

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

BARBARA ROSA FOIZER RIBEIRO

**Investigação bacteriológica e Micológica em placas de
cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana**

**Goiânia
2010**

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	Instituto de Patologia tropical e Saúde Pública	Sigla:	IPTSP
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ:
Título:	Investigação bacteriológica e Micológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana		
Palavras-chave:	Reprodução humana. Contaminação. Microbiológico. Laboratório. Placas de Cultivo. Embriões		
Título em outra língua:	Bacteriology and Mycology investigatin on culture dishes embryos in laboratories for human reproduction		
Palavras-chave em outra língua:	Reproduction. Microbial. Contamination. Laboratory. Embryos. Culture Dishes		
Área de concentração:	Reprodução Humana		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	25 de agosto de 2010		
Programa de Pós-Graduação:	Mestrado em ciências da saúde		
Orientador (a):	Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral		
E-mail:	waldemar@sbus.org.br		
Co-orientador (a):	Prof. Dr Geraldo Sadoyama		
E-mail:	gsadoyama@yahoo.com.br		

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: 25/ 08 / 2010

Assinatura do (a) autor

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

BARBARA ROSA FOIZER RIBEIRO

Investigação bacteriológica e Micológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Sadoyama

**Goiânia
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

R484i Ribeiro, Barbara Rosa Foizer.
Investigação microbiológica e análise qualitativa de achados bacteriológicos e micológicos em placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana [manuscrito] / Barbara Rosa Foizer Ribeiro. – 2010.
xv, 100 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral; Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Sadoyama.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de medicina, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Contaminação microbiológica 2. Placas de embriões 3. Laboratório de reprodução humana I. Título.

CDU:612.6

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

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno(a): Barbara Rosa Foizer Ribeiro

Orientador(a): Dr. Waldemar Naves do Amaral

Co-Orientador(a): Dr. Geraldo Sadoyama

Membros:

1. Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral

2. Prof. Dr. Rui Gilberto Ferreira

3. Prof. Dr. Délio Marques Conde

OU

4. Prof. Dr. Mário Aprobato

5. Prof. Dr. Geraldo Sadoyama

Data: 25/08/2010

*Dedico esta dissertação à minha família de origem, meu Pai **Ederli Foizer**, minha mãe **Elza M^a Rosa Foizer**, além de meu irmão **Edgar Rosa Foizer**.*

*Ainda de maneira relevante esta dedicatória para meu esposo **Wellington Ribeiro de Sousa** e meu filho **Arthur Foizer Ribeiro**.*

*Também a consideração para com **Dona Alda (Maria Nascimento Moraes de Araújo)** pelos 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 meu de trabalhar com Reprodução Humana. A ele minha eterna gratidão e admiração.

Ao meu marido, que me incentivou neste trabalho e me ajudou nos momentos em que pensei que não iria conseguir concluir este mestrado. Ele foi meu consultor para assuntos tecnológicos. Ao meu filho Arthur, por infinitas horas abdicadas da sua presença, 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. Geraldo Sadoyama por me orientar na coleta e análise das amostras. Em especial à Dra. Leda Maria A. Valadão e Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Pereira (IPTSP-UFG) por me orientar na identificação das amostras contaminadas, e sua grande disposição a meu favor. Ao aluno de doutorado do ICB-UFG Daniel Teixeira, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Às clínicas Fértil diagnósticos, Fêmeina e Hospital das Clínicas, às embriologistas Lilian de Fátima Filetti Gomes, Jucyara do Valle Lima, Jane Porfírio Rocha, Tatiana Moreira da Silva e Mônica Canêdo Silva Maia, 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. Délio Marques Conde, 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.....	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão da literatura.....	3
1.1.1 Legislação vigente.....	3
1.1.2 Principais fontes de contaminação.....	5
1.1.3 Consequências.....	7
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3 METODOLOGIA.....	10
3.1 Testes bioquímicos.....	12
4. PUBLICAÇÕES.....	16
4.1 ARTIGO 1.....	17

4.2 ARTIGO 2.....	26
4.3 ARTIGO 3.....	44
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
7. ANEXOS.....	71
7.1 Anexo 1 - Documento de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.....	71
7.2 Anexo 2 - Figuras.....	72
7.3 Anexo 3 - Esquemas.....	75
7.4 Anexo 4 - Normas da SBRH e RBGO	77

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1	(Artigo 2) Distribuição dos Microrganismos isolados dos meios de cultivo de embriões, no laboratório de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010.....37
Tabela 2	(Artigo 2) Comparação da distribuição dos microrganismos isolados e identificados, neste estudo (Goiânia-2009/2010) e no de Kastrop et al (2007).....41
Tabela 1	(Artigo 3) Distribuição dos Microrganismos isolados dos meios de cultivo de embriões, no laboratório de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010..... 56
Tabela 2	(Artigo 3) Distribuição dos casos da pesquisa microbiológica, realizadas em laboratórios de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010, segundo os microrganismos identificados.....57
Tabela 3	(Artigo 3) Porcentagem de contaminação em proporção ao número de amostras de cada laboratório de reprodução humana, Goiânia-GO.....57
Tabela 4	(Artigo 3) Comparação da distribuição dos microrganismos isolados e identificados, neste estudo (Goiânia-2009/2010) e no de Kastrop et al.....61
Figura 1	Louise Brown, nascida em 25 de julho de 1978, representa marco inicial da fertilização in vitro humana, quando bebê e atualmente.....2
Figura 2	Contêiner para nitrogênio líquido, à esquerda, microscópio invertido, ao centro, Câmara de fluxo à direita, maquinários adequados para o uso em laboratórios de micromanipulação e criopreservação (reprodução humana).....4
Figura 3	Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” á esquerda e modo “microgotas”, à direita.....10
Figura 4	Meios de cultivo (Caldo BHI em amarelo), em preparação, posteriormente tampado para esterilização.....12
Figura 5	Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de bactérias bastonetes gram negativos,

	laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.....	14
Figura 6	Colônias de <i>Klebsiella sp</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas sp</i> , respectivamente.....	15
Figura 7	Colônias de leveduras, à esquerda, de coloração branca.....	15
Figura 1	(Artigo 2) Louise Brown, nascida em 25 de julho de 1978, representa marco inicial da fertilização in vitro humana, quando bebê e atualmente.....	29
Figura 2	(Artigo 2) Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” à esquerda e modo “microgotas”, à direita.....	33
Figura 3	(Artigo 2) Meios de cultivo (Caldo BHI em amarelo), em preparação, posteriormente tampado para esterilização.....	34
Figura 4	(Artigo 2) Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de bactérias bastonetes gram negativos, laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.....	36
Figura 5	(Artigo 2) Colônias de <i>Klebsiella SP</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas sp</i> , respectivamente.....	37
Figura 6	(Artigo 2) Comparação entre embriões humanos saudáveis (à esquerda) e embriões ruins de classificação R.....	38
Figura 1	(Artigo 3) Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” à esquerda e modo “microgotas”, à direita.....	51
Figura 2	(Artigo 3) Meio de cultivo (Caldo BHI em amarelo), em preparação, posteriormente tampado para esterilização.....	53
Figura 3	(Artigo 3) Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de bactérias bastonetes gram negativos, laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.....	53
Figura 4	(Artigo 3) Colônias de <i>Klebsiella SP</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas sp</i> , respectivamente.....	56
Figura 5	(Artigo 3) Colônias de leveduras, à esquerda, de coloração branca.....	56
Figura 6	(Artigo 3) Comparação entre embriões humanos saudáveis (à esquerda) e embriões ruins de classificação R.....	59

Gráfico 1	(Artigo 3) Distribuição dos casos da pesquisa microbiológica, realizada em laboratórios de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010.....	58
Anexo 1	Documento de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG - Hospital das Clínicas.....	71
Anexo 2	Figuras.....	72
Anexo 3	Esquemas.....	75
Anexo 4	Normas da Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia.....	77

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

IPTSP-UFG- instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- Universidade Federal de Goiás

LRH- laboratório de reprodução humana

HTF- human tubal fluid - Irvine Scientific

FIV- fertilização in vitro

IVF- meio de cultura – Vitro Life

ICSI- injeção intracitoplasmática de espermatozóides

NBR - Denominação de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT);

BCTG - Bancos de Células e Tecidos Germinativos

TAF - trílice açúcar ferro

SIM- enxofre, indol e motilidade

HBsAg - antígeno da hepatite B

HIV- vírus da AIDS

HTLV- vírus T-linfotrópicos humanos

BHI – Brain Heart Infusion

RBGO - Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

RCD – resolução do ministério da saúde

RESUMO

Introdução: Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e equipamentos. As principais causas desta contaminação vem sendo associadas à microbiota e infecção oportunista no trato genital masculino e feminino e conseqüente contaminação dos ovócitos e embriões dos pacientes. Também pode vir da contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo. **Objetivos:** Investigar a prevalência de microrganismos, bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões e identificar os organismos microbiológicos contaminantes, no nível de gênero e espécie, encontrados nas placas de cultivo de embriões, em laboratórios de reprodução humana. **Metodologia:** Coleta de 125 amostras de placas de cultivo de embriões humanos, após a transferência para o útero materno, em três laboratórios de reprodução humana na cidade de Goiânia-GO, no período de 2009 a 1º semestre de 2010. Os meios de cultivo foram inoculados em caldo BHI e incubados na estufa. As amostras que turvaram (positivaram) foram isoladas e identificadas. **Resultados:** Na amostragem de 125 placas de cultivo encontrou-se 6 contaminadas, e os microrganismos encontrados foram *Escherichia coli* (50%), *Klebsiella* sp (16,6%), *Pseudomonas* sp (16,6%), Levedura (16,6%). A *Escherichia coli* foi a bactéria de maior incidência, encontrada em 3 amostras. Embora os meios de cultura apresentem os antibióticos Penicilina G (IVF) ou Gentamicina (HTF), bastonetes gram negativos resistentes foram encontrados. **Conclusão:** Resultados com uma prevalência de 4,8% de contaminação, sendo os microrganismos encontrados e seu quantitativo por amostra: *Escherichia coli* (3), *Klebsiella* sp (1), *Pseudomonas* sp (1), Levedura (1).

Palavras-chave (descritores): Reprodução humana. Contaminação. Microbiológico. Laboratório. Placas de Cultivo. Embriões.

ABSTRACT

Introduction: Laboratories in Human Reproduction, quality control is crucial to the success of procedures. The correct implementation of procedures directly influence the results, especially because the vagina, the follicular fluid and semen can not be sterilized. A high degree of hygiene, cleanliness and disposal of the material must be observed to avoid contamination in the culture media and equipment. The main causes of this contamination has been associated with infection in male and female genital tract and subsequent contamination of oocytes and embryos of patients. Can also come from contamination of air, machinery and materials such as culture dishes. **Objectives:** of this study were the presence of market info bacteriological contamination and mycological culture dishes of human embryos and to identify the genus level. **Methodology:** 125 samples were collected from culture dishes human embryos after transfer to the uterus, in three laboratories of human reproduction in the city of Goiania-GO, in the period 2009 to first half of 2010. The culture media were inoculated in BHI broth and incubated in the greenhouse. Samples that clouded (positivist) were isolated and identified. **Results:** showed a prevalence of 4.8% of contamination and micro-organisms found were *Escherichia coli* (50%), *Klebsiella* sp (16.6%), *Pseudomonas* sp (16.6%), yeast (16.6%). The *E. coli* bacteria were of the highest incidence was found in three samples. Although the culture media provide the antibiotics penicillin G (IVF) or gentamicin (HTF), resistant Gram-negative rods were found. **Conclusion:** Results with a prevalence of 4.8% of contamination, and the microorganisms isolated and their amount per sample: *Escherichia coli* (3), *Klebsiella* sp (1), *Pseudomonas* sp (1), yeast (1).

Key-words (descriptors): Reproduction. Microbial. Contamination. Laboratory. Embryos. Culture Dishes.

1 INTRODUÇÃO

O decréscimo da fertilidade é um inevitável fato biológico, aliado 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 fertilização in vitro (Figura1). Na FIV, os embriões são formados e cultivados fora do corpo da mãe, em placas de cultivo, graças ao avanço dos meios de cultura, que oferecem os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento dos embriões, cultivados em 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 de cultivo, que interfere diretamente nas taxas de gestação.

Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados. Principalmente porque a vagina e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e 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 não é conhecida. Há um número limitado de publicações e reportagens de casos com este assunto (Cottell et al, 1996). Desde 1997, contaminações microbiológicas em meios de cultura tem sido rotineiramente registrados para contribuir na qualidade do sistema de manejo em reprodução humana,

o que compromete diretamente os resultados gestacionais em fertilização assistida (Cottell et al 1997). As principais causas desta contaminação vem sendo associadas à infecção no trato genital masculino e feminino e consequente contaminação dos ovócitos e embriões dos pacientes. Também pode vir da contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo.

Daí se estabelece a importância da pesquisa de micro-organismos em fertilização assistida durante a manipulação de gametas e embriões. Prioriza-se a identificação de micro-organismos (bactérias e fungos), quando ocorrer, em laboratórios de reprodução humana de alta complexidade.



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

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Legislação vigente

Segundo a legislação (RCD 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 micromanipulação 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 insuflamento 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 suprimento de ar filtrado 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. As incubadoras devem ser usadas para no máximo três pacientes. As menores estabilizam-se mais rapidamente, quando abertas e dentro, deve conter termômetros, verificados diariamente, assim como o CO². Incubadoras mais novas apresentam maior taxa de gestação (tratado de reprodução 2010). 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 certificada. Se necessário, os filtros 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).



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)

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, 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, de calibração, de limpeza e de emergência com condutas em caso de pane (com sistema de back-up elétrico para os principais equipamentos).

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 tratado com 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).

As bactérias também são muito encontradas no 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 pélvica pelo meio vaginal e também do ovócito (Teixeira et al 1996). Já 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 de 95% de eliminação efetiva de bactérias (Cottell et al, 1997). A Gonorréia e Doença Inflamatória Pélvica são causadas pela *Neisseria gonorrhoeae*, um diplococo gram-negativo, aeróbico facultativo (fermentador). A Uretrite Inespecífica, cujos patógenos associados são a *Chlamydia trachomatis*, o *Ureaplasma urealyticum* e o *Mycoplasma hominis*. A Sífilis, causada pelo *Treponema pallidum*. O Cancro Mole, causado pelo *Hemophilus ducreyi*. A Vaginose, por *Gardnerella*. *Gardnerella vaginalis* é causadora de vaginose e foi encontrada resistência a metronidazol e a doxaciclina, o que demonstra a vulnerabilidade da dependência de antibióticos (Larsen et al, 2001). O Linfogranuloma Venéreo, também pela *Chlamydia trachomatis*.

A principal doença fúngica encontrada é a Candidíase, pela levedura *Candida albicans*, presente nos meios de cultura. A interferência deste fungo no resultado do tratamento de infertilidade não é clara. “*Candida albicans* não afetou parâmetros espermáticos, mas aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida” (Burrello et al 2004). *Candida albicans* é um fungo muito encontrado entre os microorganismos 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.

“O resultado da fertilização in vitro não é necessariamente comprometido pela colônia de leveduras, mas é necessário um estudo sobre o possível efeito teratogênico sobre os embriões” (Ben Chetrit et al, 1996).

A contaminação também pode vir do ar. Isto por que nem todos os laboratórios trabalham com filtros de ar compatíveis com a descontaminação efetiva da sala de embriologia. Bactérias que são comumente encontradas

nestas condições correspondem principalmente ao gênero *Bacillus*, estreptobacilos gram-positivos de grande porte.

A técnica utilizada na reprodução assistida também interfere nas taxas de contaminação. “Não foram encontrados casos de contaminação em ICSI... a seleção de uma única injeção de 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 no óvulo, e pode trazer uma série de microorganismos para o embrião a ser desenvolvido nas placas. A técnica que envolve o gradiente de centrifugação do sêmen também diminui drasticamente a contaminação bacteriana (Nicholson et al, 2000).

Passos e colaboradores (2002) encontraram correlação entre infertilidade e vírus da hepatite C, que pode ser transmitido de uma mulher para outra pela contaminação transvaginal por equipamentos, ou dos pais para o conceito, recomendou 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.

A literatura mais recente descreve uma incidência de 0,67% de contaminação 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).

1.1.3 Consequências

A primeira consequência que se deve observar está na redução da formação de embriões viáveis para transferência. Burrelo et al (2004) relata que a *Candida albicans* aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida. Os embriões podem não sobreviver nas primeiras clivagens, apresentar teratogenia, ou simplesmente não conseguirem implantar no útero. Também pode causar síndromes e comprometer a saúde do feto, trazendo a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, nascimento de conceptos pequenos e defeituosos; fatos descritos em

estudos bovinos onde a fertilização assistida é amplamente utilizada (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 no 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 ovócitos e de transferência, por exemplo). A identificação microbiológica se faz necessária, uma vez que fornecerá dados que comprovem esta contaminação, o que vai nortear as mudanças necessárias nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais, também nos meios de cultivo de embriões, que na maioria dos fabricantes acrescentam o antibiótico gentamicina, para que haja proteção materno-fetal.

Como não há estudos longitudinais sobre doenças em qualquer fase do indivíduo ligadas a provável contaminação na fase embriológica em técnicas de reprodução assistida, torna-se difícil a atribuição da causa contaminação à consequência doença. 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, de gametas 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.

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, tanto in vitro quanto in vivo já que os índices de fertilidade natural na espécie humana parecem estar diminuindo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma pesquisa de microrganismos contaminantes em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana, com ênfase na investigação bacteriológica e micológica, na cidade de Goiânia, Estado de Goiás.

2.2 Objetivos Específicos

Da dissertação:

- Investigar a prevalência de microrganismos, bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana.

- Identificar os organismos microbiológicos contaminantes, no nível de gênero e espécie, encontrados nas placas de cultivo de embriões, em laboratórios de reprodução humana.

Dos artigos:

Artigo 1 - Levantar bibliografia sobre contaminação microbiológica em laboratório de Reprodução humana, e suas principais consequências.

Artigo 2 - Estabelecer a prevalência de contaminação microbiológica em laboratório de reprodução humana, em Goiânia, Goiás.

Artigo 3 - Investigar a prevalência de microrganismos e identificar os organismos microbiológicos contaminantes, no nível de gênero e espécie, encontrados nas placas de cultivo de embriões, em laboratórios de reprodução humana, em Goiânia, Goiás.

3 METODOLOGIA

Esta pesquisa, de corte transversal, realizou-se de forma qualitativa, com abordagem descritiva sobre a presença e o tipo de microorganismo em materiais que foram encontrados contaminação, nos laboratórios de Reprodução Humana, e também quantitativa, com resultados de prevalência. Houve coleta do meio de cultura após a transferência dos embriões para o útero, em três laboratórios de Reprodução Humana, Fértil diagnósticos, Fêmea e hospital das clínicas, em Goiânia. A escolha dos locais se deram por se tratarem de instituições privadas e pública, as três únicas instituições ativas em Goiânia.

Embriões foram cultivados em meio de cultura HTF (Human Tubal Fluid – Irvine Scientific) ou IVF (Meio de cultivo de embriões - Vitro Life). As placas podem ser preparadas com gotas periféricas com albumina a 5%, e coberta com óleo mineral (Sigma), mas há também o cultivo de embriões em placas que utilizam o modo “poças”, somente. Independente da suspeita de contaminação, todas as placas guardadas na incubadora foram utilizadas como amostra (Figura 3).

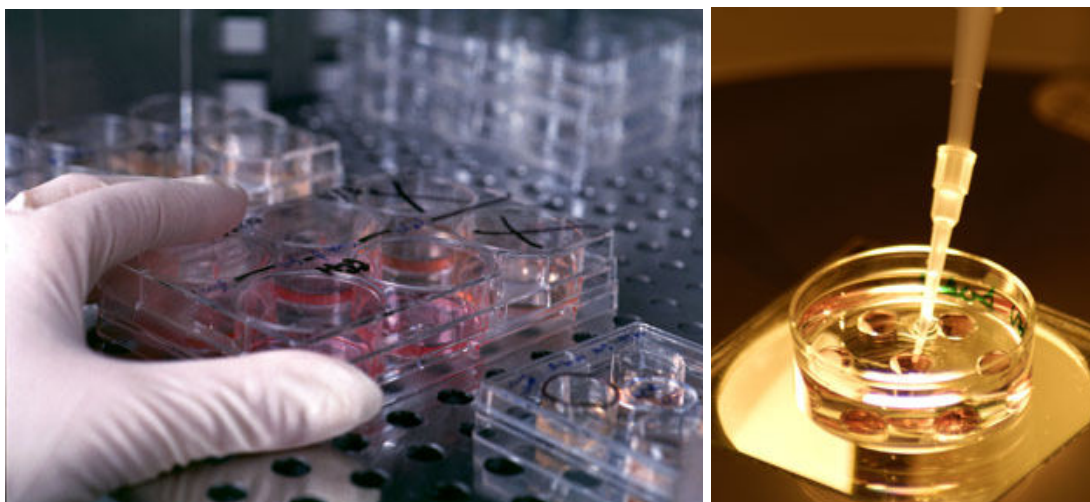


Figura 3 - Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” á esquerda e modo “microgotas”, à direita.

A coleta do material de estudo foi realizada entre maio de 2009 e maio de 2010, nas dependências das instituições citadas, de acordo com a disponibilidade do descarte de placas de embriões, e levadas ao laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG, aonde analisou-se, primeiramente, a presença de contaminação e posteriormente a identificação dos microorganismos das 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 contaminados, turvariam neste período dentro da estufa.

Depois de garantida a esterilização, as amostras foram coletadas com pipetas estéreis, também autoclavadas e embaladas isoladamente, inoculadas nestes tubos contendo 5 mL de Caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas por 16-20 horas a 37°C na estufa. Foi retirado todo o meio de cultura disponível, tanto nas placas contendo microgotas, quanto nas placas contendo “poças”. As amostras que positivaram no caldo BHI, foram posteriormente subcultivadas em Agar Nutriente (verificar crescimento de fungos), Agar Manitol Salgado (verificar crescimento de *Staphylococcus* e *Bacillus*) e Agar MacConkey (verificar o crescimento de bactérias Gram-negativas). As amostras isoladas foram identificadas através da caracterização morfotintorial (azul de lactofenol – fungos e coloração de Gram-bactérias). Para os cocos gram-positivos seriam realizados os testes de produção de catalase e coagulase. Nenhuma amostra foi encontrada. Para os bacilos gram-negativos foram realizados vários testes bioquímicos de identificação metabólica bacteriana.



Figura 4 - Meio de cultivo (Caldo BHI em amarelo), em preparação, posteriormente tampado para esterilização

3.1 Testes bioquímicos

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), (Figura 5).

As amostras em que foram encontradas contaminação foram coradas com método gram, em seguida separadas e subcultivadas no meios MacConkey, Ágar Manitol Salgado e Ágar Nutriente (Figura 6).

Na amostra contaminada por *Klebsiella*, 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 CO_2 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 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 reagente 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 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 Escherischia 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.

Na amostra contaminada por leveduras (Figura 7), houve crescimento no ágar nutriente com antibióticos, e no gram, foi observado a presença de células eucariontes, bastante coradas ao microscópio, unicelulares.

As amostras que apareceram com *Bacillus* gram positivos, 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 5 - Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de Bactérias bastonetes gram negativos, laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.

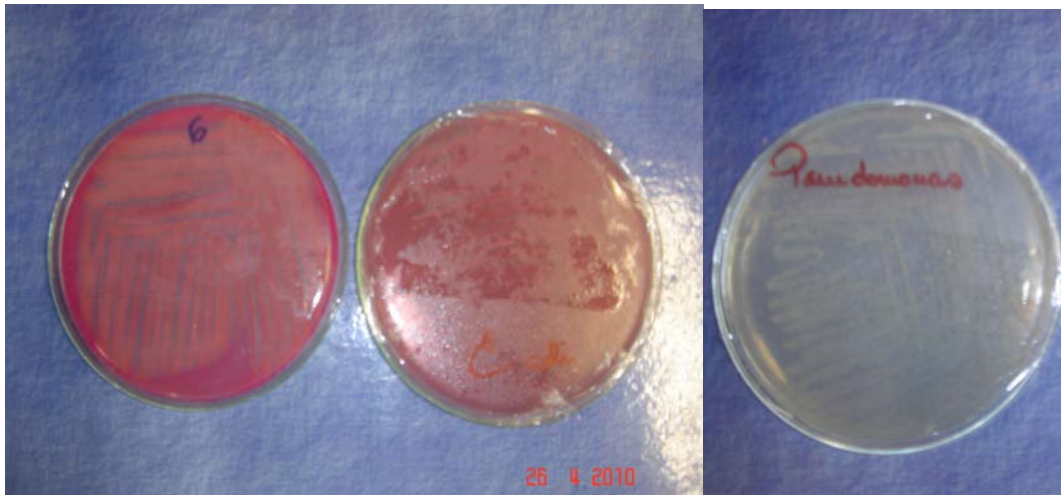


Figura 6 - Colônias de *Klebsiella SP*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp*, respectivamente



Figura 7 - colônias de leveduras, à esquerda, de coloração branca.

4 PUBLICAÇÕES

4.1 ARTIGO 1

4.2 ARTIGO 2

4.3 ARTIGO 3

4.1 ARTIGO 1

(Publicado pela revista reprodução e climatério- SBRH)

Título: Contaminação em laboratórios de Reprodução Humana
Contamination in human reproduction laboratories

Autores:

Waldemar Naves do Amaral

- Professor Doutor Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Goiás

- Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

Barbara Rosa Foizer

- Aluna do Mestrado de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás

Rua S-5, nº 262, apto.502, Ed. Arara Azul, Setor Bela Vista, Goiânia-GO

e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br

Unitermos

Contaminação, Reprodução Humana, Embriões

Resumo conciso

A contaminação em placas de embriões humanos cultivados em laboratórios de reprodução humana diminui substancialmente as taxas de gravidez na reprodução assistida.

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, má formação no feto e ainda comprometer a qualidade de vida da criança e seu desenvolvimento cognitivo. Fungicidas e bactericidas são acrescentados aos meios de cultura, na tentativa de conter este crescimento microbiológico. Caso haja contaminação, ela deve ser identificada, para nortear a reformulação dos agentes antimicrobianos usados em protocolos de segurança. Não há dúvidas que devem existir normas e procedimentos

rigorosamente protocolados, em legislação vigente, e executados para garantir a proteção materno fetal contra esta contaminação.

Abstract

The contamination may be present on the plates of growing embryos from multiple sources, considering that the materials collected male and female can not be sterilized. This contamination can compromise the viability of embryos, causing infection during pregnancy, fetal malformation and even compromise the quality of life of children and their cognitive development. Fungicides and bactericides are added to culture media in an attempt to contain this microbiological growth. If there is contamination, it must be identified to guide the reformulation of antimicrobial agents used in security protocols. There is no doubt that there should be strict rules and procedures filed in legislation, and implemented to ensure protection against maternal fetal contamination.

Possibilidade de contaminação

Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. Principalmente porque a vagina e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e 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⁽¹⁾. A exata frequência destas contaminações microbiológicas não é conhecida. Há um número limitado de publicações e reportagens de casos com este assunto⁽²⁾. Desde 1997, contaminações microbiológicas em meios de cultura tem sido rotineiramente registrados para contribuir na qualidade do sistema de manejo em reprodução humana, o que compromete diretamente os resultados gestacionais em fertilização assistida⁽³⁾. As principais causas

desta contaminação vem sendo associadas à infecção no trato genital masculino e feminino e consequente contaminação dos ovócitos e embriões dos pacientes. Também pode vir da contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo.

Daí se estabelece a importância da pesquisa de micro-organismos em fertilização assistida durante a manipulação de gametas e embriões. Prioriza-se a identificação de micro-organismos (bactérias e fungos), quando ocorrer, em laboratórios de reprodução humana de alta complexidade.

Legislação vigente

Segundo a legislação, RCD nº 33 de 17 de fevereiro de 2006⁽⁴⁾, 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 micromanipulação 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 insuflamento com filtros G3+carvão ativado+F8.

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 de 20°C negativos, apropriado para armazenamento de meios e reagentes; 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 liberados para uso.

A triagem sorológica deve ser realizada 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. 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.

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⁽⁵⁾.

Principais fontes de contaminação

Doenças do aparelho reprodutor masculino e feminino 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”⁽²⁾.

As bactérias também são muito encontradas no trato genital⁽³⁾. Já 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 de 95% de eliminação efetiva de bactérias⁽³⁾. A Gonorréia e Doença Inflamatória Pélvica são causadas pela *Neisseria gonorrhoeae*, um diplococo gram-negativo, aeróbico facultativo (fermentador). A Uretrite Inespecífica, cujos patógenos associados são a *Chlamydia trachomatis*, o *Ureaplasma urealyticum* e o *Mycoplasma hominis*. A Sífilis, causada pelo *Treponema pallidum*. O Cancro Mole, causado pelo *Hemophilus ducreyi*. A Vaginose, por *Gardnerella*. *Gardnerella vaginalis* é causadora de vaginose e

foi encontrada resistência a metronidazol e a doxaciiclina, o que demonstra a vulnerabilidade da dependência de antibióticos ⁽⁶⁾. O Linfogranuloma Venéreo, também pela *Chlamydia trachomatis*.

A principal doença fúngica encontrada é a Candidíase, pela levedura *Candida albicans*, presente nos meios de cultura⁽⁷⁾ A interferência deste fungo no resultado do tratamento de infertilidade não é clara. “*Candida albicans* não afetou parâmetros espermáticos, mas aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida”⁽⁷⁾. *Candida albicans* é um fungo muito encontrado 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.

“O resultado da fertilização in vitro não é necessariamente comprometido pela colônia de leveduras, mas é necessário um estudo sobre o possível efeito teratogênico sobre os embriões”⁽⁸⁾.

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

A técnica utilizada na reprodução assistida também interfere nas taxas de contaminação. “Não foram encontrados casos de contaminação em ICSI... a seleção de uma única injeção de espermatozóide pode reduzir o risco de contaminação”⁽⁹⁾. Para FIV a incidência de contaminação nas placas aumenta muito, já que a gota de sêmen sobreposta no óvulo, e pode trazer uma série de microorganismos para o embrião a ser desenvolvido nas placas. A técnica que envolve o gradiente de centrifugação do sêmen também diminui drasticamente a contaminação bacteriana ⁽¹⁰⁾.

Passos e colaboradores⁽¹¹⁾ encontraram correlação entre infertilidade e vírus da hepatite C, que pode ser transmitido de uma mulher para outra pela contaminação transvaginal por equipamentos, ou dos pais para o concepto, recomendou 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.

A literatura mais recente descreve uma incidência de 0,67% de contaminação 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 ⁽⁹⁾.

Consequências

A primeira consequência que se deve observar 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 pode causar síndromes e comprometer a saúde do feto, e mais tarde, na vida adulta, apresentarem modificações (especialmente no rendimento escolar) que comprometam sua qualidade de vida.

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 no 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 ovócitos e de transferência, por exemplo). A identificação microbiológica se faz necessária, uma vez que fornecerá dados que comprovem esta contaminação, o que vai nortear as mudanças necessárias nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais, também nos meios de cultivo de embriões, que na maioria dos fabricantes acrescentam o antibiótico gentamicina, para que haja proteção materno-fetal.

Não se pode afirmar que doenças do adulto sejam ligadas a provável contaminação na fase embriológica em técnicas de reprodução assistida, visto que existem muitas variáveis que interferem na qualidade de vida de um indivíduo fertilizado in vitro. Torna-se complicado estabelecer parâmetros para estudos assim, mas a qualidade dos embriões precisa ser preservada,

e mesmo que não possa ser comprovada, há evidência de infecção gestacional que prejudica a mãe e provoca má formação no feto.

Considerações finais

O entendimento sobre as possíveis contaminações, endógenas e exógenas, de gametas 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.

Apesar da contaminação por bactérias e fungos no ambiente laboratorial apresentar baixa prevalência, em média abaixo de 1%, para os laboratórios europeus ⁽⁹⁾, 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, tanto in vitro quanto in vivo já que os índices de fertilidade natural na espécie humana parecem estar diminuindo.

Referências

- (1) Elder K, Baker D, Ribes J. Infections, infertility and assisted reproduction. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.
- (2) Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawcys M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril.* 1996; 66:776–780.
- (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) Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde. *Resolução RDC nº 33, de 17 de fevereiro de 2006.* Aprova o Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos.
- (5) 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.* 2005; 11:162–176.

- (6) Larsen, BGR. Monif. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin. Infect.* 2001; Dis. 32: e 69-e77.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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 Reprod.* 2000; 15 (13): 662-666.
- (11) Passos EP, Silveira TR, Salazar CC, Facin AC, Souza CA, Guerin YL, Gratao AA et al. Hepatitis C virus infection and assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 2002; 17, 2085–2088.

4.2 ARTIGO 2

(Aceito pela revista Reprodução e climatério da SBRH)

Título: Prevalência e identificação de contaminação microbiológica em laboratórios de Reprodução Humana

Prevalence and identification of microbial contamination in human reproduction laboratories

Autores:

Waldemar Naves do Amaral

- Professor Doutor Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Goiás

- Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

Barbara Rosa Foizer

- Aluna do Mestrado de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás

Rua S-5, nº 262, apto.502, Ed. Arara Azul, Setor Bela Vista, Goiânia-GO

e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br

Unitermos

Contaminação microbiológica, Reprodução Humana, Embriões.

Resumo conciso

Contaminação microbiológica de bastonetes gram negativos e leveduras é encontrada nas placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana, em Goiânia-GO.

Resumo

Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e equipamentos. As principais causas desta contaminação vem sendo associadas à infecção no trato genital masculino e feminino e consequente contaminação dos ovócitos e embriões dos pacientes. Também pode vir da

contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo. Os objetivos deste estudo foram investigar a presença de contaminação bacteriológica e micológica nas placas de cultivo de embriões humanos e identificar ao nível de gênero. Na metodologia foram coletadas 80 amostras de placas de cultivo de embriões humanos, após a transferência para o útero materno, em laboratório de reprodução humana, na cidade de Goiânia-GO, no período de maio de 2009 a abril de 2010. Os meios de cultivo foram inoculados em caldo BHI e incubados na estufa. As amostras que turvaram (positivaram) foram isoladas e identificadas. Os resultados apresentaram uma prevalência de 3,75% de contaminação e os microrganismos encontrados foram *Klebsiella* sp (33,3%), *Pseudomonas* sp (33,3%), *Levedura* (33,3%). Embora o meio de cultura apresente o antibiótico Penicilina G (IVF), bastonetes gram negativos resistentes foram encontrados. É necessário um estudo que quantifique o grau de sensibilidade/resistência a vários antibióticos, das bactérias encontradas e também determine a toxicidade destes antibióticos para os embriões, avaliando vantagens e desvantagens.

Abstract

In Human Reproduction Laboratories, quality control is crucial to the success of procedures. The correct implementation of procedures directly influence the results, especially because the vagina, the follicular fluid and semen can not be sterilized. A high degree of hygiene, cleanliness and disposal of the material must be observed to avoid contamination in the culture media and equipment. The main causes of this contamination has been associated with infection in male and female genital tract and subsequent contamination of oocytes and embryos of patients. Can also come from contamination of air, machinery and materials such as boards of cultivation. The objectives of this study were the presence of market info bacteriological contamination and mycological culture plates of human embryos and to identify the genus level. In the methodology, we collected 80 samples of cards cultivation of human embryos, after transfer to the womb, in the laboratory of human reproduction, in Goiânia-GO, from May 2009 to April 2010. The culture media were inoculated in BHI broth and incubated in the greenhouse. Samples that

clouded (positivist) were isolated and identified. The results showed a prevalence of 3.75% of contamination and micro-organisms found were *Klebsiella* sp (33.3%), *Pseudomonas* sp (33.3%), yeast (33.3%). Although the culture medium produce the antibiotics penicillin G (IVF), resistant Gram-negative rods were found. We need a study to quantify the degree of sensitivity / resistance to various antibiotics, the bacteria found and also determine the toxicity of these antibiotics for embryos, evaluating advantages and disadvantages.

Introdução

O decréscimo da fertilidade com o passar do tempo é um inevitável fato biológico, aliado 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. O bebê Louise Brown foi o primeiro a nascer de fertilização in vitro (Figura 1). Na FIV, os embriões são formados e cultivados fora do corpo da mãe, em placas de cultivo, graças ao avanço dos meios de cultura, que oferecem os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento dos embriões, cultivados em 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 de cultivo, que interfere diretamente nas taxas de gestação.



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

Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e 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⁽¹⁾. A exata frequência destas contaminações microbiológicas não é conhecida. Há um número limitado de publicações e reportagens de casos com este assunto⁽²⁾. Desde 1997, contaminações microbiológicas em meios de cultura tem sido rotineiramente registrados para contribuir na qualidade do sistema de manejo em reprodução humana, o que compromete diretamente os resultados gestacionais em fertilização assistida⁽³⁾. As principais causas desta contaminação vem sendo associadas à infecção no trato genital masculino e feminino e consequente contaminação dos ovócitos e embriões dos pacientes. Também pode vir da contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo.

Daí se estabelece a importância da pesquisa de micro-organismos em fertilização assistida durante a manipulação de gametas e embriões. Prioriza-se a identificação de micro-organismos (bactérias e fungos), quando ocorrer, em laboratórios de reprodução humana de alta complexidade.

No entanto, nem vagina, nem um ejaculado podem ser considerados como ambientes estéreis⁽⁴⁾. Portanto, muito cuidado deve ser tomado para minimizar os riscos de transferência de microrganismos durante a realização de procedimentos clínicos ou laboratoriais. A maioria dos laboratórios de reprodução humana utiliza meios de cultura contendo antibióticos para minimizar os riscos de crescimento microbiano. Os meios de cultivo utilizados nos laboratórios de reprodução, e que foram coletados para pesquisa foram o IVF + 5% de albumina, que apresenta Penicilina G como antibiótico, e o HTF, que apresenta Gentamicina como antibiótico. Estes meios devem ser usados depois de equilibrada a atmosfera em 37°C e 5%

de CO². Não obstante, ocasionalmente, os microrganismos colonizam placas de cultivo de oócitos e embriões. A frequência exata destas contaminações ou infecções microbianas é desconhecida. O próprio número limitado de publicações e relatórios de como lidar com este assunto ^(3,5,6) poderia sugerir que as infecções nas placas de cultivo apresentam um risco insignificante. Foram relatadas placas com a contaminação de levedura, no total de 729 ciclos, prevalência de 0,69% ⁽⁸⁾ e seis casos onde a contaminação microbiológica da cultura de embriões médio foi observado após 1691 coletas de ovócitos, com prevalência de 0,35%⁽³⁾. Extrapolando essa frequência para o número de ciclos de fertilização in vitro realizados na Europa, resultados indicaram que só na Europa, muitas centenas de placas de cultivo de embriões contaminadas, provenientes de FIV, ocorrem a cada ano ⁽⁷⁾. Neste mesmo trabalho, ao longo de um período de 8 anos, 95 infecções em placas de cultivo in vitro foram observados após coleta de 13.977 amostras envolvendo placas e sêmens, com prevalência de 0,68%⁽⁷⁾. Técnicas diferentes em reprodução assistida possuem índice de contaminação diferentes. Na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) a taxa de contaminação foi desprezível mas na fertilização in vitro (FIV), o índice de contaminação aumenta ⁽⁴⁾.

A primeira consequência que se deve observar 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 pode causar síndromes e comprometer a saúde do feto, trazendo a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, nascimento de conceptos pequenos e defeituosos; fatos descritos em estudos bovinos onde a fertilização assistida é amplamente utilizada⁽⁹⁾.

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 no controle de qualidade devem ser sempre implementados 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 ovócitos e de transferência, por exemplo). A identificação microbiológica se faz necessária, uma vez que

fornecerá dados que comprovem esta contaminação, o que vai nortear as mudanças necessárias nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais, também nos meios de cultivo de embriões, que na maioria dos fabricantes acrescentam o antibiótico gentamicina, para que haja proteção materno-fetal.

Não se pode afirmar que doenças do adulto sejam ligadas a provável contaminação na fase embriológica em técnicas de reprodução assistida, visto que existem muitas variáveis que interferem na qualidade de vida de um indivíduo fertilizado in vitro. Torna-se complicado estabelecer parâmetros para estudos assim, mas a qualidade dos embriões precisa ser preservada, e mesmo que não possa ser comprovada, há evidência de infecção gestacional que prejudica a mãe e provoca má formação no feto.

Desde 1997, a contaminação microbiana do cultivo de placas de embriões tem sido rotineiramente registrados devido à implementação de um sistema de gestão da qualidade. Nos anos seguintes, um número crescente de infecções foram observadas.

Neste estudo, analisou-se a presença da contaminação microbiológica, bem as possíveis causas desta contaminação, na qual contaminações isoladas das placas de cultivo foram identificadas ao nível do gênero das espécies.

Metodologia

Esta pesquisa realizou-se de forma qualitativa, com abordagem descritiva sobre a presença e o tipo de microorganismo em materiais que foram encontrados contaminação, e também quantitativa, com índices de prevalência. Houve coleta do meio de cultura após a transferência dos embriões para o útero, em um laboratório privado de Reprodução Humana com alto índice de procedimentos mensais, em Goiânia-GO. Embriões foram cultivados em meio de cultura IVF - meio de cultura tamponado com albumina e penicilina G. As placas podem ser preparadas com gotas periféricas de IVF, e cobertas com óleo mineral (sigma). Há também o cultivo de embriões em placas que utilizam “poças” de IVF, somente (Figura 2). Independente da suspeita de contaminação, todas as placas guardadas na

incubadora foram utilizadas como amostra.

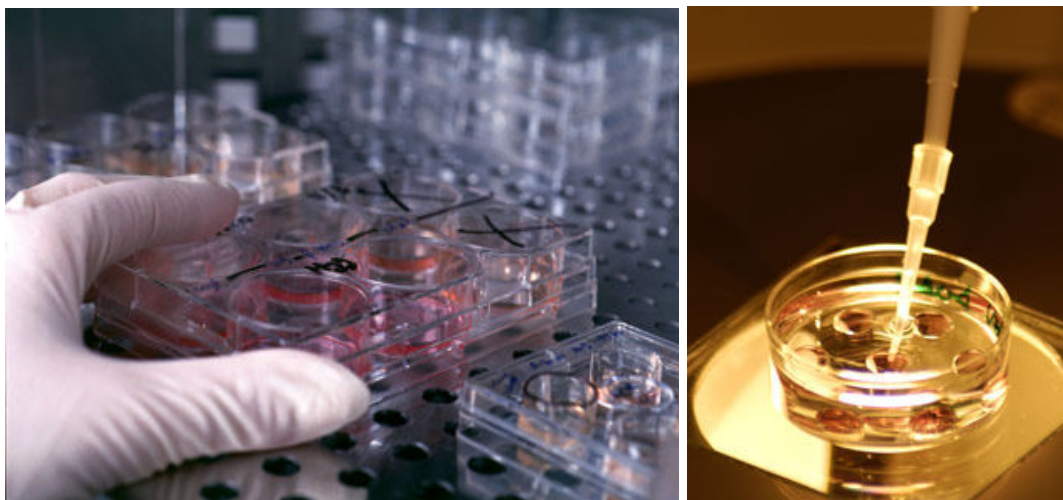


Figura 2 - Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” á esquerda e modo “microgotas”, à direita.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. A coleta do material de estudo foi realizada no decorrer do ano de 2009 e 1º semestre de 2010, nas dependências das instituições citadas, de acordo com a disponibilidade do descarte de placas de embriões, e levadas ao laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás), onde analisou-se primeiramente a presença de contaminação e posteriormente a identificação dos microorganismos das amostras. Para analisar a presença de contaminação, foi utilizado o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (Figura 3). 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 contaminados, turvariam neste período dentro da estufa. Depois de garantida a esterilização, as amostras foram coletadas no próprio ambiente dos laboratórios de reprodução humana. Cada coleta foi realizada utilizando a câmara de fluxo laminar, evitando a contaminação externa. O meio de cultivo foi retirado das placas com pipetas estéreis, também autoclavadas e embaladas isoladamente, e inoculado nestes tubos contendo 5 mL de Caldo BHI e incubados por 24/48 horas a 37°C, na estufa do laboratório de microbiologia IPTSP-UFG. Foi retirado todo o meio de

cultura disponível, tanto nas placas contendo microgotas, quanto nas placas contendo “poças”. As amostras que positivaram no caldo BHI, foram posteriormente subcultivadas em Agar Nutriente (verificar crescimento de fungos), Agar Manitol Salgado (verificar crescimento de *Staphylococcus* e *Bacillus*) e Agar MacConkey (verificar o crescimento de bactérias Gram-negativas). As amostras isoladas foram identificadas através da caracterização morfotintorial (azul de lactofenol – fungos e coloração de Gram-bactérias). Para os cocos gram-positivos foram realizado os testes de produção de catalase e coagulase. Para os bacilos gram-negativos foram realizados vários testes bioquímicos de identificação metabólica bacteriana.

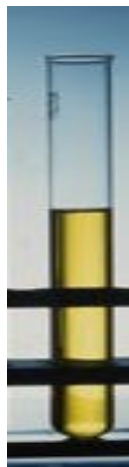


Figura 3 - Meios de cultivo microbiológico (Caldo BHI)

Testes bioquímicos

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 ⁽⁸⁾, (Figura 4).

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

Na amostra contaminada por *Klebsiella*, 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 (Motilidade, Indol e Enxofre), 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 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 pseudomonas, 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, 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.

Na amostra contaminada por leveduras, houve crescimento no ágar nutriente com antibióticos, e no gram, foi observado a presença de células eucariontes, bastante coradas, unicelulares.



Figura 4 - Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de bactérias bastonetes gram negativos, laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.

Resultado

Foram 80 amostras no período de maio de 2009 a abril de 2010, das quais 3 apresentaram contaminação, resultando em uma prevalência de 3,75%. Foi achada contaminação tanto para a técnica FIV, quanto para ICSI. A identificação dos microrganismos mostrou que a principal contaminação foi por bastonetes Gram negativos, presente na microbiota humana. Uma contaminação foi causada por uma levedura, provavelmente do gênero *Candida*, muito comum na microbiota genital. O quantitativo encontrado foi de 2 bactérias, sendo 1 da família Enterobacteriaceae da microbiota intestinal humana (*Klebsiella*), e um bastonete gram negativo não fermentador (*Pseudomonas*), uma bactéria ambiental e muito encontrada em infecções hospitalares (Figura 5). Todas as contaminações bacterianas são

de bastonetes gram negativos, como mostra a Tabela 1. Os microrganismos de maior prevalência ⁽⁴⁾ foram Enterobactérias e o gênero Candida, um tipo de levedura, para fungos. Estas bactérias apresentam resistência à penicilina G, antibiótico presentes nos meios de cultura IVF.

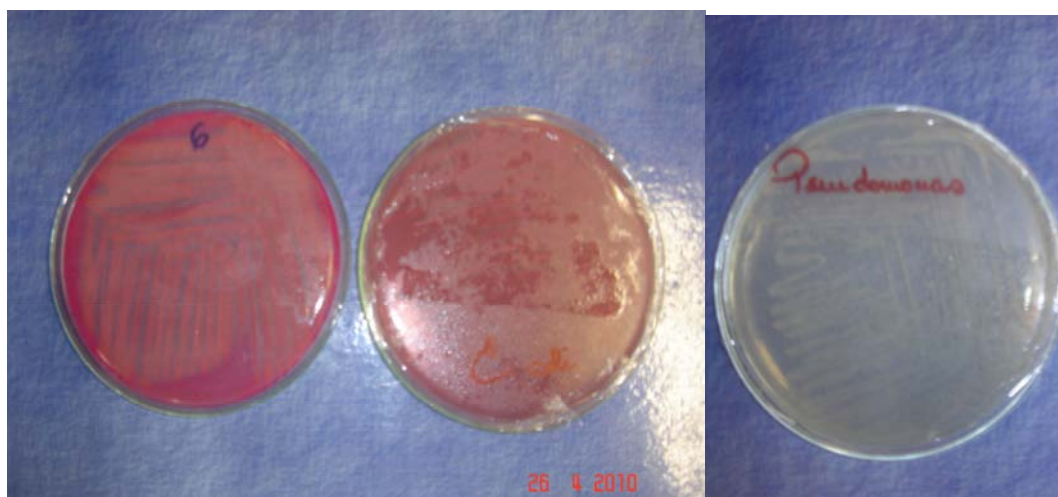


Figura 5 - Colônias de *Klebsiella SP*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp*, respectivamente.

Tabela 1: Distribuição dos Microrganismos isolados dos meios de cultivo de embriões, no laboratório de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010.

Microrganismos	Laboratório (N=80)	%
Klebsiella	1	33,3
Pseudomonas	1	33,3
Leveduras	1	33,3
Total	3	100

Foram encontradas contaminações por bacillus gram positivos no laboratório, grandes bacilos típicos de contaminação do ar, motivo pelo qual foram retiradas dos dados de prevalência. Estes bacilos normalmente não são identificados com testes bioquímicos, e são indicadores da qualidade do ar. Como foram encontrados em amostras do laboratório de reprodução humana e no laboratório do IPTSP-UFG, levantou-se a hipótese de contaminação cruzada entre os laboratórios, onde acontecia a manipulação

e a incubação dos caldos BHI nas estufas, para crescimento, caso houvesse contaminação. Estas amostras foram descartadas.

A maior frequência dos microrganismos encontrados foi de bastonetes Gram negativos.

Discussão

Semelhantemente aos trabalhos anteriores, foi encontrada contaminação nas placas de cultivo de embriões humanos, em laboratórios de reprodução humana. Com a legislação vigente de implementação de uma gestão de qualidade, todo caso de contaminação deve ser considerado um evento adverso, que não só deve ser registrado, a fim de corroborar com tendências, mas também analisados a fim de maximizar a possibilidade de tomar medidas ativas com o objetivo de evitar a transferência, tanto da contaminação microbiológica dos espermatozoides para o ovócito, quanto dos embriões contaminados para o útero. Foi evidenciado por que nos casos em que as placas de cultivo estavam contaminadas por bactérias, a qualidade dos embriões em desenvolvimento era pobre ⁽⁴⁾. Embriões ruins, de classificação R (Figura 6), apresentam clivagem desequilibrada, com muitos blastômeros de tamanhos desiguais, alta fragmentação e resíduos ⁽¹⁴⁾.

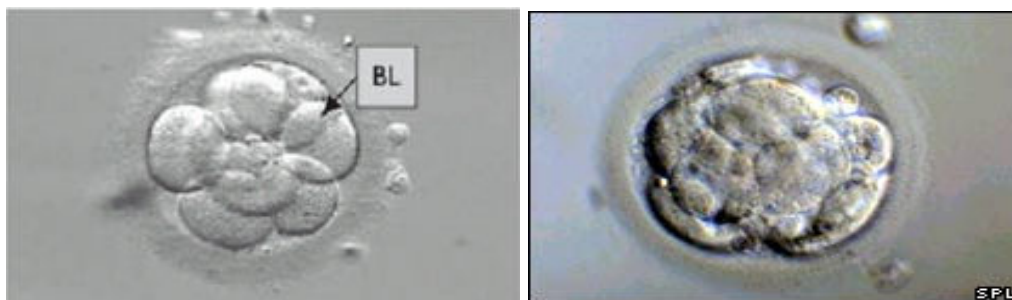


Figura 6 - Comparação entre embriões humanos saudáveis (à esquerda) e embriões ruins de classificação R ⁽⁹⁾

Os microrganismos de maior prevalência foram bastonetes Gram negativos para bactérias, e levedura, sendo a única amostra micológica encontrada, que são os mesmos exemplares resultados de estudos na Europa ⁽⁹⁾, de amostras coletadas no período de 1997 a 2004. Penicilina G

ainda é utilizada no meio IVF . No entanto, é conhecida a alta frequência de adaptação e resistência, adquirida por bactérias em um curto período de tempo. O antibiótico Penicilina G, utilizado nos meios de cultivo de embriões, foi insuficiente para conter a proliferação bacteriana, de grande importância médica, provavelmente multirresistentes, encontradas neste estudo. Estes gêneros identificados são comumente encontrados em estudos de epidemiologia clínica, em Infecção Hospitalar ^(10,11), coletados em amostras de sangue (40,3 %), urina (8,7%), secreção endotraqueal (29,8%), pontas de cateter (15,7%), entre outros ⁽¹²⁾. Entre os microrganismos mais encontrados estavam os bacilos gram negativos não fermentadores, (*Pseudomonas aeruginosa* 12,2%), as Leveduras (15,7%), dentre as quais encontraram 10,5% para *Candida albicans*, e Enterobactérias (3,5%), ressaltando a *Escherichia coli* em 26% e *Klebsiella pneumoniae* em 7%. A sepse (sepse grave, choque séptico) representa a principal causa de morte nas UTIs em todo o mundo, e se associam a estes bastonetes gram negativos, há tanto referidos ⁽¹³⁾.

Foram encontrados 50% dos ciclos contaminados por microrganismos, que foram detectados nas lavagens da agulha após a coleta de oócitos, amostras de sêmen, nos fluidos foliculares e em placas de incubação para FIV ⁽³⁾. Nenhum microrganismo foi isolado nas placas de embriões, como encontrado neste presente estudo. O uso de penicilina e estreptomicina foi eficaz na contenção da contaminação, em 1996, encontrada em 63% de amostra de sêmen contaminados ⁽³⁾. Após o processamento seminal em meio de cultura, rico em antibióticos, a taxa de contaminação reduzia para 5%.

Diferentemente dos trabalhos⁽⁴⁾ que utilizou sêmen como parte da amostragem, a técnica ICSI não foi encontrada como um fator de proteção contra a contaminação. Nesta técnica, a injeção de um único espermatozóide no ovócito M2 (maduro para fertilização), ao contrário da FIV (colocado uma gota de sêmen capacitado sobre o ovócito), poderia reduzir a contaminação proveniente do sêmen, o que não interfere em outras prováveis causas de contaminação. Esta capacitação (técnica de SWIM-UP) separa os espermatozoides classe A e B da parte líquida do sêmen, fonte potencial de microrganismos. Em estudos da contaminação do sêmen ⁽¹⁴⁾,

46 amostras do total de 150 foram encontradas contaminadas. Este estudo utilizou apenas as placas de cultivo de embriões, já que possíveis contaminações do sêmen poderiam ser percebidas e identificadas, através das placas. As placas de cultivo são o local de maior problemática de contaminação, já que interfere diretamente no embrião, em suas primeiras clivagens e pode ser transferido para o útero, causando infecção materna.

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. Como foram encontrados nos dois laboratórios, levantou-se a hipótese de contaminação cruzada entre os laboratórios, o de reprodução humana e o de microbiologia IPTSP-UFG, onde acontecia a manipulação dos meios, posterior incubação dos caldos BHI nas estufas, para crescimento, e identificação caso houvesse contaminação. Como não houve formas de descartar esta hipótese de contaminação cruzada, as amostras foram retiradas do total. Não houve nenhum trabalho que apresentasse bacilos gram positivos associados a infecções humanas.

Para a espécie de levedura encontrada neste trabalho, há relato ⁽⁷⁾ que a *Candida albicans* não afetou parâmetros espermáticos, mas aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida. Fungos normalmente são de crescimento mais lento quando comparados a bactérias. Eles aparecem nas placas de cultivo de embriões com 2-3 dias, até mesmo após a transferência, e por isso muitas vezes não é detectado. Existe relato ⁽¹¹⁾ que, de 240 amostras do ar de ambientes hospitalares, 80 foram isoladas fungos, dentre os quais, 41 eram leveduras (do gênero *Candida*). *Candida albicans* é um fungo muito encontrado na microbiota genital feminino e masculino.

Foram identificados os mesmos gêneros de microrganismos encontrados nos estudos ⁽⁴⁾, como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Comparação da distribuição dos microrganismos isolados e identificados, neste estudo (Goiânia-2009/2010) e no de Kastrop et al (2007)

Estudo atual - Goiânia (2009-2010)	%	n ^{o*}	Kastrop et al (2007)	%	n ^{o*}
Klebsiella sp	33,3	1	Candida species (24)	25,3	
Pseudomonas sp	33,3	1	Escherichia coli	58,9	(56)
Leveduras	33,3	1	Stenotrophomonas maltophilia	4,2	(4)
-			Agrobacterium species	3,2	(3)
-			Pseudomonas species	3,2	(3)
-			Klebsiella pneumoniae	2,1	(2)
-			Citrobacter koseri	1,1	(1)
-			Ochromobacter anthropi	1,1	(1)
-			Aspergillus terreus	1,1	(1)

*Número de amostras contaminadas com cada tipo de microrganismo.

A qualidade do ar nos laboratórios de fertilização in vitro deve estar em constante e rigorosa vigilância, para manutenção do controle de qualidade e segurança exigidos e citados ⁽⁹⁾. Não há dúvidas de que esta contaminação poderia comprometer irreversivelmente a qualidade dos embriões, que são de alta sensibilidade, e diminuir suas taxas de implantação e gestação, com nascimento a termo. Durante as etapas de fertilização, há risco de contaminação, seja ele na coleta de ovócitos, com a microbiota vaginal, o sangue e urina da mãe no trato genital feminino, ou com o cateter introduzido na cavidade abdominal, com o sêmen e até mesmo com o material, maquinários e comprometimento do ar, nos laboratórios. Todos estes dados de resistência bacteriana à Penicilina (e Gentamicina em alguns meios de cultura), sugerem mudanças nos protocolos de fabricação dos meios de cultivo de embriões humanos, e até mesmo adaptando o tipo antimicrobiano usado, a um estudo de necessidades para as diferentes localidades onde se pratica a fertilização in vitro. No entanto é necessário um estudo que quantifique o grau de sensibilidade/resistência a vários antibióticos, das bactérias encontradas e também determine a toxicidade destes antibióticos para os embriões, avaliando vantagens e desvantagens.

Houve uma prevalência de 3,75% de contaminação nas placas de cultivo de embriões, sendo os microrganismos encontrados e seu quantitativo por amostra: *Klebsiella* sp (1), *pseudomonas* sp (1), levedura (1).

Referências

- (1) Elder K, Baker D, Ribes J. Infections, infertility and assisted reproduction. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.
- (2) Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawcys M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril*. 1996; 66:776–780.
- (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) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, De Mouzon J, Nygren KG. (2007) Assisted reproductive technology in Europe, 2003: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 22(6), 1513-1525.
- (8) Koneman EW et al. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1600p.
- (9) Amaral WN et al. *Tratado de Reprodução Assistida*. Ed. SBRH, p. 295-316, 2010.
- (10) Souza CO et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *pseudomonas aeruginosa* isoladas de fezes de pacientes infectados pelo vírus da

imunodeficiência humana/Antimicrobial resistance profile of pseudomonas aeruginosa isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency virus *Cad. saúde colet.* Rio de Janeiro; 5(3): p.379-392, jul.-set., 2007.

- (11) Cordero 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.* 40 (2): 79-88, mayo-ago. 2002.
- (12) Savas L, Guvel S, Onlen Y, Savas N, Duran N. Nosocomial urinary tract infections: micro-organisms, antibiotic sensitivities and risk factors. *West Indian Med J.* 2006; 55: 188- 93.
- (13) Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A. Pinheiro CTS et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva*;18(1):9-17, jan.-mar. 2006. ilus, graf, tab.
- (14) 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 Reprod.* 15(3): 662-666, 2000.

4.3 ARTIGO 3

(Submetido à Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia- RBGO)

Título: Investigação bacteriológica e Micológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana

Title: Bacteriology and Mycology investigation on culture dishes embryos in laboratories for human reproduction

Autores:

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

Endereço para correspondência: Rua S-5, n° 262, apto. 502, Ed. Arara azul, St. Bela Vista, Goiânia-GO, Fone/fax: (62) 3092-7227 e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br

-Orientador: Dr. Waldemar Naves do Amaral (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2006, professor adjunto da Universidade Federal de Goiás, faculdade de medicina, Diretor Técnico da Fértil Diagnósticos e Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana-SBRH). Endereço para correspondência: Al. Coronel Joaquim de bastos, n 243, st. Marista, CEP 74175 150, tel. (62) 3092-5407, email: waldemar@sbus.org.br

-Co-orientador: Dr. Geraldo Sadoyama (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela Universidade Federal de Uberlândia (2004), Professor Adjunto da Universidade Federal de Goiás (UFG). Rua 235 s/n sala 422 lab. de microbiologia médica, IPTSP-UFG, St. Universitário, CEP: 74605050, tel: 32096103/32096361.e-mail: gsadoyama@yahoo.com.br

Instituição: Faculdade de Medicina- Universidade Federal de Goiás-UFG
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-IPTSP-UFG

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

Barbara Rosa Foizer Ribeiro- FOIZER, B. R. R.

Resumo

Introdução: Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e equipamentos. **Objetivos:** Investigar a prevalência de contaminação bacteriológica e micológica nas placas de cultivo de embriões humanos e identificar o microrganismo em gênero e espécie. **Metodologia:** foram coletadas 125 amostras de placas de cultivo de embriões humanos, após a transferência para o útero materno, em três laboratórios de reprodução humana na cidade de Goiânia-GO, no período de maio de 2009 a maio de 2010. Os meios de cultivo foram inoculados em caldo BHI e incubados na estufa. As amostras que turvaram (positivaram) foram isoladas e identificadas. **Resultados:** Foram encontradas seis amostras contaminadas do total de 125, com uma prevalência de 4,8% de contaminação. Os microrganismos encontrados foram bactérias do gênero *Escherichia Coli* (50%), *Klebsiella sp* (16,6%), *Pseudomonas sp* (16,6%), e uma levedura (16,6%). Os resultados encontrados foram comparados aos estudos de Kastrop, com 0,68% de contaminação, usando a análise estatística de Risco de Incidência (Risk Ratio), que apresentou sete vezes mais contaminação neste estudo, com intervalo de confiança de 95%. **Conclusão:** Embora os meios de cultura apresentem os antibióticos penicilina G ou gentamicina, bastonetes gram negativos resistentes foram encontrados. Houve prevalência de 4,8% de contaminação. A *Escherichia Coli* foi o bastonete gram negativo de maior frequência, encontrada em três amostras, das seis contaminadas. Os microrganismos encontrados e seus quantitativos foram: *Escherichia Coli* (3), *Klebsiella sp* (1), *Pseudomonas sp* (1), e Levedura (1).

Palavras-chave (descritores): Reprodução humana. Contaminação. Microbiológico. Laboratório. Placas de Cultivo. Embriões.

Abstract

Introduction: Human Reproduction laboratories, quality control is crucial to the success of procedures. The correct implementation of procedures directly influence the results, especially because the vagina, the follicular fluid and semen can not be sterilized. A high degree of hygiene, cleanliness and disposal of the material must be observed to avoid contamination in the culture media and equipment. **Objectives:** To investigate the prevalence of bacterial contamination on plates and mycological culture of human embryos and identify the organism in the genus and species. **Methods:** 125 samples were collected from culture dishes human embryos after transfer to the uterus, in three human reproduction laboratories in Goiânia-GO, from May 2009 to May 2010. The culture media were inoculated in BHI broth and incubated in the greenhouse. Samples that clouded (positivist) were isolated and identified. **Results:** We found six contaminated samples of the total 125, with a prevalence of 4.8% contamination. The microorganisms were bacteria like *Escherichia coli* (50%), *Klebsiella sp* (16.6%), *Pseudomonas sp* (16.6%), and yeast (16.6%). The results were compared to studies KASTROP with 0.68% contamination, using statistical analysis Risk Incidence (risk ratio), which presented seven times more contamination in this study, with an interval of 95%. **Conclusion:** Although the culture media provide the antibiotics penicillin G and gentamicin resistant gram negative rods were found. The prevalence of 4.8% contamination. The *E. coli* gram negative rod was more frequently found in three samples of the six contaminated. The microorganisms and their quantity were *Escherichia coli* (3), *Klebsiella sp* (1), *Pseudomonas sp* (1), and yeast (1).

Key words (descriptors): Human reproduction. Contamination. Microbiology. Laboratory. Culture dishes. Embryos.

Introdução

O decréscimo da fertilidade com o passar do tempo é um inevitável fato biológico, aliado 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. Relatos históricos trazem o bebê Louise Brown como o primeiro a nascer de fertilização in vitro, na Inglaterra, no ano 1978. Na FIV, os embriões são formados e cultivados fora do corpo da mãe, em placas de cultivo, graças ao avanço dos meios de cultura, que oferecem os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento dos embriões, cultivados em laboratório de reprodução humana⁽¹⁾.

Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influem diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e equipamentos.

Cada passo nos procedimentos e manipulações laboratoriais devem ser executados com técnicas de assepsia rigorosas⁽²⁾. A exata frequência destas contaminações microbiológicas não é conhecida. Há um número limitado de publicações e descrições de casos sobre este assunto⁽³⁾. Desde 1997, contaminações microbiológicas em meios de cultura tem sido rotineiramente registrados para contribuir na melhora da qualidade do sistema de manejo em reprodução humana, o que compromete diretamente os resultados gestacionais em fertilização assistida. Bactericidas e fungicidas vem sendo incorporados aos meios de cultura, à medida que aumenta a resistência dos micro-organismos⁽⁴⁾. 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 as placas de cultivo.

No entanto, nem vagina, nem um ejaculado podem ser considerados como ambientes estéreis ⁽⁵⁾. 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 fluído folicular, correndo o risco de contaminar a pelve materna e os embriões⁽⁶⁾. A maioria dos laboratórios de reprodução humana utiliza meios de cultura contendo antibióticos para minimizar os riscos de crescimento microbiano. Os meios de cultivo utilizados nos laboratórios de reprodução foram o IVF + 5% de albumina, que apresenta penicilina G como antibiótico, e o HTF, que apresenta gentamicina como antibiótico. Estes meios devem ser usados depois de equilibrada a atmosfera em 37°C e 5% de CO₂. Não obstante, ocasionalmente, os microrganismos colonizam placas de cultivo de oócitos e embriões. A frequência exata destas contaminações ou infecções microbianas é desconhecida. O próprio número limitado de publicações e relatórios de como lidar com este assunto ^(4,7,8) poderiam sugerir que as infecções nas placas de cultivo apresentam um risco insignificante. Foram relatadas placas com a contaminação de levedura, no total de 729 ciclos, com prevalência de 0,69%, e outros relatos⁽³⁾ de seis casos, onde a contaminação microbiológica da cultura de embriões foi observada após 1691 coletas de ovócitos, com prevalência de 0,35%. Extrapolando essa frequência para o número de ciclos de fertilização in vitro realizados na Europa, os resultados ⁽⁹⁾ indicaram que muitas centenas de placas de cultivo de embriões contaminadas, provenientes de FIV, ocorrem a cada ano. Ao longo de um período de oito anos, 95 infecções em placas de cultivo in vitro foram observados após coleta de 13.977 amostras envolvendo placas e sêmens, com prevalência de 0,68%⁽⁵⁾. Técnicas diferentes em reprodução assistida possuem índice de contaminação diferentes. Na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) a taxa de contaminação foi desprezível mas na fertilização in vitro (FIV), o índice de contaminação aumenta ⁽⁵⁾.

A primeira consequência que se deve observar 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 pode causar síndromes e comprometer a saúde do feto, trazendo a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, nascimento de conceptos pequenos e defeituosos; fatos descritos em estudos bovinos onde a fertilização assistida é amplamente utilizada⁽¹⁰⁾.

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 no controle de qualidade devem ser sempre acrescentados 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 ovócitos e de transferência, por exemplo)⁽⁶⁾.

Como não há estudos longitudinais sobre doenças que acometem, em qualquer fase da vida, indivíduos concebidos por fertilização assistida, ligadas a provável contaminação na fase embriológica, torna-se difícil a atribuição da causa contaminação à consequência doença. A qualidade dos embriões precisa ser preservada, e mesmo que a contaminação 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⁽¹⁰⁾.

O entendimento sobre as possíveis contaminações, endógenas e exógenas, de gametas 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. A identificação microbiológica se faz necessária, uma vez que fornecerá dados que comprovem esta contaminação, o que vai nortear as mudanças necessárias nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais, também nos meios de cultivo de embriões, para que haja proteção materno-fetal^(7,9).

Neste estudo, analisou-se a prevalência da contaminação microbiológica por bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões humanos, e as contaminações encontradas foram isoladas e identificadas.

Estas placas de cultivo dos embriões representam o melhor local de coleta para verificar se há contaminação microbiológica eminente, por que para ela confluem os vários fatores prováveis de contaminação, que interfere diretamente nas taxas de gestação.

Metodologia

Esta pesquisa de corte transversal realizou-se de forma qualitativa, com abordagem descritiva sobre a presença e o tipo de microorganismo em materias que foram encontrados contaminação, e também quantitativa, com índices de prevalência. Houve coleta do meio de cultura após a transferência dos embriões para o útero, em três laboratórios de Reprodução Humana , em Goiânia. A escolha dos locais se deram por se tratarem de instituições privadas e pública, três instituições ativas em Goiânia - Goiás. Embriões foram cultivados em meio de cultura HTF (Human Tubal Fluid – Irvine Scientific) ou IVF (Meio de cultivo de embriões - Vitro Life), contendo penicilina ou Gentamicina de antibiótico. As placas foram preparadas com gotas periféricas de IVF, com albumina a 5%, e cobertas com óleo mineral (sigma), mas houve também o cultivo de embriões em placas que utilizam o modo “poças”, com IVF ou HTF. Independente da suspeita de contaminação, todas as placas guardadas na incubadora dos laboratórios de reprodução foram utilizadas como amostra para este estudo.

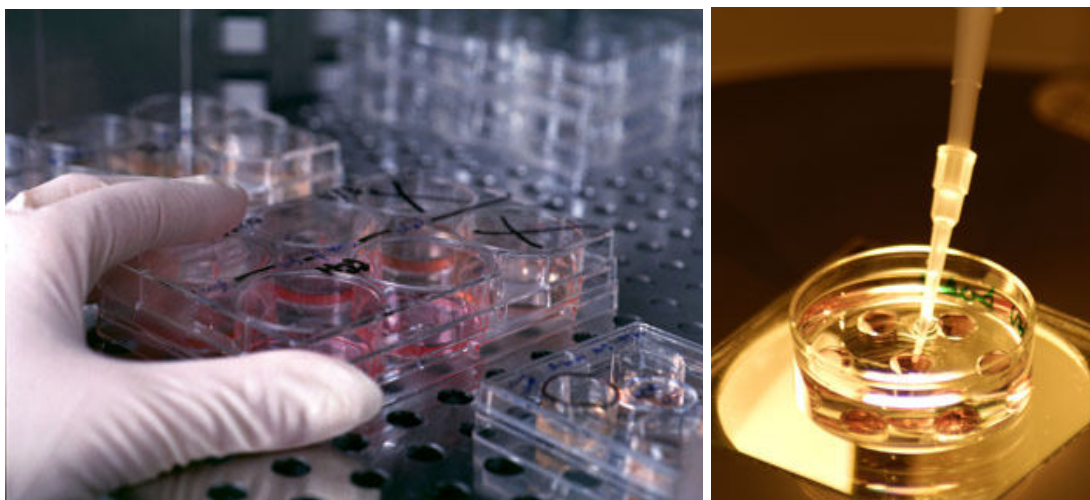


Figura 1 - Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” à esquerda e modo “microgotas”, à direita.

O projeto foi aprovado no comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. A coleta do material de estudo foi realizada no decorrer do ano de 2009 e 1º semestre de 2010, nas dependências das instituições citadas, de acordo com a disponibilidade do descarte de placas de embriões, e levadas ao laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública), onde analisou-se primeiramente a presença de contaminação e posteriormente a identificação dos microorganismos das amostras. Para analisar a presença de contaminação, foi utilizado o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (Figura 2). 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 contaminados, turvavam neste período dentro da estufa. Depois de garantida a esterilização, as amostras foram coletadas no próprio ambiente dos laboratórios de reprodução humana. Cada coleta foi realizada utilizando a câmara de fluxo laminar ou a pressão positiva do laboratório, evitando a contaminação externa. O meio de cultivo foi retirado das placas com pipetas estéreis, também autoclavadas e embaladas isoladamente, e inoculado nestes tubos contendo 5 mL de Caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubados por 24/48 horas a 37°C, na estufa do laboratório de microbiologia IPTSP-UFG. Foi retirado todo o meio de cultura disponível, tanto nas placas contendo microgotas, quanto nas placas contendo “poças”. As amostras que positivaram no caldo BHI, foram posteriormente subcultivadas em Agar Nutriente (verificar crescimento de fungos), Agar Manitol Salgado (verificar crescimento de *Staphylococcus* e *Bacillus*) e Agar MacConkey (verificar o crescimento de bactérias Gram-negativas). As amostras isoladas foram identificadas através da caracterização morfotintorial (azul de lactofenol – fungos e coloração de Gram-bactérias). Para os cocos gram-positivos foram realizado os testes de produção de catalase e coagulase. Para os bacilos gram-negativos foram realizados vários testes bioquímicos de identificação metabólica bacteriana.



Figura 2 - Meio de cultivo microbiológico (Caldo BHI)

Testes bioquímicos

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. A Figura 3 abaixo representa uma sequencia de testes bioquímicos realizado em metodologia semelhante à citada por Koneman⁽¹¹⁾.

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



Figura 3 - Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de bactérias bastonetes gram negativos, laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.

Na amostra contaminada por *Klebsiella*, 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 (Motilidade, Indol e Enxofre), 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 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 *Pseudomonas*, houve crescimento no MacConkey. 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. 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. A leitura do TAF revelou fermentação para glicose, sacarose, lactose e manitol, com mudança de cor de vermelho para amarelo. Houve produção de gás. Positivo para vermelho de metila. No meio SIM, positivo para motilidade, para produção de indol e negativo para produção de ácido sulfídrico. Não houve hidrolização da uréia, sendo negativo para 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.

Na amostra contaminada por leveduras, houve crescimento no ágar nutriente com antibióticos, e no gram, foi observado a presença de células eucariontes, bastante coradas, unicelulares.

As amostras que apareceram com *Bacillus* gram positivos, cresceram no meio manitol. No método gram, todas apresentavam coloração roxa e organizavam-se sob a forma de estreptobacilos, sem importância médica.

Realizou-se uma análise da prevalência, dos achados identificados e testes comparativos com os estudos de Kastrop, do ano de 2007.

Resultado

Foram 125 amostras no período de maio de 2009 a maio de 2010, das quais seis apresentaram contaminação, resultando em uma prevalência de 4,8%. Foi achada contaminação tanto para a técnica FIV, quanto para ICSI. Nos laboratórios um e três, cada procedimento incluiu tanto FIV quanto ICSI, e no laboratório dois, apenas ICSI foi realizada. A identificação dos microrganismos mostrou que a principal contaminação foi por *Escherichia coli*, presente na microbiota humana. Uma contaminação foi causada por uma levedura, provavelmente do gênero *Candida*, muito comum na microbiota genital. O quantitativo encontrado foi de quatro bactérias, sendo

três da família Enterobacteriaceae da microbiota intestinal humana (*E. Coli* e *Klebsiella*), e um bastonete gram negativo não fermentador (*Pseudomonas*), uma bactéria ambiental e muito encontrada em infecções hospitalares (Figura 4). Todas as contaminações bacterianas são de bastonetes gram negativos, como mostra a Tabela 1. Os microrganismos de maior prevalência, segundo os resultados foram *E. Coli* para bactérias e o gênero *Candida*, um tipo de levedura, para fungos (Figura 5). Estas bactérias apresentam resistência à penicilina G e Gentamicina, antibióticos presentes nos meios de cultura IVF e HTF, respectivamente.

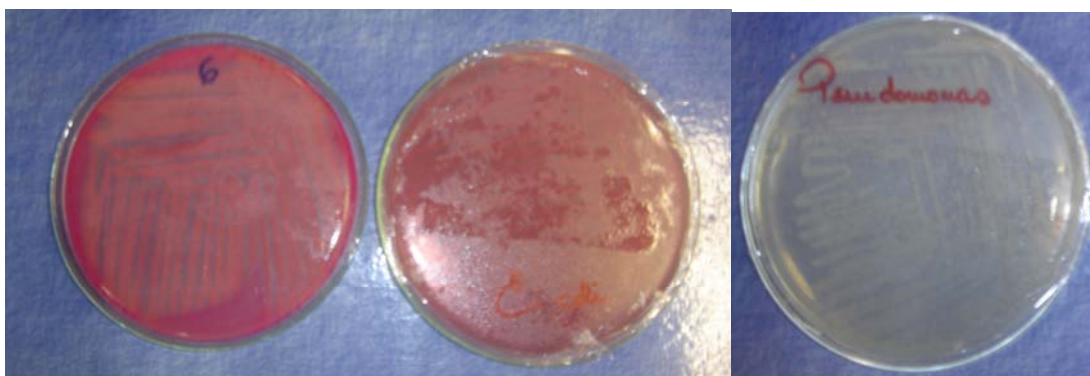


Figura 4 - Colônias de *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*, respectivamente.



Figura 5 - Colônias de leveduras, à esquerda da placa, de coloração branca.

Tabela 1: Distribuição dos Microrganismos isolados dos meios de cultura em Goiânia, 2009/2010.

Microrganismos	Laboratório 1 (N=25)	Laboratório 2 (N=80)	Laboratório 3 (N=20)
<i>Escherichia coli</i>	2	—	1
<i>Klebsiella</i>	—	1	—
<i>Pseudomonas</i>	—	1	—
Leveduras	—	1	—

N= número de amostras disponibilizadas em cada laboratório.

Foram encontradas contaminações por bacillus gram positivos nos três laboratórios, grandes bacilos típicos de contaminação do ar, motivo pelo qual foram retiradas dos dados de prevalência. Estes bacilos normalmente não são identificados com testes bioquímicos, e são indicadores da qualidade do ar. Como foram encontrados em amostras dos três laboratórios, levantou-se a hipótese de contaminação cruzada entre os laboratórios, inclusive o de microbiologia IPTSP-UFG, onde acontecia a manipulação e posterior incubação dos caldos BHI nas estufas, para crescimento, caso houvesse contaminação. Estas amostras foram descartadas.

A maior frequência dos microrganismos encontrados foi da E. Coli, no laboratório um. A maior variação de microrganismos foi encontrada no laboratório dois. A distribuição percentual isolada de cada microrganismo encontrado encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos casos da pesquisa microbiológica, realizadas em laboratórios de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010, segundo os microrganismos identificados.

Microrganismo isolado	Número de amostras	%
Escherischia Coli	3	50,0
Klebsiella sp	1	16,6
Pseudomonas sp	1	16,6
Leveduras	1	16,6
Total	6	100

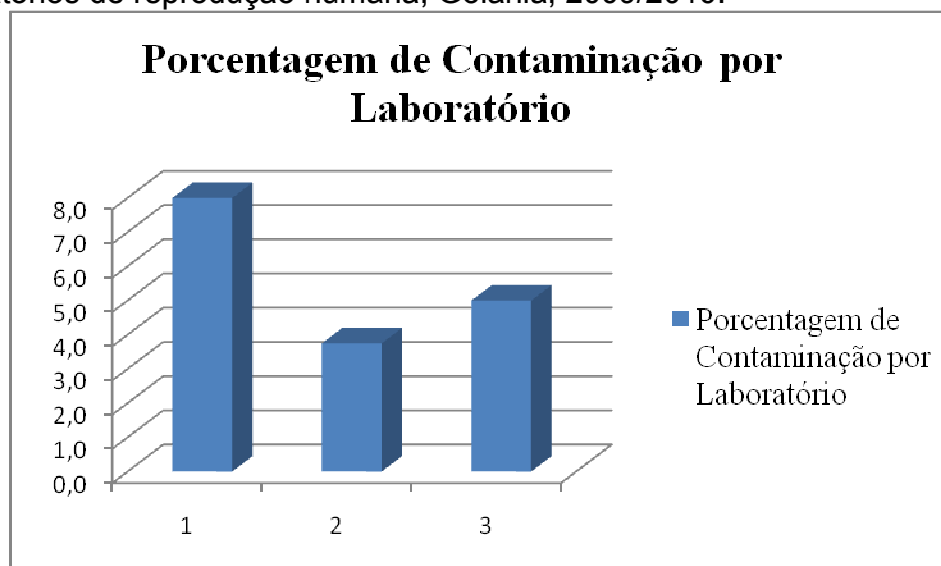
Analisando a taxa de contaminação, em proporção ao número de amostras por laboratório, encontramos as porcentagens na tabela 3.

Tabela 3: Porcentagem de contaminação em proporção ao número de amostras de cada laboratório de reprodução humana, Goiânia-GO

Laboratório	Número de amostras	Número de amostras contaminadas	% de contaminação
1	25	2	8,00
2	80	3	3,75
3	20	1	5,00

O gráfico referente a este resultado encontra-se subsequentemente.

Gráfico 1: Distribuição dos casos da pesquisa microbiológica, realizada em laboratórios de reprodução humana, Goiânia, 2009/2010.



Discussão

Semelhantemente aos trabalhos anteriores, foi encontrada contaminação nas placas de cultivo de embriões humanos, em laboratórios de reprodução humana. Com a legislação vigente de implementação de uma gestão de qualidade, todo caso de contaminação deve ser considerado um evento adverso, que não só deve ser registrado, a fim de corroborar com tendências, mas também analisados a fim de maximizar a possibilidade de tomar medidas ativas com o objetivo de evitar a transferência, tanto da contaminação microbiológica dos espermatozoides para o ovócito, quanto dos embriões contaminados para o útero. Foi evidenciado ⁽⁵⁾ que nos casos em que as placas de cultivo estavam contaminadas por bactérias, a qualidade dos embriões em desenvolvimento era pobre. Embriões ruins, de classificação R (Figura 6), apresentam clivagem desequilibrada, com muitos blastômeros de tamanhos desiguais, alta fragmentação e resíduos⁽¹²⁾.

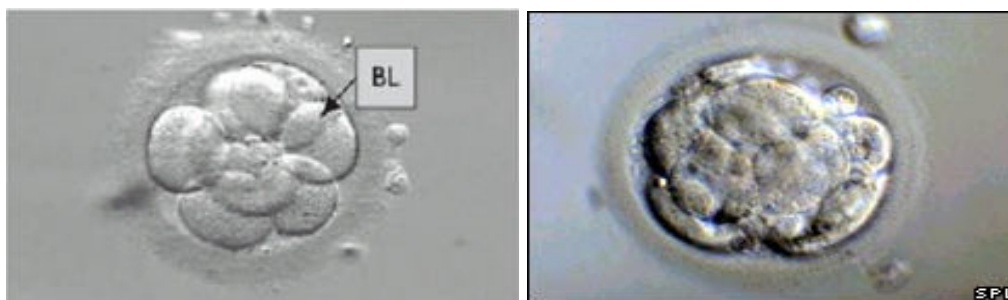


Figura 6 - Comparação entre embriões humanos saudáveis (à esquerda) e embriões ruins de classificação R ⁽¹²⁾

Os microrganismos de maior prevalência foram *E. Coli* para bactérias, e levedura, sendo a única amostra micológica encontrada, que são os mesmos exemplares resultados de estudos na Europa ⁽⁵⁾, que coletou amostras no período de 1997 a 2004. Penicilina G ainda é utilizada no meio IVF, e no meio HTF ocorreu substituição por gentamicina, em 2005 e, desde então, a colonização de placas de cultivo, foi observada somente por *Candida*; dados considerados inéditos para Kastrop, et al, ⁽⁵⁾, mas fora de seu período de coleta de dados. No entanto, é conhecida a alta frequência de adaptação e resistência, adquirida por bactérias em um curto período de tempo. Os antibióticos Penicilina G ou Gentamicina, utilizados nos meios de cultivo de embriões, foram insuficientes para conter a proliferação bacteriana, neste estudo.

Diferentemente dos trabalhos de Kastrop et al ⁽⁵⁾, que utilizaram sêmen como parte da amostragem, a técnica ICSI não foi encontrada como um fator de proteção contra a contaminação. Nesta técnica, a injeção de um único espermatozóide no ovócito M2 (maduro para fertilização), ao contrário da FIV (colocado uma gota de sêmen capacitado sobre o ovócito), poderia reduzir a contaminação proveniente do sêmen, o que não interfere em outras prováveis causas de contaminação. Esta capacitação (técnica de SWIM-UP) separa os espermatozóides classe A e B da parte líquida do sêmen, fonte potencial de microrganismos. Em estudos da contaminação do sêmen ⁽⁴⁾, 46 amostras do total de 150 foram encontradas contaminadas, e foram detectados nas lavagens da agulha após a coleta de ovócitos, amostras de sêmen, nos fluidos foliculares e em placas de incubação para FIV. O uso de penicilina e estreptomicina foi eficaz na contenção da contaminação, em 1996. Após o processamento seminal em meio de cultura, rico em

antibióticos, a taxa de contaminação reduzia para 5% (oito contaminadas em 120 amostras)⁽⁴⁾. Neste presente estudo, utilizou apenas as placas de cultivo de embriões, já que possíveis contaminações do sêmen poderiam ser percebidas e identificadas, também através das placas. As placas de cultivo são o local de maior problemática de contaminação, já que interfere diretamente no embrião, em suas primeiras clivagens.

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. Como foram encontrados nos três laboratórios (uma amostra em cada), levantou-se a hipótese de contaminação cruzada entre os laboratórios, inclusive com o de microbiologia IPTSP-UFG, onde acontecia a manipulação dos meios, posterior incubação dos caldos BHI nas estufas, para crescimento, e identificação caso houvesse contaminação. Como não houve formas de descartar esta hipótese de contaminação cruzada, as amostras foram retiradas do total. Não houve nenhum trabalho que apresentasse bacilos gram positivos associados a infecção humana.

Para a espécie de levedura encontrada neste trabalho, tem-se o relato⁽⁸⁾ de que a *Candida albicans* não afetou parâmetros espermáticos, mas aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida. Fungos normalmente são de crescimento mais lento quando comparados a bactérias. Eles aparecem nas placas de cultivo de embriões com 2-3 dias, até mesmo após a transferência, e por isso muitas vezes não é detectado. Em outro estudo⁽¹³⁾ constata-se que, de 240 amostras do ar de ambientes hospitalares, 80 foram isoladas fungos, dentre os quais, 41 eram leveduras (do gênero *Candida*). *Candida albicans* é um fungo muito encontrado na microbiota genital feminino e masculino.

Foram identificados os mesmos gêneros de microrganismos encontrados nos estudos de Kastrop et al⁽⁵⁾ (com prevalência de 0,68% de contaminação).

Tabela 4: Comparação da distribuição dos microrganismos isolados e identificados, neste estudo (Goiânia-2009/2010) e no de Kastrop, Graaf-Miltenburg, Gutknecht e Weima⁽⁵⁾

Estudo atual - Goiânia (2009-2010)	n ^{o*}	%	Kastrop, Graaf-Miltenburg, Gutknecht e Weima ⁽⁵⁾	n ^{o*}	%
Escherichia coli	50	3	Candida species	(24)	25,3
Klebsiella sp	16	1	Escherichia coli	(56)	58,9
Pseudomonas sp	16	1	Stenotrophomonas maltophilia	(4)	4,2
Leveduras	16	1	Agrobacterium species	(3)	3,2
-			Pseudomonas species	(3)	3,2
-			Klebsiella pneumoniae	(2)	2,1
-			Citrobacter koseri	(1)	1,1
-			Ochromobacter anthropi	(1)	1,1
-			Aspergillus terreus	(1)	1,1

*Número de amostras contaminadas com cada tipo de microrganismo.

Em estudos comparativos que testam a diferença entre o resultado deste estudo e o de Kastrop et al⁽⁵⁾, apresentou-se uma prevalência microbiológica sete vezes maior do que o mesmo, com intervalo de confiança de 95%. Foi utilizada como teste estatístico uma análise de Risco de Incidência (RISK-RATIO), devido ao número baixo de amostras contaminadas.

A qualidade do ar nos laboratórios de fertilização in vitro deve estar em constante e rigorosa vigilância, para manutenção do controle de qualidade e segurança exigidos e citados⁽¹²⁾. Esta contaminação poderia comprometer irreversivelmente a qualidade dos embriões, que são de alta sensibilidade, e diminuir suas taxas de implantação e gestação, com nascimento a termo. Durante as etapas de fertilização, há risco de contaminação, seja ele na coleta de ovócitos, com a microbiota vaginal, o sangue e urina da mãe no trato genital feminino, ou com o cateter introduzido na cavidade abdominal, com o sêmen e até mesmo com o material, maquinários e comprometimento do ar, nos laboratórios⁽⁵⁾. Todos estes dados de resistência bacteriana à Penicilina e Gentamicina sugerem mudanças nos protocolos de fabricação dos meios de cultivo de embriões humanos, e até mesmo adaptando o tipo antimicrobiano usado, a um estudo

de necessidades para as diferentes localidades onde se pratica a fertilização in vitro. No entanto é necessário um estudo que quantifique o grau de sensibilidade/resistência a vários antibióticos, das bactérias encontradas e também determine a toxicidade destes antibióticos para os embriões, avaliando vantagens e desvantagens.

Mesmo sendo um estudo de corte transversal com pouca literatura revisada sobre a identificação das causas de contaminação, e com um número limitado de amostras devido ao tempo reduzido da coleta de um ano, este estudo comprovou que a contaminação microbiológica existe, e foi encontrada em todos os três laboratórios de reprodução e que deve ser considerada como fator de contribuição dos fracassos em reprodução assistida. O pequeno número de estudos sobre contaminação em laboratórios de reprodução, e sua relação com a fertilidade, deve ser um fator estimulante para estudos posteriores.

Houve uma prevalência de 4,8% de contaminação, sendo os microrganismos encontrados e seu quantitativo por amostra: *Escherichia Coli* (3), *Klebsiella sp* (1), *pseudomonas sp* (1), levedura (1).

Agradecimentos

Agradeço à minha família e familiares, ao meu orientador, Dr. Waldemar Naves do Amaral (Faculdade de Medicina), ao meu co-orientador, Dr. Geraldo Sadoyama e demais professores do IPTSP-UFG: Leda, Ms. Lara Stefania Netto de Oliveira e Dr. José Daniel Gonçalves Pereira. Agradeço aos laboratórios de Reprodução Humana de Goiânia, aqui representados pelos professores doutores Mário Aprobato, Rodopiano de Sousa Florêncio, e pelas embriologistas Lilian de Fátima Filetti Gomes, Jucyara do Valle Lima, Jane Porfírio Rocha, e Tatiana Moreira da Silva e Mônica Canêdo Silva Maia. Ao doutorando do ICB-UFG Daniel Teixeira, pelo auxílio com as análises estatísticas. Agradeço aos participantes das bancas examinadoras. Aos funcionários da pós graduação da faculdade de medicina. Agradeço a Deus esta oportunidade, a Ele toda glória e honra.

Referências

- (1) Samrsla Mônica, Nunes Juliana Cezar, Kalume Carolina, Cunha Antônio Carlos Rodrigues da, Garrafa Volnei. Expectativa de mulheres à espera de reprodução assistida em hospital público do DF - estudo bioético. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 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, McMorow J, Lennon B, Fawasy M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril.* 1996; 66:776–780.
- (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) 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 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.
- (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) Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, De Mouzon J, Nygren KG. (2007) Assisted reproductive technology in Europe, 2003: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 22(6), 1513-1525.
- (10) Junqueira, J. R. C., Alfieri, A. A. (2006), Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina Ci Agr*, 27, 289-298
- (11) Koneman E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1600p.

- (12) 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.
- (13) Cordero 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.* 40 (2): 79-88, mayo-ago. 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os microrganismos de maior prevalência encontrados foram E. Coli para bactérias, e levedura, sendo a única amostra micológica encontrada, que são os mesmos exemplares resultados de estudos na Europa (Kastrop et al, 2007), que coletou amostras no período de 1997 a 2004. Penicilina G ainda é utilizada no meio IFV, mas no meio HTF ocorreu substituição por gentamicina, em 2005 e, desde então, a colonização de placas de cultivo, foi observada somente por Candida; dados considerados inéditos para Kastrop, et al, (2007), mas considerado fora de seu período de coleta de dados. No entanto, é conhecida a alta frequência de adaptação e resistência, adquirida por bactérias em um curto período de tempo. Os antibióticos Penicilina G ou Gentamicina utilizado nos meios de cultivo de embriões, foram insuficientes para conter a proliferação bacteriana, neste estudo. Comparando os gêneros bacterianos encontrados com outros estudos, Sousa et al (2007), encontrou cepas de Pseudomonas multirresistentes e o antibiótico de maior resistência encontrado foi a Gentamicina(20 por cento). Segundo Felismino, as taxas de resistência da bactéria E. Coli à gentamicina aumentaram 13 por cento, de 2006 a 2008, e tendem a aumentar mais. Também encontrada em infecções do trato urinário, a E. Coli mostrou-se resistente à gentamicina nos estudos de Agra, et al (2007) e nos estudos de Ubillús et al (2008), em gestantes. Nos estudos de Vieira et al (1999), a amicacina passou a ser utilizada (em associação à oxacilina ou à ampicilina) para o tratamento de infecções intestinais por *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes (encontrada em 68% dos recém-natos internados), em substituição à gentamicina. Tal prática foi resultado de resistência à gentamicina, dos agentes bacterianos de infecção, há mais de 10 anos atrás. As espécies mais frequentemente isoladas em infecções do trato respiratório inferior foram Pseudomonas aeruginosa com 27,6% e Klebsiella pneumoniae (9,5%), em 945 amostras. Os Gram negativos apresentaram um elevado índice de resistência, entre os

antimicrobianos testados, 57,6% foram resistentes à Gentamicina. Neste estudo, foram encontrados apenas bastonetes gram negativos de grande importância médica, provavelmente multirresistentes, entre as bactérias. Estes gêneros identificados são comumente encontrados em estudos de epidemiologia clínica, em Infecção Hospitalar (Sousa, 2006; Cordero, et al, 2002), coletados em amostras de sangue (40,3 %), urina (8,7%), secreção endotraqueal (29,8%), pontas de cateter (15,7%), entre outros (Nascimento-carvalho, 2006). Entre os microrganismos mais encontrados estavam os bacilos gram negativos não fermentadores, (*Pseudomonas aeruginosa* 12,2%), as Leveduras (15,7%), dentre as quais encontrou 10,5% para *Candida albicans*, e Enterobactérias (3,5%), ressaltando a *Escherichia coli* em 26% e *Klebsiella pneumoniae* em 7%. A sepse (sepse grave, choque séptico) representa a principal causa de morte nas UTIs em todo o mundo, e se associam a estes bastonetes gram negativos, há tanto referidos (Sales Junior, et al 2006).

Para espécies de levedura, a principal doença encontrada é a Candidíase, pela levedura *Candida albicans*, presente nos meios de cultura (Burrelo et al, 2004): “*Candida albicans* não afetou parâmetros espermáticos, mas aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida”. Fungos normalmente são de crescimento mais lento quando comparados a bactérias. Eles aparecem nas placas de cultivo de embriões com 2-3 dias, até mesmo após a transferência, e por isso muitas vezes não é detectado. *Candida* é um gênero de fungo que representa 80% das infecções hospitalares fúngicas, sendo que as Espécies não-*albicans* respondem hoje por ao menos 50% das infecções invasivas por *Candida* spp (Colombo et al, 2003) presentes também no trato urinário (Oliveira et al 2002) . Este fungo, também encontrado nas contaminações dos laboratórios de reprodução assistida, pode ser proveniente de infecções no trato genital dos pacientes submetidos à FIV e ICSI. A interferência deste fungo no resultado do tratamento de infertilidade não é clara, daí a necessidade de um estudo sobre o possível efeito teratogênico para os embriões (Burrelo et al, 2004).

A qualidade do ar nos laboratórios de fertilização in vitro deve estar em constante e rigorosa vigilância, para manutenção do controle de

qualidade e segurança exigidos e citados (Amaral et al -2010). Esta contaminação poderia comprometer irreversivelmente a qualidade dos embriões, que são de alta sensibilidade, e diminuir suas taxas de implantação e gestação, com nascimento a termo. Durante as etapas de fertilização, há risco de contaminação, seja ele na coleta de ovócitos, com a microbiota vaginal, o sangue e urina da mãe no trato genital feminino, ou com o cateter introduzido na cavidade abdominal, com o sêmen e até mesmo com o material, maquinários e comprometimento do ar, nos laboratórios. Todos estes dados de resistência bacteriana à Penicilina G e Gentamicina sugerem mudanças nos protocolos de fabricação dos meios de cultivo de embriões humanos, e até mesmo adaptando o tipo antimicrobiano usado, a um estudo de necessidades para as diferentes localidades onde se pratica a fertilização in vitro. No entanto é necessário um estudo que quantifique o grau de sensibilidade/resistência a vários antibióticos, das bactérias encontradas e também determine a toxicidade destes antibióticos para os embriões, avaliando vantagens e desvantagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Salas limpas e ambientes controlados associados. *NBRISO14644-1: Classificação da limpeza do ar*. Disponível em: <URL:<http://www.abntnet.com.br/fidetail.aspx?FontelD=24169>>. Acesso em: 13 abr. 2009.

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>>. [2009 Fev 19].

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

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

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.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARAES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 36, n. 5, Oct. 2003 .

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.

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

FELISMINO, M. S.; BRANCO, V.. *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 Covilhã- Portugal www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana_silvapdf.pdf

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.

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.

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.

MARTINS, S. G. et al. Prevalência e perfil de resistência de microrganismos isolados do trato respiratório inferior de pacientes internados no Hospital Divina Providência-Porto Alegre, RS/Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the lower respiratory tract of inpatients in Divina Providencia Hospital-Porto Alegre, RS. *Rev. bras. anal. clin*; 40(2):83-86, 2008.

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. Disponível em: <URL:<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20954&word1>>. [2009 Abr 2009].

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.

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.

PASSOS, E.P. et al. Hepatitis C virus infection and assisted reproduction. *Hum. Reprod.*, v.17, p. 2085–2088, 2002.

SALES JÚNIOR, J. A. L. et al. David, Cid Marcos; Hatum, Rodrigo; Souza, Paulo César S. P; Japiassú, André; Pinheiro, Cleovaldo T. S; Friedman, Gilberto; Silva, Odin Barbosa da; Dias, Mariza D'Agostino; Koterba, Edwin; Dias, Fernando Suparregui; Piras, Cláudio; Luiz, Ronir Raggio. Sepses Brasil: estudo epidemiológico da sepses em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva*;18(1):9-17, jan.-mar. 2006. ilus, graf, tab.

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.

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.

UBILLÚS TRUJILLO, M. J.; LIZ, A. A. Resistencia bacteriana en las infecciones urinarias de gestantes en un hospital de Huancayo / Bacterial resistance in the urinary tract infections of pregnant women in a hospital of Huancayo. *Rev. Soc. Peru. Med. Interna*;21(3):100-103, jul.-sept. 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.

WAHINGTON 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, 156p.

ANEXOS

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

Anexo 2 - FIGURAS



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



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

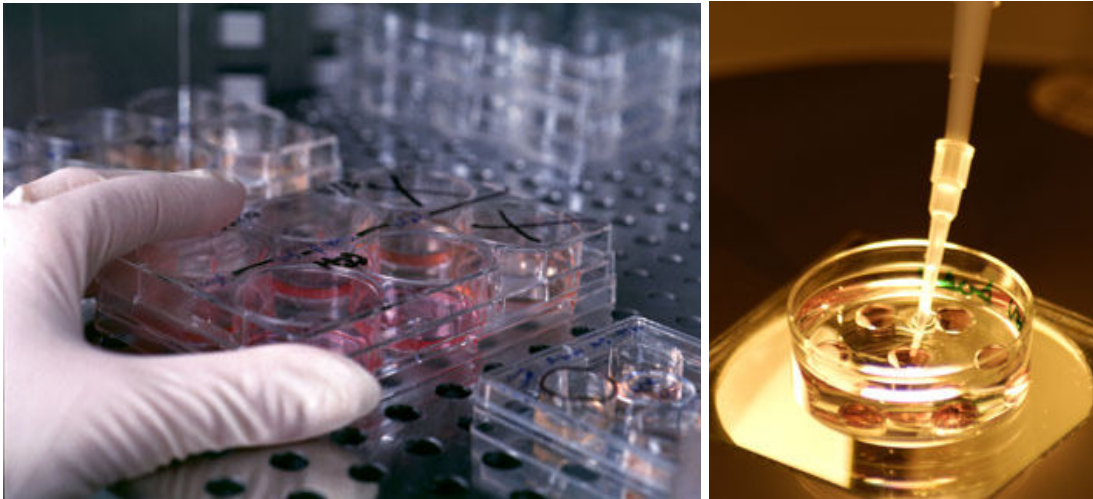


Figura 3- Placas de cultivo de embriões. Modo: “poças” á esquerda e modo “microgotas”, à direita

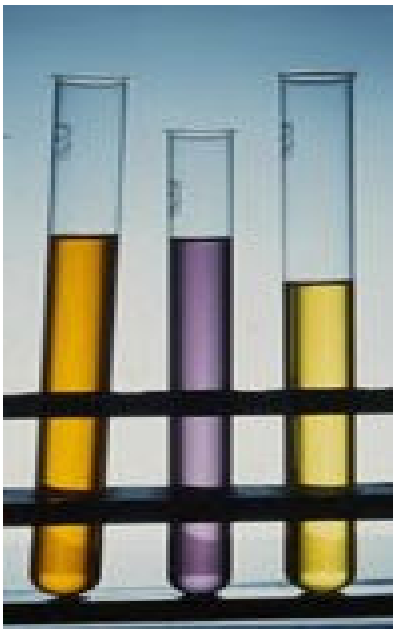


Figura 4- Meios de cultivo (Caldo BHI em amarelo)



Figura 5- Sequência de testes bioquímicos efetuados durante a identificação de bactérias bastonetes gram negativos, laboratório do IPTSP-UFG, abril de 2010, Goiânia-GO.

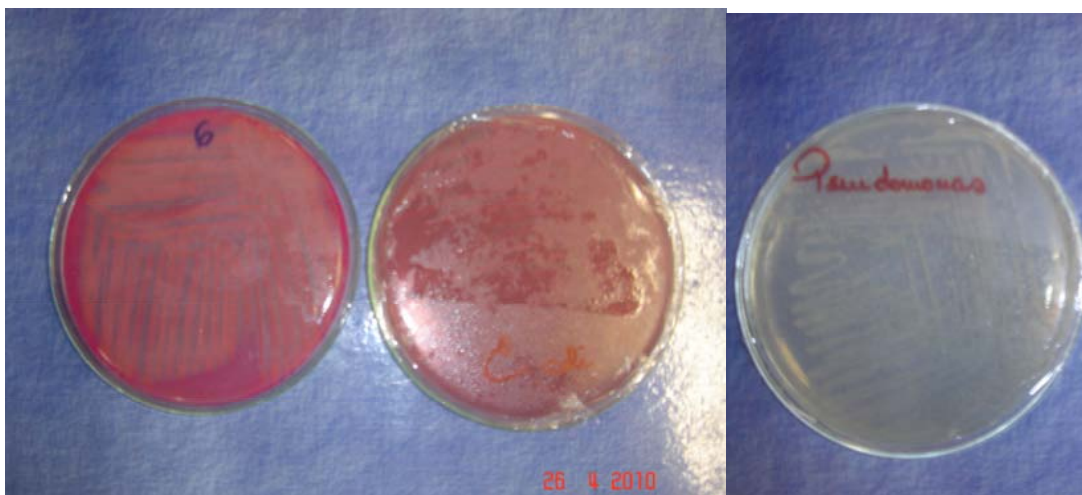


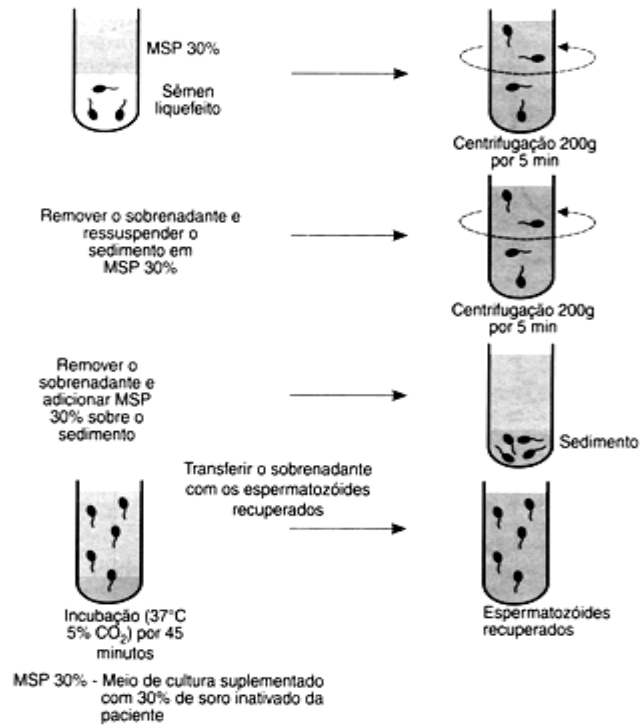
Figura 6- Colônias de *Klebsiella SP*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp*, respectivamente



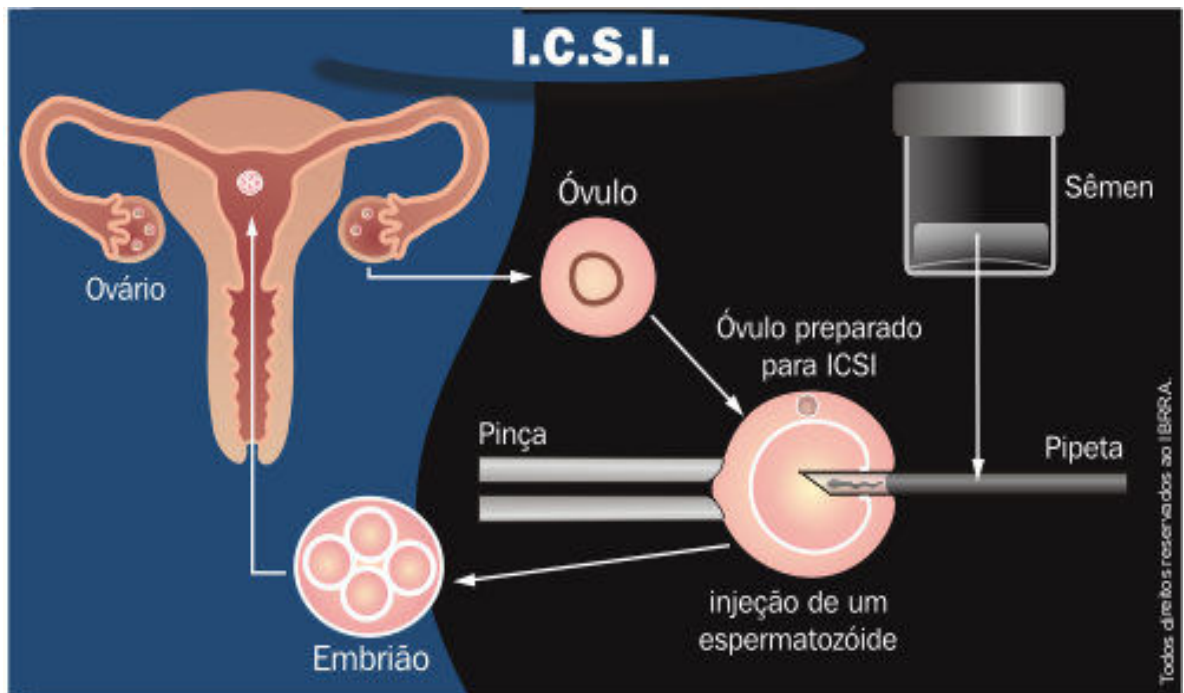
Figura 7- colônias de leveduras, à esquerda, de coloração branca.

Anexo 3 - Esquemas de técnicas citadas nos artigos:

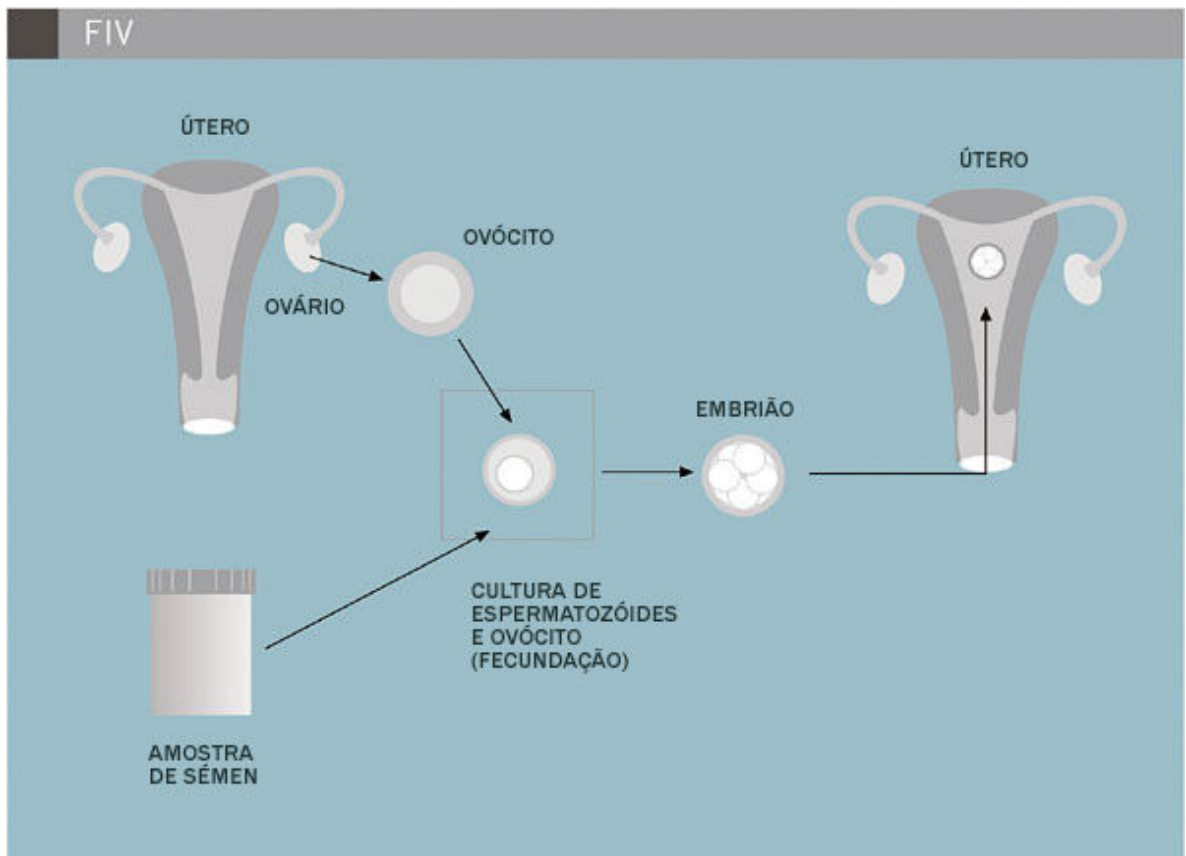
Swin-up



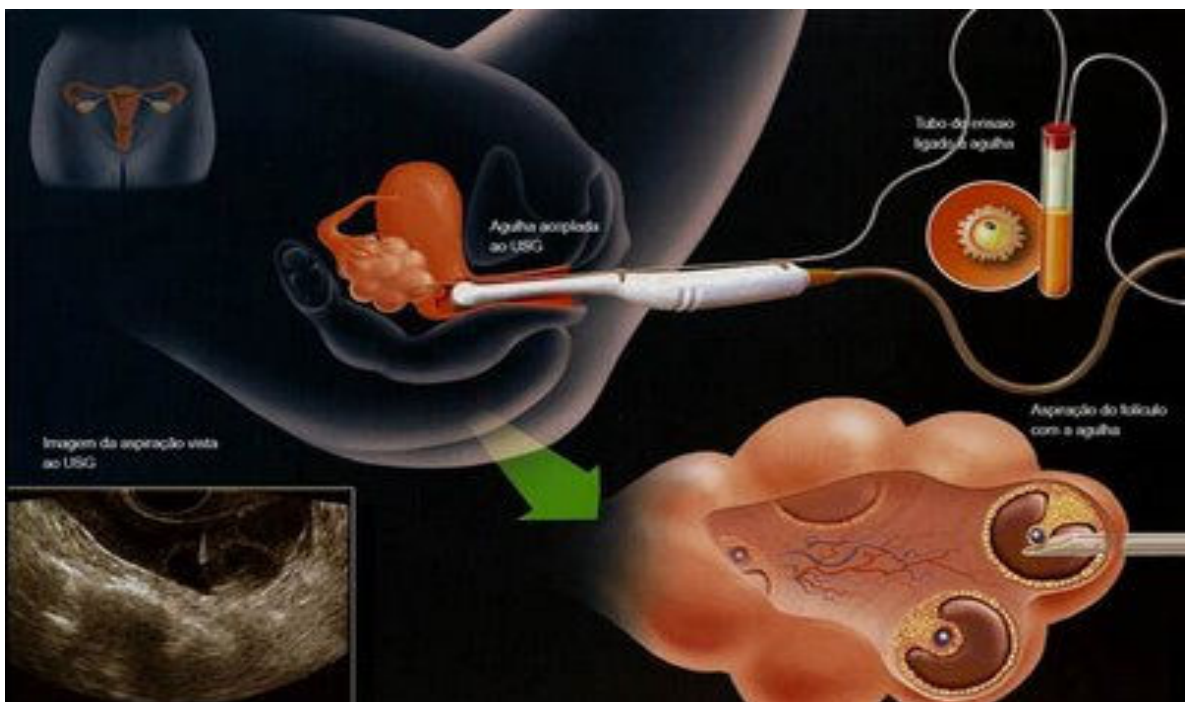
ICSI



FIV



Coleta de ovócitos



Anexo 4 – Normas da revista reprodução e climatério (SBRH) e da RBGO

Instruções aos autores (Reprodução e Climatério-SBRH)

A **Revista Reprodução & Climatério** publica artigos originais, artigos de atualização, opiniões, breves comunicações, relatos de caso e cartas ao editor (no máximo 500 palavras), na área de medicina reprodutiva, climatério, ginecologia endócrina e sexualidade. São aceitos artigos em português, espanhol ou inglês.

Os originais devem ser encaminhados para a **SBRH**, aos cuidados do editor, exclusivamente por correio eletrônico, para: sbrh@sbrh.org.br.

Os originais devem ser escritos em folha A4, com espaço duplo e margens de 3 cm, em páginas numeradas. A fonte a ser utilizada é a Times New Roman, tamanho 12.

Os originais devem ser preparados na seguinte seqüência:

Página de Rosto: título do trabalho em português e inglês (o título não deverá ser colocado em negrito ou caixa alta), título conciso (de 2 a 4 palavras, para constar no alto da página), nome completo dos autores (exemplo: Patrick Steptoe), nome da(s) instituição(s) onde o trabalho foi desenvolvido, nome, endereço e e-mail do autor para correspondência.

Resumo: Deverá conter no máximo 200 palavras e ser estruturado, contendo Objetivos, Material e Métodos, Resultados, Conclusões e Unitermos. Evitar, no resumo, abreviações e referências bibliográficas. Deverá ser acrescentado um resumo conciso, de 2 ou 3 linhas com as principais conclusões do trabalho, para ser colocado no índice da revista. Para artigos de atualização, comunicações breves, opiniões e relatos de casos, não é necessário que o Resumo seja estruturado.

Abstract: Versão pra o inglês do texto do Resumo, acompanhado de Uniterms.

Texto do trabalho: Deverá conter Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. As abreviações devem ser restritas e sempre definidas na primeira aparição no texto. Eventuais tabelas deverão ser numeradas em algarismos arábicos, com título explicativo do conteúdo. Não se colocam traços verticais e limita-se os horizontais a um acima da tabela e um ao final. As figuras, fotos ou desenhos devem ser limitados ao estritamente necessário, e serão numerados em algarismos arábicos, com legenda explicativa. Tabelas, fotos, figuras e desenhos devem ser enviados em páginas separadas. Nas referências bibliográficas, as citações devem obedecer às normas de Vancouver. Maiores esclarecimentos poderão ser obtidos no site: www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Numere as referências por ordem de entrada no trabalho e use estes números para as citações no texto. Todos os autores devem ser citados, exceto quando houver mais de 6 autores, quando se pode citar os 6 primeiros seguidos pela expressão latina et al. Observe alguns exemplos de citações:

Artigos em periódicos:

1. Nahas EAP, Pontes A, Nahas Neto J, Traiman P, Luca L, Abbade J. Efeitos da atividade física e da tibolona sobre a densidade mineral óssea em mulheres na pós menopausa. *Reprod Clim.* 2001;16:47-52.

2. Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935:40-6.

Volume com suplemento:

3. Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache.* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

Livros:

4. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management.* 2nd ed. New York:Raven Press; 1995. p.465-78.

5. Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people.* New York: Churchill Livingstone; 1996.

Cartas e Editoriais:

6. Kremer J. Yardsticks for successful donor insemination [letter]. *Fertil Steril* 1991; 55:1203-4.

7. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

Os manuscritos serão avaliados pelo Conselho Editorial de Reprodução & Climatério, podendo ser recusados, aceitos sem correções, ou aceitos com sugestões de correções, sendo neste último caso reencaminhados aos autores. Após aceitação definitiva, deverá ser feita carta assinada por todos os autores, fazendo menção que o manuscrito não foi publicado anteriormente e dizendo concordar com a publicação e transferência de copyright para Reprodução & Climatério. Os editores reservam-se o direito de fazer alterações gramaticais e estruturais que julgarem necessárias.

Instuções aos autores (RBGO)

A **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** (Rev Bras Ginecol Obstet. ISSN 0100 7203), publicação mensal de divulgação científica da Federação das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), é dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins, com o propósito de publicar contribuições originais sobre temas relevantes no campo da Ginecologia, Obstetrícia e áreas correlatas. É aberta a contribuições nacionais e internacionais.

O material enviado para análise não pode ter sido submetido simultaneamente à publicação em outras revistas nem publicado anteriormente. Na seleção dos manuscritos para publicação, são avaliadas originalidade, relevância do tema e qualidade da metodologia utilizada, além da adequação às normas editoriais adotadas pela revista. O material referente a artigos recusados não é devolvido. Todos os manuscritos submetidos à revista são analisados por pareceristas anônimos e o sigilo é garantido durante todo o processo de revisão. Cópias dos pareceres dos revisores são enviadas aos autores. Os manuscritos aceitos e os aceitos condicionalmente são enviados para os autores para que sejam

efetuadas as modificações e para que os mesmos tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas, a fim de que o trabalho seja aceito para publicação. Os autores devem devolver o texto com as modificações solicitadas assim que possível, devendo justificar, na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento às sugestões. Não havendo retorno do trabalho após três meses, presume-se que os autores não têm mais interesse na publicação. Caso haja retorno após esse prazo, será considerada nova submissão, e o trabalho deve ser submetido à nova análise.

Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de responsabilidade dos autores. O manuscrito enviado para publicação deve ser redigido em português. A revista publica contribuições nas seguintes categorias:

1. Artigos Originais, trabalhos completos prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original têm prioridade para publicação;
2. Notas Prévias de trabalhos em fase final de coleta de dados, mas cujos resultados são originais e relevantes para justificar sua publicação;
3. Relatos de Casos, de grande interesse e bem documentados, do ponto de vista clínico e laboratorial. O texto deve ser baseado em revisão bibliográfica atualizada. O número de referências pode ser igual ao dos trabalhos completos;
4. Técnicas e Equipamentos, que são apresentações de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos;
5. Artigos de Revisão e Atualização, incluindo avaliação crítica e sistematizada da literatura. A seleção dos temas é baseada em planejamento estabelecido pela editoria e editores associados. Os autores convidados devem ter publicações em periódicos sobre o tema escolhido. O número de autores das revisões pode variar entre um e quatro, dependendo do tipo de texto e da metodologia empregada. Devem ser descritos os métodos e procedimentos adotados para a realização do trabalho, podendo ser empregadas técnicas para se obterem atualizações, metanálises ou revisões sistemáticas. O texto deve ser baseado em revisão atualizada da literatura. Tratando-se de tema ainda sob investigação, a revisão deve discutir todas as tendências e linhas de investigação em curso. Apresentar, além do texto da revisão, resumo, abstract e conclusões. Ver a seção "Preparo do manuscrito" para informações quanto ao texto, página de rosto, resumo e abstract. Contribuições espontâneas podem ser aceitas. Nesse caso, devem ser enviados inicialmente um resumo ou esboço do texto, a lista de autores e respectivas publicações sobre o tema. Se houver interesse da revista, são convidados para redigir e enviar o texto definitivo. No caso de contribuições espontâneas, aplicam-se as normas citadas para os autores convidados;
6. Comentários Editoriais, sob solicitação do editor;
7. Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contados da data de envio do resumo. Devem conter, aproximadamente, 250 palavras e seguir as normas da revista quanto à estruturação, à forma e ao conteúdo. Incluir título em português e inglês e, no mínimo, três palavras ou expressões-chave. O resumo deve ser enviado em disquete, CD ou DVD com uma cópia impressa. Em arquivo separado, informar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do serviço ou departamento onde a tese foi desenvolvida e apresentada.
8. Cartas dos leitores para o editor, versando sobre matéria editorial ou não, mas com apresentação de informações relevantes ao leitor. As cartas podem ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos publicados, a carta é enviada aos autores para que sua resposta possa ser publicada simultaneamente.

Informações gerais

1. A revista não aceita material editorial com objetivos comerciais.
2. Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que podem influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre essas situações, menciona-se a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou equipamentos citados ou utilizados no trabalho, assim como em concorrentes da mesma. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, consultorias etc.
3. No texto, devem ser mencionadas a submissão e a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde foi realizado o trabalho.
4. Artigo que trate de pesquisa clínica com seres humanos deve incluir a declaração de que os participantes assinaram o termo de consentimento livre e informado.
5. A partir de agosto de 2007, os periódicos indexados nas bases de dados Lilacs e SciELO passaram a exigir que os ensaios controlados aleatórios (randomized controlled trials) e ensaios clínicos (clinical trials) submetidos à publicação tivessem o registro em uma base de dados de ensaios clínicos. Essa decisão foi decorrente da orientação da Plataforma Internacional para Registros de Ensaios Clínicos (ICTRP) da Organização Mundial da Saúde (OMS), do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). As instruções para o registro estão disponíveis no endereço eletrônico do ICMJE (http://www.icmje.org/clin_trialup.htm) e o registro pode ser feito na base de dados de ensaios clínicos da National Library of Medicine disponível em <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.
6. O número de autores de cada manuscrito é limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) devem ter os responsáveis especificados. Trabalhos e estudos multicêntricos podem ter número de autores compatível com o número de centros (cada situação é avaliada pela editoria e pelos revisores). Os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados devem ser especificados no fim do artigo. O conceito de coautoria é baseado na contribuição substancial de cada um, seja para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, ou para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados não é justificável. Todos os autores devem aprovar a versão final a ser publicada.
7. Os autores são informados, por carta, do recebimento dos trabalhos e do número de protocolo na revista. Os trabalhos que estão de acordo com as Instruções aos Autores e se enquadram na política editorial da revista, são enviados para análise de revisores indicados pelo editor.
8. Os originais em desacordo com essas instruções são devolvidos aos autores para as adaptações necessárias antes da avaliação pelo Conselho Editorial.
9. Junto com os originais, deve ser enviada carta de encaminhamento assinada por todos os autores. Podem ser enviadas cartas separadas. Na carta, deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de copyright para a revista. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.
10. Para manuscritos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado. Limitar o número de tabelas e figuras ao necessário para apresentação dos resultados que são discutidos (como norma geral, limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso e Equipamentos e Técnicas, não ultrapassar 15 páginas, reduzindo também o número de figuras e/ou tabelas. As Notas Prévias devem ser textos curtos, com até 800 palavras, cinco referências bibliográficas e duas ilustrações (ver "Preparo do manuscrito", "Resultados").
11. Enviar disquete, CD ou DVD devidamente identificado com o arquivo contendo texto, tabelas, gráficos e as legendas de outras figuras (fotos).

Encaminhar também três cópias impressas do manuscrito. O trabalho pode ser enviado para a revista pelo sistema de submissão on-line no portal SciELO. O endereço eletrônico para correspondência com a revista é: rbgo@fmrp.usp.br.

Preparo dos manuscritos

As normas que seguem foram baseadas no formato proposto pelo ICMJE e publicado no artigo Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, atualizado em Outubro de 2008 e disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org/>.

Apresentação do texto

1. Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página de rosto às referências bibliográficas, tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar ou usar negrito. Numerar todas as páginas iniciando pela página de rosto.
2. Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas ou abreviaturas, descrevê-las por extenso na primeira vez que forem mencionadas no texto.
3. Para impressão, utilizar folhas de papel branco, deixando espaço mínimo de 2,5 cm em cada margem. Iniciar cada seção em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras ou expressões-chave; abstract e keywords; texto; agradecimentos; referências; tabelas individuais e legendas das figuras não digitadas.

Página de rosto

Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores sem abreviaturas; nome da instituição onde o trabalho foi desenvolvido, titulação, afiliação institucional dos autores, informações sobre auxílios recebidos sob forma de financiamento, equipamentos ou fornecimento de drogas. Indicar o nome, endereço, telefone, fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deve ser enviada. Dar preferência para o endereço da instituição onde o trabalho foi desenvolvido. O autor tem de indicar quais informações pessoais não devem ser publicadas.

Resumo

O resumo do trabalho deve aparecer na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado, que deve ser dividido em seções identificadas: objetivo, métodos, resultados e conclusões. Deve ter aproximadamente 300 palavras. O resumo deve conter as informações relevantes, permitindo que o leitor tenha uma ideia geral do trabalho. Deve incluir descrição resumida de todos os métodos empregados e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes, não apenas indicação de significância estatística. As conclusões devem ser baseadas nos resultados do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no resumo. Abaixo do resumo, indicar o número de registro e/ou identificação para os ensaios controlados aleatórios e ensaios clínicos.

Na mesma página do resumo, citar pelo menos cinco palavras ou expressões-chave que serão empregadas para compor o índice anual da revista. Devem ser baseadas no Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine e está disponível no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br>.

Em outra página, deve ser impresso o abstract como versão fiel do texto do resumo estruturado (purpose, methods, results, conclusions). Deve ser também acompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave (keywords). O resumo e o abstract dos Relatos de Casos e Artigos de Revisão e

de Atualização não devem ser estruturados e são limitados a 150 palavras. Para Notas Prévias, não há necessidade do resumo.

Introdução

Repetir, na primeira página da introdução, o título completo em português e inglês. Nessa seção, mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos, apresentar um resumo dos casos já publicados, epidemiologia da condição relatada e uma justificativa para a apresentação como caso isolado. Expor claramente os objetivos do trabalho.

Métodos

Iniciar essa seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou grupo experimental, inclusive dos controles. Identificar os equipamentos e reagentes empregados. Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada, indicar as referências, além da descrição resumida do método. Descrever também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado.

Os trabalhos que apresentam como objetivo a avaliação da eficácia ou tolerabilidade de tratamento ou droga devem, necessariamente, incluir grupo controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos desse tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline – Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials (http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html). Ver também item 4 das “Informações gerais”.

Resultados

Apresentar os resultados em sequência lógica, com texto, tabelas e figuras. Expor os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que são discutidos. Não repetir no texto dessa seção todos os dados das tabelas e figuras, mas descrever e enfatizar os mais importantes, sem interpretação dos mesmos (ver também tabelas). Nos Relatos de Casos, as seções “métodos” e “resultados” são substituídas pela descrição do caso, mantendo-se as demais.

Discussão

Devem ser realçadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionadas nas seções “introdução” e “resultados”. Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Comparar e relacionar as suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as diferenças. Explicar as implicações dos achados, suas limitações e fazer as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. Recomenda-se tabular informações sobre os casos já publicados para comparação.

Agradecimentos

Dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou para aquelas que tenham dado apoio material.

Referências

Todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numerar as referências bibliográficas por ordem de entrada no trabalho e usar esses números para as citações no texto. Evitar número excessivo de referências, selecionando as mais relevantes para cada afirmação e dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregar citações de difícil acesso, como resumos de trabalhos apresentados em congressos ou publicações de circulação restrita. Não empregar referências do tipo “observações não publicadas” e “comunicação pessoal”. Para textos escritos originalmente em português, a referência também deve ser feita em português. Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão:

“aceito e aguardando publicação”, ou “in press”, indicando-se o periódico, volume e ano. Trabalhos aceitos por periódicos que estejam disponíveis on-line, mas sem indicação de fascículos e páginas, devem ser citados como “ahead of print”.

No caso de citações de outras publicações dos autores (autocitação), incluir entre as referências bibliográficas apenas trabalhos originais (não citar capítulos ou revisões), impressos em periódicos regulares e relacionados ao tema.

O número de referências bibliográficas deve ser aproximadamente 30. Para Notas Prévias, no máximo dez. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas.

Para todas as referências, citar os autores até o sexto. Se houver mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme os seguintes modelos:

Formato impresso

• Artigos em revistas

- Moran CA, Suster S, Silva EG. Low-grade serous carcinoma of the ovary metastatic to the anterior mediastinum simulating multilocular thymic cysts: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 3 cases. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(4):496-9.

- Parpinelli MA, Faúndes A, Cecatti JG, Surita FG, Pereira BG, Passini Junior R, et al. Subnotificação da mortalidade materna em Campinas: 1992 a 1994. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2000;22(1):27-32.

- Miyatake T, Ueda Y, Yoshino K, Shroyer KR, Kanao H, Sun H, et al. Clonality analysis and human papillomavirus infection in squamous metaplasia and atypical immature metaplasia of uterine cervix: is atypical immature metaplasia a precursor to cervical intraepithelial neoplasia 3? *Int J Gynecol Pathol*. 2007;26(2):180-7.

• Livro

- Baggish MS, Karram MM. Atlas of pelvic anatomy and gynecologic surgery. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006.

• Capítulos de livro

- Daher S, Mattar R, Sass N. Doença hipertensiva específica da gravidez: aspectos imunológicos. In: Sass N, Camano L, Moron AF, editores. Hipertensão arterial e nefropatias na gravidez. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 45-56.

Formato eletrônico

Apenas para informações estatísticas oficiais e citação de referências de periódicos não impressos. Para estatísticas oficiais, indicar a entidade responsável, o endereço eletrônico, o nome do arquivo ou entrada. Incluir o número de telas, data e hora do acesso. Termos como “serial”, “periódico”, “homepage” e “monography”, por exemplo, não são mais utilizados. Todos os documentos devem ser indicados apenas como [Internet]. Para documentos eletrônicos com o identificador DOI (Digital Object Identifier), mencionar no final da referência, além das informações que seguem:

- Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de Saúde. Estatísticas vitais. Mortalidade e nascidos vivos: nascidos vivos desde 1994. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. [citado 2007 Fev 7]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>>

• Monografia na internet ou livro eletrônico

- Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <<http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>>

Tabelas

Imprimir tabelas em páginas separadas, com espaço duplo e fonte Arial 8. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Todas as tabelas devem ter título e todas as colunas da tabela devem ser identificadas com um cabeçalho. A legenda deve conter

informações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (tab) e não o espaçador para separar as colunas e, para nova linha, a tecla enter. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.

Figuras (gráficos, fotografias e ilustrações)

As figuras devem ser impressas em folhas separadas e numeradas sequencialmente, em algarismos arábicos, conforme a ordem de aparecimento no texto. Todas as figuras devem ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco) e apresentar título e legenda, digitados em fonte Arial 8. No disquete, CD ou DVD devem ser enviadas em arquivo eletrônico separado do texto (a imagem aplicada no processador de texto não significa que o original está copiado). Para evitar problemas que comprometam o padrão da revista, o processo de digitalização de imagens (scan) deve obedecer aos seguintes parâmetros: para gráficos ou esquemas usar 800 dpi/bitmap para traço; para ilustrações e fotos (preto e branco) usar 300 dpi/RGB ou grayscale. Em todos os casos, os arquivos devem ter extensão .tif e/ou .jpg. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em impressão a laser (gráficos e esquemas) ou papel fotográfico (preto e branco) para que possam ser devidamente digitalizadas. Também são aceitos arquivos com extensão .xls (Excel), .cdr (CorelDraw®), .eps, .wmf para ilustrações em curva (gráficos, desenhos, esquemas). São aceitas, no máximo, cinco figuras. Se as figuras já tiverem sido publicadas, devem vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor e constando a fonte na legenda da ilustração.

Legendas

Imprimir as legendas usando espaço duplo, acompanhando as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações) e tabelas. Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a cada figura e tabela, e na ordem que foram citadas no trabalho.

Abreviaturas e siglas

Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu nome por extenso. As abreviaturas e siglas não devem ser usadas no título dos artigos e nem no resumo.

Envio dos manuscritos

Os documentos devem ser enviados para:

Jurandyr Moreira de Andrade

Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia – Editoria

Avenida Bandeirantes, 3.900, 8º andar – Campus Universitário

CEP 14049-900 – Ribeirão Preto/SP

Fone: (16) 3602-2803/Fax: (16) 3633-0946

E-mail: rbgo@fmrp.usp.br

A submissão pode ser efetuada por meio do sistema de "Submissão on-line" da SciELO. Para correspondência, pode ser empregado o e-mail rbgo@fmrp.usp.br.

Itens para a conferência do manuscrito

Antes de enviar o manuscrito, conferir se as Instruções aos Autores foram seguidas e verificar o atendimento dos itens listados abaixo. Os itens 1 e 7 não são necessários para trabalhos enviados via "Submissão on-line" no site SciELO.

1. Carta de encaminhamento assinada por todos os autores;

2. Citação da aprovação do projeto do trabalho por Comissão de Ética em Pesquisa (na seção "métodos") e termo de consentimento livre e informado;
3. Conflito de interesses: se, quando aplicável, foi mencionado, sem omissão de informações relevantes;
4. Página de rosto com todas as informações solicitadas;
5. Resumo e abstract estruturados e compatíveis com o texto do trabalho;
6. Cinco ou mais palavras-chave relacionadas ao texto e respectivas keywords;
7. Mídia (disquete, CD ou DVD) contendo arquivo com o texto integral, tabelas e gráficos, corretamente identificado;
8. Verificar se todas as tabelas e figuras estão corretamente citadas no texto e numeradas, e se as legendas permitem o entendimento das mesmas;
9. Fotos devidamente identificadas e anexadas à correspondência;
10. Referências bibliográficas: numeradas na ordem de aparecimento e corretamente digitadas. Verificar se todos os trabalhos citados estão na lista de referências e se todos os listados estão citados no texto.