos resultados demostraron la importancia de una detección precisa del virus en la población de esperma.

CARGA VIRAL EN SEMEN

La seguridad en el test de la población de semen inseminado puede depender de la sensibilidad del método usado para detectar el virus. Para Seprini et al, el umbral de detección fue de 800 copias/ml, mientras que para Marina et al fue de 200 copias/ml.

Hace falta umbrales de detección más bajos para asegurarse de que el riesgo de contagio sea mínimo. Dado que entre una y otra muestra podría haber una gran variabilidad de detección del virus, y como la cantidad de virus presente en el semen puede reducirse en gran medida por los tratamientos antirretrovirales, sería recomendable seleccionar una muestra de esperma libre de virus del hombre infectado después de un tratamiento. De todas maneras, no es posible asegurar que las partículas virales estén ausentes en el semen por las limitaciones en la sensibilidad de los ensayos del laboratorio.

Según Seprini et al, el riesgo teórico de infección del VIH por inseminación es menor de 1/1421 procedimientos y 1/1216 embarazos, mientras que la concepción espontánea representa en la mujer VIH- un riesgo que llega hasta el 4% (24).

En el caso de que la pareja presente factores de esterilidad masculino y femenino, y que demanden una TRA, la muestra de semen se procesará de la misma manera descrita previamente.

HEPATITIS B Y C EN TRA.

La existencia de una vacuna frente a la hepatitis B facilita la actitud a tomar en parejas con deseos reproductivos serodiscordantes.

1) Hombre HB+ / Mujer HB-. En el caso de que el varón sea seropositivo, la vacunación a la mujer prevendría la transmisión de la enfermedad.

2) Hombre HB- / Mujer HB+. En caso de que la mujer es la seropositiva, la transmisión vertical va a depender de la actividad de la enfermedad, siendo del 2-15% en mujeres AgHBs+ AgHBe- DNA VHB-, y asciende hasta 80-90% en mujeres AgHBs+ AgHBe+ DNA VHB+. Por esto, la actitud más correcta a tomar sería retrasar la aplicación de la TRA hasta que la carga viral sea baja, además de hacer inmunoprolaxis del recién nacido. Cuando los dos miembros de la pareja son AgHBs+, existe la posibilidad -aunque rara- de reinfección por otros subtipos de VHB, por lo que es recomendable la aplicación de TRA en estas parejas con deseo reproductivos.

1) Parejas serodiscordantes al virus de la hepatitis C (VHC) con deseo reproductivos debemos valorar siempre el estado de la enfermedad. Así, en el caso de un varón seropositivo a VHC y mujer seronegativa, y dado que al contrario que con el VHB no disponemos de una vacuna, se hace necesario un adecuado procesamiento del semen previo a su uso en TRA (swim-up, gradiente de densidad y comprobación mediante PCR de la ausencia de VHC RNA en la muestra a utilizar), ya que se encuentra VHC RNA en el semen del 5% de varones seropositivos. La presencia en semen del VHC depende de la carga viral sérica del paciente, siendo rara su presencia en semen de varones con menos de un millón de copias/ml. Por este motivo, algunos autores aconsejan realizar en varones con mayor número de copias un tratamiento previo a la TRA.

La transmisión vertical en mujeres seropositivas depende de la carga viral, y ocurre principalmente durante el parto. En mujeres HCV RNA-, la transmisión es <1%; en mujeres con menos de un millón de copias es del 0-5%; y con más de un millón de copias, del 10-20%. Por esto se recomienda que en caso de parejas con deseo reproductivos y en los que es necesario realizar TRA, en los cuales la mujer es VHC RNA+ con más de un millón de copias/ml, se debe consultar a un hepatólogo con la idea de instaurar algún tratamiento que disminuya la carga viral, y una vez conseguido este objetivo, se realice la TRA.

2) **Parejas en que los dos miembros son seropositivos VHC+**, dada la alta variabilidad genética del VHC en un mismo individuo y la existencia de varios subtipos de VHC, existe la posibilidad de reinfección de algún miembro de la pareja, por lo que debería recomendarse la aplicación de TRA con las medidas ya comentadas.

TRANSMISIÓN A TERCEROS

Cuando se trata a individuos seropositivos mediante TRA, existe la posibilidad de transmisión a otros pacientes sometidos a dichas técnicas en dos momentos: durante la crioconservación de semen o embriones, y durante la recuperación ovocitaria. La primera no se ha descrito en Reproducción, pero sí la transmisión de hepatitis B en medula ósea criopreservada en nitrógeno líquido (26).

En caso de tener que almacenar muestras de individuos seropositivos se debe realizarlo en bombonas individuales para la enfermedad infecciosa. El riesgo de contaminación es igual en criotubos que en pajuelas. Cada determinado tiempo se debe vaciar y limpiar las bombonas (27).

Otro momento clave en la transmisión de enfermedades infecciosas es durante la punción folicular. Lesourd et al (28) han descrito la transmisión de hepatitis C a dos mujeres que fueron sometidas a punción folicular justo después de ser sometida a esta técnica una paciente con hepatitis C.

RIESGO DE TRANSMISIÓN AL PERSONAL SANITARIO

El riesgo de infección del personal del Laboratorio de Reproducción es 10 veces mayor que la población general y tres veces mayor que otros trabajadores sanitarios (29). El riesgo de infección tras una punción accidental es del 2-40% para la hepatitis B, 3-10% para la hepatitis C y del 0,2-0,5% para VIH (30).

La OMS (31) y la AFS (32) han editado guías y recomendaciones para el manejo de material biológico reproductivo. Es importante la vacunación frente a la hepatitis B de todo el personal sanitario. De igual modo, la AFS y el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Laboral de los EEUU han prohibido pipetear con la boca (33). Actualmente hay otros métodos publicados para la detección del virus hepatitis C (34,35)

BIBLIOGRAFÍA

1. **Esteban R.:** Epidemiology of Hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 1993; 17: S67-71.
2. **Kotwal GJ, Rustgi VK, Baroudy BM.:** Detection of Hepatitis C virus-specific antigens in semen from non-A, non-B hepatitis patients. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 641-644.
3. **Seprini A.:** Reproductive counselling for VIH discordant couples. *Lancet* 1997; 349: 1401-1402.
4. **Caldwell SH, Sue M, Bowden JH, Dickson RC, Driscoll CJ, Yeaton P, Stevenson WC, Ishitani MB, McCullough CS, Pruett TL, Lovell MA.:** Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. *Liver Transpl. Surg.* 1996; 2: 124-129.
5. **Levy R, Tardy JC, Bourlet T, Cordonier H, Mion F, Lornage J, Guerin JF.:** Transmission risk of hepatitis C virus in Assisted Reproduction Techniques. *Hum. Reprod.* 2002; 15: 810-816.
6. **Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J.:** Detección del virus de la Hepatitis C en semen lavado de varones seropositivos para su posterior uso en reproducción asistida. Resultados preliminares. *Actualidad Andrológica* 2001; 9 (2-3): 56-60.
7. **Joanne P, Dulioust E, Kunstmann JM, Tachet A, Heard I, Salomón D.:** Management of fertile and infertile VIH positive patients wanting to become parents. *Fertility and Reproductive Medicine* 1998, 487-94.
8. **Paella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD.:** Declining morbidity and mortality among patients with advanced Human Immunodeficiency Virus infection. *N. Engl. J. Med* 1998; 338:853-60.
9. **Van Vorhis BJ, Martínez A, Mayer K, Anderson DJ.:** Detection of human immunodeficiency virus type I in semen from seropositive man using culture and polymerase chain reaction deoxyribonuclei acid amplification technique. *Fertil Steril* 1991; 55:558-94.
10. **Xu C, Politch JA, Tucker L, Mayer KH, Seage JR, Anderson D.:** Factors associated with increased levels of human immunodeficiency virus type 1 DNA in semen. *J Infect Dis* 1997; 176: 941-947.
11. **Mermin JH, Holodnig M, Katzenstein DA, Merigan TC.:** Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by polimerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 164: 769-772.
12. **Rostad SB, Kreiss JK.:** Shedding of VIH in the genital tract. *AIDS* 1996; 10:1305-1315.
13. **Coombs RW, Speck CE, Hughes JP, Lee W, Sampoleo R, Ross SO, Dragavon J, Peterson G, Hooton TM, Collier AC, Corey L, Koutsky L, Krieger JN.:** Association between culturable human

- immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and VIH-1 levels in semen and blood. Evidence for compartmentalization of VIH-1 between semen and blood. *J. Infect Dis* 1998; 177: 320-330.
14. **Bradley J, Van Voorthis MD, Martinez A, Mayer K, Anderson DJ.:** Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen from seropositive men using culture and polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid amplification techniques. *Fertil Steril* 1991; 55: 588-594.
 15. **Vernazza PL, Gilliam BL, Flepp M, Dyer Jr, Frank AC, Fiscus SA, Cohen MS, Eron JJ.:** Effect of antiviral treatment on the shedding of VIH-1 in semen. *AIDS* 1997; 11: 1249-1254.
 16. **Vernazza PL, Gilliam BL, Dyer J, Fiscus SA, Eron JJ, Frank AC, Eron JJ, Frank AC, Cohen MS.:** Quantification of VIH in semen correlation with antiviral treatment and status. *AIDS* 1997; 11: 987-993.
 17. **Hamed KA, Winters MA, Holodny M, Katzenstein DA, Merigan TC.:** Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen: effects of disease stage and nucleoside therapy. *J Infect Dis* 1993; 167: 798-802.
 18. **Krieger JN, Coombs RW, Collier AC, Ross SO, Chaloupka K, Cummings DK, Murphy VL, Corey L.:** Recovery or antiviral chemotherapy. *J Infect Dis* 1991; 163: 386-388.
 19. **Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, Anderson DJ.:** T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 1997; 176: 960-968.
 20. **Gil T, Castilla JA, Hortas ML, Molina J, Redondo M, Samaniego F, Garrido F, Vergara F, Herruzo A.:** CD 4+ cells in human ejaculates. *Human Reprod.* 1995; 10: 2923-2927.
 21. **Bacceti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodel G, Ceccarini EC, Crisa N, Di Caro A, Estenoz M, Garbuglia AR, Massacesi A.:** VIH particles in spermatozoa of patients in the AIDS and their transfer into the oocyte. *J Cell Biol* 1994, 127: 903-914.
 22. **Seprini AE, Levy-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, Albani E, Oneta M, Pardi G.:** Insemination of VIH negative women with processed semen of VIH positive partners. *Lancet* 1992; 340: 1317-1319.
 23. **Lasheeb AS, King J, Ball JK, Curran R, Barratt CL, Afnan M, Pillay D.:** Semen characteristics in VIH positive men and the effect of semen washing. *Genitourinary Medicine* 1997; 73: 303-305.
 24. **Seprini AE, Fiores S, Castagna C.:** Assisted reproduction in VIH discordant couples. *ESHRE Meeting Hum Reprod* 1998; 136 Abstract 14.
 25. **Marina S, Marina F, Alcolea R, Exposito R, Huguet J, Nadal J, Verges A.:** Human immunodeficiency virus type 1—serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1998; 70: 35-39.
 26. **Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG.:** Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-140.
 27. **Steyaert SR, Leroux-Roels GG, Dhont M.:** Infections in IVF: review and guidelines. *Human Reprod Update* 2000; 6: 432-441.
 28. **Lesourd F, Izopet J, Mervan C, Payen JL, Sandres K, Monrozier X, Parinaud J.:** Transmissions of hepatitis C virus during ancillary procedures for assisted conception. *Human Reprod* 2000; 15: 1083-1085.
 29. **Sewell DL.:** Laboratory associated infections and biosafety. *Clin Microbiol Rv* 1995; 8: 389-405.
 30. **Gerberding JL.:** Management of occupation exposures to bloodborne viruses. *N Engl J Med* 1995; 332: 444-451.
 31. **WHO.:** Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University 1999.
 32. **American Fertility Society.:** Guidelines for human embryology and andrology laboratories. *Fertil Steril* 1992; 58 supplement.
 33. **Gerrity M.:** Levilative efforts affecting the reproductive biology laboratory. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1993; 5: 623-629.
 34. **Papaxanthos-Roche A, Trimoulet P, Commenges-Ducos M, Hocke C, Fleury HJ, Mayer G.:** PCR-detected hepatitis C virus RNA associated with human zona-intact oocytes collected from infected women for ART. *Hum Reprod.* 2004 May; 9 (5):1170-5.
 35. **Cassuto NG, Sifer C, Feldmann G, Bouret D, Moret F, Benifla JL, Porcher R, Naouri M, Neuraz A, Alvarez S, Poncelet C, Madelenat P, Devaux A.:** A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Hum Reprod.* 2002 Dec; 17 (12): 3153-6