



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

# FLORE

## Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

### **Management della patologia infettiva nella coppia infertile.**

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

*Original Citation:*

Management della patologia infettiva nella coppia infertile / Maria Elisabetta Coccia; Francesca Rizzello. - STAMPA. - (2010), pp. 467-489. [10.978.887141/8971]

*Availability:*

This version is available at: 2158/781979 since:

*Publisher:*

CIC Edizioni Internazionali srl

*Published version:*

DOI: 10.978.887141/8971

*Terms of use:*

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

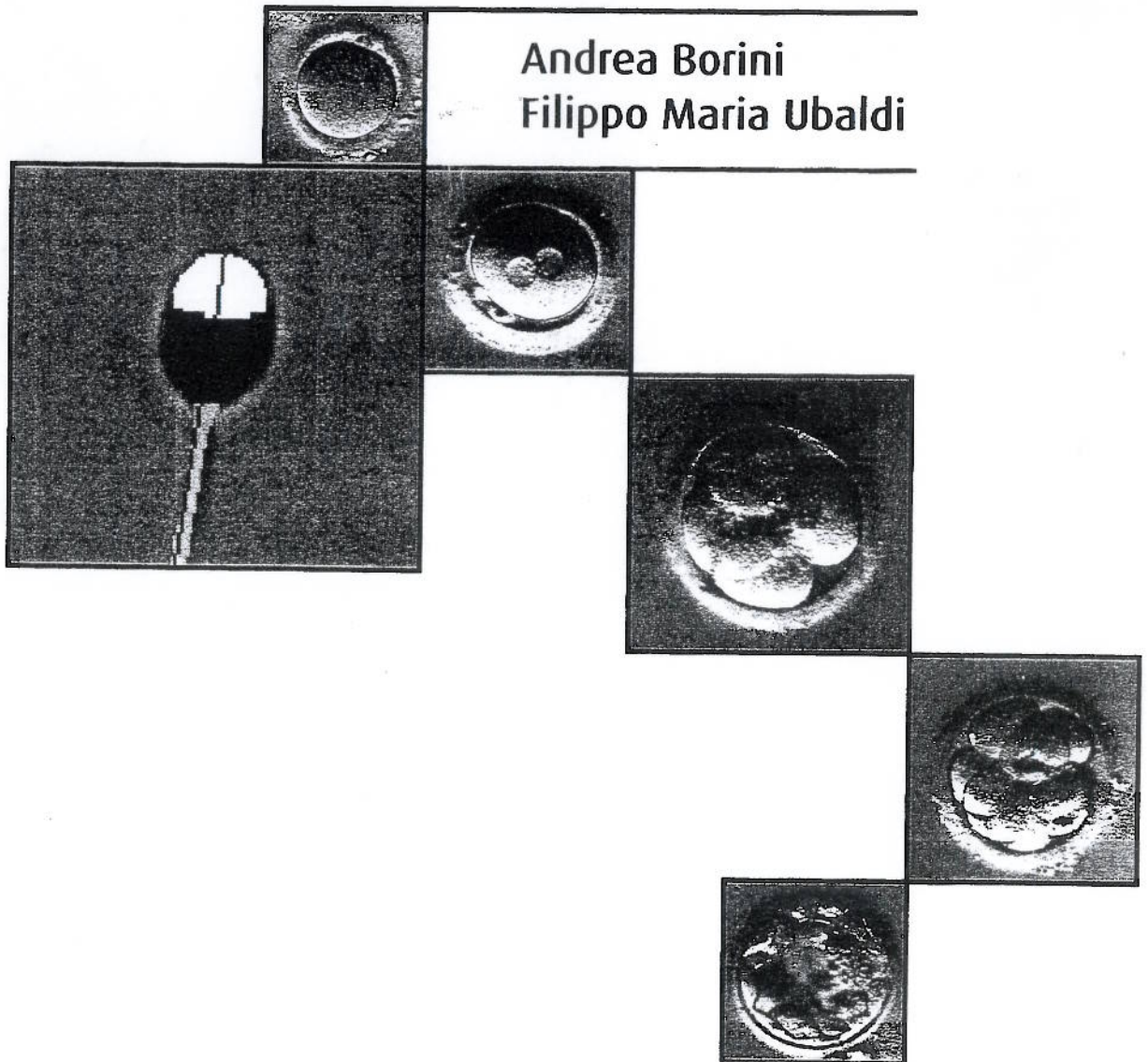
*Publisher copyright claim:*

(Article begins on next page)

della **RIPRODUZIONE**  
**UMANA**

Editors

Andrea Borini  
Filippo Maria Ubaldi



CIC Edizioni Internazionali

## Capitolo 32

# Management della patologia infettiva nella coppia sterile

Maria Elisabetta Coccia · Francesca Rizzello

Ultima decade i Centri di Riproduzione Assistita hanno visto crescere la domanda di assistenza riproduttiva da parte di coppie in cui almeno uno dei due partner è affetto da malattia infettiva, principalmente HCV, HBV. Queste coppie si rivolgono ai centri che offrono riproduzione umana non solo per eventuali problemi di fertilità, spesso coesistenti, ma anche per la consapevolezza del rischio di trasmissione dell'infezione al partner e al prodotto del concepimento.

Il Comitato Etico dell'American Society for Reproductive Medicine (ASRM) ha stabilito che non è etico per i centri di infertilità esimersi dal trattamento di coppie affetti da infezioni croniche virali, incluse coppiette affette da infezione da HIV. Nel caso in cui il centro non sia in grado di gestire tali coppie, è tenuto a rimandare ad inviarle a centri di riferimento (1).

Anche il nostro Paese si è mostrato sensibile alle problematiche infezioni/riproduzione e tra le principali novità introdotte dal Ministero della Salute, con il decreto del 19 Aprile 2008, vi è l'estensione della possibilità di ricorrere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) anche alle coppie in cui l'uomo sia portatore di malattie virali sessualmente trasmissibili, sia infezioni da HIV che epatiti B o C. Il Ministero della Salute riconosce pertanto che tali condizioni rientrano nei casi di infertilità da causa accertata e certificata da un medico (previsti dall'art. 4 del DM 21 Luglio 2004) ai quali è concesso il ricorso alla PMA. Esiste, infatti, un elevato rischio di infezione per la madre e il feto conseguente a rapporti sessuali non protetti con il partner sieropositivo, rischio che di fatto, preclude a queste coppie la possibilità di avere un figlio.

Inoltre, i centri ai quali si affidano tali coppie per la riproduzione assistita devono essere in grado di ef-

fettuare la ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) e lo *sperm-washing* per ridurre il rischio di contaminazione (Consiglio Superiore di Sanità Sessione XLVI Seduta del 19 luglio 2007).

I centri di PMA che si vorranno dedicare al percorso assistenziale delle coppie con infezioni sessualmente trasmissibili, dovranno garantire strutture idonee ed operatori con adeguato training. L'approccio a queste coppie presenta infatti una complessità dal punto di vista metodologico in quanto l'iter assistenziale, e lo stesso counseling, prevedono il coinvolgimento ed il confronto di diverse figure specialistiche: il fisiopatologo della riproduzione, l'infettivologo, lo specialista di gravidanze ad alto rischio, il tossicologo, il perinatologo. Inoltre, solo una pragmatica modalità applicativa di misure e norme di prevenzione all'interno del programma di PMA potranno assicurare una tutela non solo dei gameti e degli embrioni ma anche del partner, degli utenti e degli operatori coinvolti.

Dagli iniziali consensus intersocietari ai più recenti reports su questo specifico argomento, abbiamo provato ad individuare un percorso di management basato su evidenze scientifiche riguardo al trattamento sia delle coppie infette con problemi di fertilità, sia di coppie che vorranno utilizzare la PMA quale tecnica per evitare di infettarsi.

### EPATITE B

Il virus dell'epatite B (HBV) appartiene alla famiglia degli Hepadnavirus. L'involucro esterno è costituito dall'antigene di superficie (HBsAg), il genoma è costituito da DNA circolare in parte a doppia elica.

La Tabella 32.1 illustra le caratteristiche cliniche dell'infezione da HBV la cui conseguenza più grave è l'instaurarsi dell'infezione cronica (HBsAg misurabile nel siero per più di 6 mesi). I soggetti infetti cronicamente non solo rappresentano un reservoir per la trasmissione dell'infezione, ma presentano anche un alto rischio di complicanze. Infatti, l'associazione tra l'infezione da HBV ed il cancro epatico è molto alta ed il virus B è secondo solo al tabacco come fattore di rischio riconosciuto per l'insorgenza del cancro (1).

L'infezione da virus dell'epatite D (HDV), un virus a RNA circolare difettivo che richiede la presenza dell'HBV per replicarsi, può svilupparsi contemporaneamente all'infezione da HBV (coinfezione) o in pazienti con un'infezione da HBV preesistente (superinfezione). Approssimativamente il 25% dei portatori cronici di HBV è coinfectato con HDV che aumenta il rischio di cirrosi dal 15% all'80%. È stata documentata la trasmissione verticale dell'HDV. Dal momento che il virus D richiede la presenza dell'HBV per replicarsi, le misure per prevenire la trasmissione dell'HBV saranno utili a prevenire l'infezione del virus difettivo (2).

### Epidemiologia

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization, WHO*) stima che 2 miliardi di persone presentano evidenza sierologica di infezione da HBV passata o presente, 350 milioni hanno un'infezione cronica e 4 milioni sono le nuove infezioni acute che si verificano ogni anno (3,4).

Nel 1985 in Italia è stato istituito il Sistema Epidemiologico Integrato per le Epatiti Virali Acute (SEIEVA) coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. Il nuovo sistema ha evidenziato subito una notevole riduzione dell'incidenza dell'infezione da HBV da 12/100.000 a 5,1/100.000 casi nel corso del periodo 1985-1991, riportando il più alto numero di casi tra gli individui tra i 15-24 anni e tra i soggetti di sesso maschile. Dal 1991, la legge italiana prevede l'obbligo della vaccinazione anti-epatite B per tutti i nuovi nati con inizio al terzo mese di vita e l'obbligo di screening per HBsAg delle gestanti al terzo trimestre di gravidanza al fine di immunizzare i neonati di madri positive.

### Modalità di trasmissione

Il virus dell'epatite B è principalmente trasmesso attraverso l'esposizione delle mucose al sangue o altri

**Tabella 32.1. Epatite B: caratteristiche cliniche**

Periodo di incubazione	Media 60-90 giorni Range 45-180 giorni
Sintomi (Ittero)	<5 anni < 10% ≥ 5 anni 30-50%
Mortalità in fase acuta	0,5-1%
Cronicizzazione	< 5 anni 30-50% ≥ 5 anni 2-10%
Morte per cirrosi	15-25%

fluidi (saliva, bile, secrezione nasale, lacrime, sperma, muco vaginale) delle persone infette. La trasmissione avviene principalmente per via parenterale, attraverso i rapporti sessuali, ma anche attraverso la saliva. Il virus ha pari potenziale infettivo anche per via di essiccamento extracorporeo. Un rapporto sessuale con un soggetto affetto da epatite B acuta comporta il rischio di infezione del 25% circa (2).

### HBV nel liquido seminale

La possibilità di trasmettere l'infezione da HBV attraverso il seme è stata dimostrata sperimentalmente in primati (5,6). Probabilmente vi è una trasudazione di fluidi contenenti il virus dalla cavità nasale verso i diversi fluidi corporei più che un'attiva replicazione del virus nel sito di infezione (7).

Nel 1985, Hadchouel et al., osservarono la presenza di HBV DNA negli spermatozoi suggerendo la possibilità di una trasmissione verticale del virus attraverso la linea germinale, oltre che un possibile danno agli spermatozoi, causa di infertilità maschile (8). Ulteriori studi hanno evidenziato una maggiore prevalenza di aberrazioni cromosomiche negli spermatozoi di pazienti con infezione da HBV (14,8% versus 10,2% nel gruppo di controllo), una ridotta motilità e una maggiore proporzione di cellule apoptotiche negli spermatozoi infetti (9). Rimane tuttavia poco chiaro il meccanismo attraverso il quale il virus possa interferire sulla funzionalità del liquido seminale.

### Procedure diagnostiche

In una coppia infertile sarebbe opportuno screening per tutti i marcatori sierologici per epatite B (HBsAg, HBeAg, anti-HBc, anti-HBe e anti-HBs). La Tabella

le possibili interpretazioni dei test sierologici in pazienti con infezione da HBV (2).

In Italia, la vaccinazione contro l'epatite B è raccomandata e offerta gratuitamente alle persone conviventi con portatori cronici di HBV.

L'HBV-DNA è il marker che viene più precocemente rilevato nell'infezione da HBV; la sua presenza è il più sensibile indicatore di una replicazione virale attiva (10, 11). Da questa indagine si può verificare se il portatore infetto è più o meno contagioso, considerando come cut-off un livello sierico di HBV-DNA maggiore o uguale a  $10^4$  copie/ml (12, 13).

La presenza contemporanea del DNA di HBV, di HBsAg e di HBeAg indica un'attiva replicazione virale e un'elevata infettività. Tuttavia, alcuni pazienti possono essere HBeAg-negativi ma continuare a presentare elevati livelli di HBV-DNA o di altri markers di epatite B. Tale evenienza è caratteristica peculiare delle infezioni da mutanti del virus. Questi pazienti sono a rischio di contrarre una malattia più grave e progressiva (14).

Nei pazienti in cui sia documentata un'attiva replicazione virale, è raccomandata una valutazione degli enzimi epatici, e di altri marcatori della funzione epa-

tica, da integrare all'ecografia dell'addome superiore e alla consulenza specialistica di malattie infettive. È molto importante adottare procedure specifiche per i pazienti con differenti espressioni dell'infezione (14).

Secondo alcuni infettivologi, tutte le coppie che accedono ad un centro di PMA dovrebbero sottoporsi a screening anche tramite la ricerca dell'HBV-DNA. Inoltre, in considerazione del lasso di tempo che intercorre tra il momento di effettuazione degli esami ed il momento del trattamento PMA, potrebbe essere utile eseguire la ricerca dell'HBV-DNA pochi giorni prima della procedura, per individuare quei pazienti nei quali gli esami di screening non avessero evidenziato la positività, a causa del periodo finestra. Nella pratica clinica, l'identificazione del DNA di HBV non rappresenta un esame di routine soprattutto a causa del suo costo elevato.

#### Effetti sulla fertilità

Non sono ad oggi disponibili dati certi sulla fertilità nei pazienti con infezione da HBV. Secondo un vecchio studio, l'infezione non influirebbe sulla possibilità di concepire (15). Lam et al. hanno osservato, in un paese endemico come la Cina (con il 20% di portatori cronici

**Tabella 32.2.** Interpretazione dei test sierologici in pazienti con infezione da HBV.

HBsAg	anti HBs	anti HBc	HBeAg	anti HBe	Possibile interpretazione
+	-	IgM	+	-	Infezione acuta, altamente infettante
+	-	IgG	+	-	Infezione cronica, altamente infettante
+	-	IgG	-	+	Infezione acuta tardiva o cronica, bassa infettività
+	+	IgG / IgM	+/-	+/-	1) HBsAg di un sottotipo e anti-HBs eterotipici (frequente) oppure, 2) Processo di siero conversione da HBsAg a anti HBs (raro)
-	-	IgM	+/-	+/-	1) Infezione acuta 2) Finestra anti HBc
-	-	IgG	-	+/-	1) Basso livello HBsAg carrier 2) Infezione passata 3) Falso positivo
-	+	IgG	-	+/-	Recupero da infezione da HBV
-	+	-	-	-	1) Immunizzazione 2) Possibile infezione passata 3) Falso positivo

nella popolazione generale), una prevalenza dell'infezione da HBV tra le donne afferenti alle cliniche di infertilità simile a quella dei rispettivi partners e simile a quella della popolazione ostetrica generale (16). Questa osservazione suggerisce come l'infezione non rappresenti di per sé una causa di infertilità. Lo stesso gruppo ha osservato in 287 coppie sierodiscordanti un inatteso incremento del tasso di gravidanza in caso di Fertilizzazione In Vitro con Embryo Transfer (FIVET) nelle coppie con almeno uno dei due partners positivo per HBV, in contrasto con i risultati precedentemente riportati da Pirwany et al. (16, 17). Lam et al. giustificano tale risultato con la possibile induzione, da parte dell'HBV, di uno stato infiammatorio a livello cervicovaginale superato efficacemente tramite le procedure di FIVET (16).

Riguardo ai possibili effetti sulla qualità del liquido seminale, entrambi gli studi non hanno osservato differenze significative nei parametri dello sperma o in termini di tasso di fertilizzazione tra i soggetti con HBV ed i controlli (16, 17).

### Effetti sulla gravidanza

L'epatite B acuta si osserva in 1-2 /1000 gravidanze, con l'1,5% delle donne gravide portatrici croniche del virus. Ad eccezione dei casi di esacerbazione acuta della malattia, la gravidanza non è controindicata nei soggetti con infezione HBV o HCV. Inoltre, la gravidanza non sembra influenzare il decorso dell'infezione né l'infezione stessa sembra essere causa di complicanze in corso di gravidanza (18). Nelle donne con infezione acuta da HBV, l'incidenza di aborto spontaneo al primo trimestre sembra essere aumentata. Ugualmente, quando l'infezione virale si contrae al terzo trimestre, vi è un'aumentata incidenza di parto pretermine. L'incremento dell'incidenza osservato sia per l'aborto spontaneo che per il parto pretermine probabilmente non è maggiore di quello osservato in altre patologie infettive acute febbrili (2, 19).

### Rischio di trasmissione verticale

La trasmissione al feto può verificarsi in conseguenza dell'esposizione intra-partum, il passaggio transplacentare e l'allattamento. Approssimativamente il 20-30% delle madri HBsAg+ e HBeAg- trasmetterà il virus al proprio neonato in assenza di immunoprofilassi. In donne HBsAg positive ed HBeAg positive, la

frequenza di trasmissione è incrementata al 90% (19).

La possibilità di trasmissione è pure legata all'epoca gestazionale in cui si verifica l'infezione acuta: nel primo trimestre circa il 10% dei neonati sarà HBsAg positivo; nel terzo trimestre, il 90% dei neonati sarà positivo (20).

Occorre inoltre ricordare che alcuni studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che l'HBV può integrarsi negli spermatozoi umani e i geni HBV-mediati delle cellule spermatiche sono in grado di replicarsi ed esprimersi. Questo dato ha spinto a ipotizzare una possibile via di trasmissione padre-neonato dell'HBV (20, 21).

Huang et al., utilizzando colture di ovociti di topo, hanno dimostrato che i plasmidi di HBV-DNA possono attraversare la zona pellucida *in vitro* e integrarsi nel DNA della cellula ospite (22). Nel 1991, embrioni umani furono accidentalmente esposti all'HBV a causa della contaminazione del siero umano presente nel mezzo di coltura. Tutte le madri ebbero l'epatite B al primo trimestre ma in nessuno dei bambini nati fu dimostrato l'HBV-DNA tramite PCR (23, 24). Non sono pertanto ad oggi disponibili dati certi sulla possibilità di trasmissione verticale del virus attraverso questa via né sull'opportunità di escludere i trattamenti nei portatori cronici di HBV.

La somministrazione della vaccinazione per epatite B e di una dose di immunoglobuline entro 24 ore dalla nascita è efficace nel prevenire sia la trasmissione perinatale che lo stato di portatore cronico del virus nell'85-95% dei casi (25-27).

L'allattamento materno non sembra giocare un ruolo importante nella trasmissione del virus nei neonati che ricevono la profilassi (2, 28). Il taglio cesareo, benché proposto come mezzo per ridurre la trasmissione dell'infezione materno-fetale, non è attualmente raccomandato dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) né dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (29, 30).

### Riproduzione assistita in coppie con infezione da HBV

Nel caso in cui entrambi i partners risultino HBV positivi, non è indicata alcuna profilassi. È possibile la PMA dopo aver ricercato i markers HBsAg, HBeAg, HBV-DNA ed aver effettuato un counselling adeguato con entrambi.

Nei casi di coppie discordanti per infezione da HBV, il partner sieronegativo dovrebbe essere

tro il virus. Una volta accertata la presenza di anticorpi anti-HBsAg a titolo ritenuto protettivo ( $> 10$  U/ml) è possibile iniziare il ciclo di trattamento della fertilità (14).

Dal momento che il 95% dei pazienti siero-converte, è molto raro trovare casi in cui il paziente infetto ed il partner siano a rischio di trasmissione dell'infezione (2).

Qualora non ci fosse la siero-conversione sarebbe opportuno effettuare:

1 Donna HBV positiva, Uomo HBV negativo: autoinseminazione o tecniche PMA

2 Uomo HBV positivo, Donna HBV negativa: Inseminazione intrauterina (IUI) o FIVET/ICSI dopo washing dello sperma (14).

È necessario sottolineare che i dati sulla trasmissione dell'HBV e dell'HCV nei campioni per IUI sono limitati. Gli studi condotti ad oggi, che hanno effettuato controlli su sperma di soggetti HBV-DNA positivi dopo lavaggio, hanno evidenziato la negativizzazione del campione di sperma dopo lavaggio (2).

Nei partners maschili HBV-DNA positivi sarebbe opportuno valutare la carica virale del campione spermatico prima e dopo lavaggio. Tuttavia, nei singoli laboratori vi sono difficoltà in quanto le metodiche oggi in uso nei laboratori sono validate solo su siero.

## EPATITE C

Il virus dell'epatite C (HCV) è un RNA-virus a singola elica e appartiene alla famiglia dei Flaviviride. Fino a oggi sono stati identificati almeno 6 principali genotipi di HCV.

L'infezione acuta da HCV è spesso asintomatica ed è raramente associata con l'epatite itterica. La trasmissione può avvenire da soggetti sintomatici con epatite acuta o cronica, ma principalmente è dovuta a portatori asintomatici, in assenza di segni clinici di infezione o alterazioni dei marcatori ematologici (Tabella 32.3). La principale complicazione dell'infezione è la cronicizzazione, che avviene nel 60-80% (1, 14).

### Epidemiologia

Il virus HCV riguarda più dell'1% della popolazione nel mondo con un tasso di incidenza stimato di circa 1 su 100.000 anni/persona (2). In particolare, la prevalenza

**Tabella 32.3.** Epatite C: caratteristiche cliniche.

Periodo di incubazione	Media 6-7 settimane Range 2-26 settimane
Infezione acuta	$\leq 20\%$
Mortalità in fase acuta	Bassa
Cronicizzazione	60-80%
Cirrosi	10-20%

è stimata essere dell'1,8% negli USA, dell'1,5% in Europa (31).

In Italia, il virus dell'HCV ha avuto una particolare diffusione negli anni 1945-1969. I soggetti positivi per HCV-RNA hanno raggiunto un picco intorno al 1970 e la loro prevalenza era del 3,2% nel 2005, con il 58% al di sopra dei 65 anni (32). La prevalenza dell'epatite C nella popolazione generale mostra molte variazioni per zona ed età (in particolare, il range varia dal 2,4% nel Lazio al 16,3% in Campania) (14).

### Modalità di trasmissione

L'HCV si trasmette principalmente attraverso l'esposizione parenterale (derivati ematici, aghi infetti, ferite aperte). Il virus è stato anche riscontrato in saliva, urine, sperma, secrezioni vaginali, latte materno e liquido follicolare (1, 2). Si stima che in circa il 40-50% dei casi la via d'infezione resti indeterminata (31).

In relazione alla trasmissione sessuale, nella generalità dei casi, il livello degli anticorpi anti-HCV nei partner di soggetti positivi per HCV è leggermente al di sopra della media della popolazione generale. L'esposizione dei coniugi agli stessi fattori di rischio (siringhe infette, lame, ferite aperte), rappresenterebbe l'elemento principale di contagio rispetto alla trasmissione sessuale. Il partner maschile infetto sembra comportare un maggior rischio di trasmissione rispetto al partner femminile positivo (14).

Secondo il più recente *Educational Bulletin* dell'ASRM, essendo la trasmissione per via sessuale ancora argomento di discussione, l'uso del condom nelle coppie sierodiscordanti per HCV, in particolare in quelle sessualmente attive, senza richiesta di gravidanza, deve essere raccomandato (2).

### HCV nel liquido seminale

Numerosi studi hanno esaminato lo sperma di pazienti

infetti da HCV con risultati contrastanti. Mentre alcuni Autori non hanno potuto documentare l'HCV-RNA nello sperma, altri al contrario ne hanno identificato la presenza (31). Queste discrepanze sono riferibili all'uso di differenti tecniche molecolari, alla sensibilità dei test impiegati, al vasto range di protocolli impiegati per l'estrazione dell'RNA; infine, la presenza nello sperma di inibitori della lattoferrina, perossidi e, principalmente, di residui di zinco, può interferire con l'azione della Tag polimerasi.

I vari Autori, tramite l'impiego di PCR convenzionale o real-time, hanno riportato una prevalenza di HCV-RNA nel plasma seminale di uomini con infezione cronica da HCV che varia dal 15% a più del 30% in pazienti coinfectati con HIV. Nonostante il fatto che circa un quarto dei campioni di plasma seminale di uomini con infezione cronica da HCV contenga HCV-RNA, la via sessuale e quella verticale materno-fetale sono probabilmente modalità secondarie di trasmissione (2). È stata osservata una correlazione positiva tra la presenza dell'HCV-RNA nel seme ed una carica virale elevata nel sangue. Levy et al. hanno osservato come la concentrazione virale nel plasma seminale vari rapidamente nel tempo. Questa variabilità è un punto critico e comporta, sul piano pratico, la necessità di testare singolarmente ogni campione di plasma seminale per la presenza di HCV-RNA prima dell'impiego nelle tecniche di riproduzione assistita (33).

Un altro aspetto importante è la rapida riduzione della carica virale nel liquido spermatico dopo l'introduzione del trattamento antivirale (IFN e ribavirina). Sfortunatamente, come di seguito descritto, tali farmaci non possono essere raccomandati prima della PMA, in quanto la ribavirina si è dimostrata produrre seri danni alla spermatogenesi (31).

### Procedure diagnostiche

A differenza dei protocolli italiani di assistenza alla gravidanza, le linee guida americane non suggeriscono di effettuare lo screening per HCV su tutte le donne in gravidanza ma solo nei gruppi appartenenti a categorie a rischio. Al contrario, supportano lo screening di routine nelle coppie che accedono ai centri di infertilità. Questo, infatti, consente di identificare eventuali pazienti asintomatici che possono beneficiare della terapia antivirale prima del concepimento e ricevere un counseling adeguato. Inoltre il Centro è in grado di

adottare le misure di sicurezza per evitare la contaminazione in corso di PMA (2).

In entrambi i partners vanno ricercati inizialmente gli anticorpi anti-HCV. Se uno o entrambi risultano positivi è opportuno ricercare l'HCV-RNA, con almeno due valutazioni ed eventualmente richiedere una consulenza infettivologica.

Disponiamo oggi di numerosi test per lo screening dell'infezione da HCV. La prima generazione del test ELISA ha dimostrato una scarsa sensibilità nella diagnosi precoce dell'infezione da HCV e aveva una percentuale di falsi positivi del 50-70%. La sensibilità dei test di terza generazione supera il 95% e riduce la finestra di sieronegatività a 8 settimane. Per l'ELISA rimane comunque il problema della bassa specificità con il 15% - 60% di falsi positivi in pazienti asintomatici nell'ambito di popolazioni a bassa prevalenza (<10%). Risulta pertanto necessaria la conferma della diagnosi con un test supplementare, indipendente, che presenti un'alta specificità (2).

Ad oggi, la presenza di RNA virale è il gold-standard per fare diagnosi di epatite C. La via più sensibile per la ricerca dell'HCV-RNA è rappresentata dalla PCR che permette la valutazione quantitativa della carica virale, utile pertanto nel monitoraggio di pazienti in terapia (2). Recentemente è stata proposta la nested-PCR, che permette di individuare fino ad una singola copia di virus nel campione. In particolare è stata proposta quale metodica di scelta nella valutazione dello stato infettivo non solo nel siero bensì anche nello sperma e nel tessuto testicolare prima e dopo washing (34).

Già dopo 1-2 settimane dal contagio è possibile mediante PCR, ricercare l'RNA virale. Invece gli anticorpi anti-HCV compaiono più tardivamente, tanto da poter risultare negativi all'inizio dei sintomi (14). Secondo alcuni infettivologi, sarebbe dunque opportuno screenare tutte le coppie infertili ricercando l'HCV-RNA e ripetere l'esame 10-15 giorni prima dell'impiego delle tecniche PMA.

### Trattamento

Ad oggi la combinazione di ribavirina e interferone peghilato è il trattamento raccomandato per prevenire le complicanze dell'infezione da HCV. La durata raccomandata del trattamento varia da 24 a 48 settimane a seconda del protocollo impiegato. L'associa-



zione ribavirina e interferone peghilato risulta in un'eradicazione persistente dell'infezione nel 40-50% dei casi (35).

Sfortunatamente, questa terapia comporta importanti effetti collaterali come tossicità ematologica, depressione, sintomi simil-influenzali, fatica, nausea. Inoltre entrambi questi farmaci sono controindicati in gravidanza (2).

Una review della letteratura ha mostrato come l'uso di IFN- $\alpha$  nella gravidanza precoce non ha avuto effetti teratogeni in 23 casi. Si pensa che la mancanza di effetti teratogeni sia dovuta semplicemente al fatto che l'IFN- $\alpha$  non attraversa la placenta. Ad oggi comunque l'IFN- $\alpha$  è considerato un farmaco di Categoria C e non se ne consiglia l'uso in gravidanza. La ribavirina è invece una categoria di farmaco altamente teratogeno ed embriocida in tutte le specie animali (Categoria X) ed è assolutamente controindicato in donne in gravidanza, in quelle desiderose di gravidanza e nei rispettivi partner maschili (36,37). Uno studio recente ha osservato anomalie qualitative e quantitative della spermatogenesi durante il trattamento, con un indice di frammentazione del DNA alterato anche a 8 mesi dalla fine del trattamento, suggerendo così l'allungamento del periodo di contraccezione da seguire (38).

### Effetti sulla fertilità

La presenza dell'HCV nello sperma non sembra alterare i parametri seminali, tantomeno la positività al virus in uno o entrambi i partner sembra alterare l'outcome della PMA (31).

### Effetti sulla gravidanza

La siero prevalenza di HCV nella popolazione prenatale negli USA è stimata essere del 2,3-4,5%. Tra le pazienti HIV positive, la siero prevalenza sale al 33%. Entrambe le stime sono considerevolmente maggiori rispetto a quelle osservate nella popolazione generale e questo evidenzia l'importanza del ruolo del ginecologo-ostetrico nell'identificazione e management delle donne HCV positive (2, 39).

Conosciamo ancora poco sugli effetti dell'infezione sulla gravidanza, tuttavia sembra che la maggior parte delle pazienti sia asintomatica e meno del 10% presenti aumento delle transaminasi (1,2).

### Rischio di trasmissione verticale

Il rischio di trasmissione verticale è stato stimato del 5-6% dei casi di madre HCV-RNA positiva e anti HIV-negativa. In caso di donna HCV positiva e HCV-RNA negativa, il rischio di trasmissione al neonato è molto basso (meno dell'1%): pertanto non vi sono particolari limitazioni alla PMA (2, 14).

Il rischio sembra essere correlato alla viremia materna: aumenta nei casi di coinfezione da HIV o uso di droghe endovena. Nelle donne HCV-positivo il rischio aumenta considerevolmente quando il titolo virale materno supera le  $10^6$  copie/ml. Non è chiaro se la trasmissione avvenga in utero, intrapartum o in entrambe le vie (2, 14).

Il ruolo dell'allattamento nella trasmissione verticale dell'HCV è stato a lungo argomento di dibattito. Infatti il virus è stato isolato dal colostro di pazienti viremiche, sebbene in concentrazione ridotta ( $10^2$ - $10^4$  copie/ml) rispetto a quella riscontrata nel siero ( $10^4$ - $10^8$  copie/ml). Tuttavia non è stata mai dimostrata l'infezione in corso di allattamento. Ugualmente l'efficacia del taglio cesareo elettivo nel ridurre la trasmissione del virus dell'epatite C al feto non è ancora stata provata (29, 40, 41).

### Riproduzione assistita in coppie con infezione da HCV

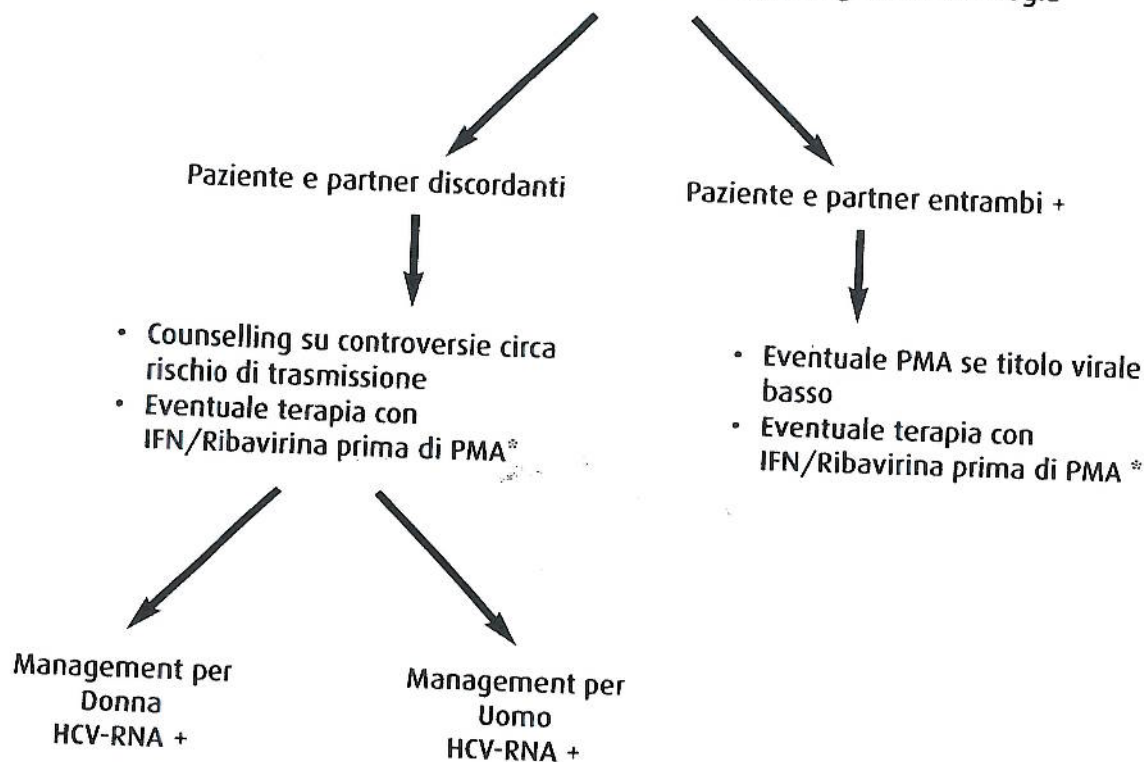
Dopo aver confermato lo stato di infezione da HCV con ricerca di HCV-RNA e misura del titolo virale, è opportuno vaccinare paziente e partner contro HAV e HBV se non immune, eseguire gli esami di funzionalità epatica e una consulenza infettivologica e gastroenterologica (Figura 32.1).

Si possono presentare i seguenti scenari:

1. Donna HCV positiva, Uomo HCV negativo: autoinseminazione o tecniche PMA
2. Uomo HCV positivo, Donna HCV negativa:
  - a) Se RNA virale ematico negativo, non vi sono rischi per la PMA
  - b) Se RNA virale ematico positivo, possibile, anche se remoto, rischio di trasmissione dell'infezione alla donna. IUI o FIVET/ICSI dopo washing dello sperma (2).

Indicata la ricerca dell'HCV nel liquido seminale, seppur con le limitazioni sopra indicate. Mentre non esiste ancora un vaccino per trattare il neonato infetto da HCV, oggi è possibile trattare l'infezione della

1. Conferma stato infezione da HCV con ricerca HCV-RNA
2. Misura titolo virale ed eventuale genotipizzazione
3. Test infettivo per HCV al partner
4. Vaccinare paziente e partner contro HAV e HBV se non immune
5. Testare HIV status
6. Esami funzionalità epatica e consulenza infettivologica e gastroenterologia



\* Evitare la gravidanza nel corso del trattamento e per i primi 6-8 mesi dopo la fine della terapia in entrambi i partners

Figura 32.1. Management della coppia con infezione da HCV.

donna prima della gravidanza. In tutti i casi di infezione, la coppia, dopo essere stata adeguatamente informata su modalità e tempi di trattamento dell'infezione, potrebbe prendere in considerazione il trattamento con Ribavirina e INF prima della PMA, in relazione anche alla carica virale, così da ridurre il rischio di trasmissione del virus. In questo caso, si renderebbe necessario procrastinare la gravidanza a 6-8 mesi dal termine dell'assunzione dei farmaci (2, 38).

Come precedentemente sottolineato, i dati sulla trasmissione dell'HCV nei campioni per IUI sono limitati. Uno studio ha valutato la concentrazione di HCV-RNA nel siero, nel liquido seminale e nella frazione di sperma ottenuta dopo preparazione con gradiente di densità. L'HCV-RNA è stato riscontrato nel

5% (2/39) dei campioni di liquido seminale e nello 0% dei campioni dopo preparazione con gradiente di densità (42).

I dati sul ricorso a PMA con spermatozoi testicolari da uomini con infezione da HCV sono ridotti. In questi casi la contaminazione con il sangue incrementa certamente la carica virale e quindi il rischio di trasmissione dell'HCV rispetto alle procedure che impiegano lo sperma eiaculato e purificato con gradiente selettivo e swim-up.

Manno et al. hanno riportato di un caso di TESI (Testicular Sperm Extraction)/ICSI in una coppia sierologicamente discordante per HCV con HCV-RNA nel plasma seminale nel quale il partner femminile non ha sierconvertito dopo PMA (43).

## VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA (HIV)

Il virus dell'immunodeficienza umana, HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), è responsabile della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). È un retrovirus del genere lentivirus. Il materiale genetico del virione è costituito da due copie di RNA legate a due proteine basiche denominate p7 e p9.

Si conoscono due ceppi dell'HIV: HIV-1 ed HIV-2. Il primo dei due è prevalentemente localizzato in Europa, America ed Africa centrale. HIV-2, invece, si trova per lo più in Africa occidentale ed Asia e determina una sindrome clinicamente più moderata.

La storia naturale dell'infezione da HIV è caratterizzata da una progressiva deplezione dei linfociti CD4+ che provoca un grave deficit immunitario favorendo l'insorgenza di infezioni opportunistiche e tumori responsabili dei decessi (1, 14).

### Epidemiologia e desiderio di un figlio

Globalmente si stima che nel 2007 l'infezione da HIV interessasse circa 33 milioni di persone (30 milioni-36 milioni). Il numero annuale di nuove infezioni è diminuito da 3.0 milioni (2.6 milioni-3.5 milioni) nel 2001 a 2.7 milioni (2.2 milioni-3.2 milioni) nel 2007 (44).

Nell'ottobre del 2008, i CDC hanno pubblicato nuove stime sulla diffusione dell'infezione da HIV alla fine del 2006. Negli USA 1.106.400 adulti e adolescenti erano positivi al virus (IC 95%: 1,056,400-1,156,400). Il 70% aveva un'età compresa tra i 25 ed i 49 anni (45).

L'incidenza dell'infezione HIV è aumentata a metà degli anni '90 per poi calare lentamente e stabilizzarsi dal 2000. Tuttavia, il numero totale è aumentato come risultato sia delle nuove infezioni che degli effetti benefici delle nuove terapie antivirali. Infatti, grazie all'applicazione diffusa della HAART (*highly active antiretroviral therapy*), l'aspettativa di vita degli individui colpiti dall'HIV è notevolmente incrementata, passando da una età media di 45 anni a una media di 65 anni con il 50% degli adulti infetti donne (46, 47). L'Africa Sub-Sahariana rimane la regione più colpita dall' HIV, con il 67% circa della popolazione positiva per il virus ed il 72% delle morti per AIDS nel 2007 (44).

### Modalità di trasmissione

Esistono tre diverse modalità di trasmissione dell'HIV:

via ematica, via sessuale, via materno-fetale. Il rischio di trasmissione dell'infezione attraverso rapporti non protetti nelle coppie discordanti è stato stimato attorno al 4,3% o come rischio di 1 su 1000 rapporti (48, 49). Nelle coppie stabili, il rischio varia tra lo 0,1 e lo 0,5% (50).

### HIV nel liquido seminale

Il seme da solo, indipendentemente da ogni contatto sessuale è in grado di veicolare l'infezione e la possibilità di trasmissione appare simile a quella osservata tramite rapporto sessuale.

I CDC stimano che tra il 1980 ed il 1984, quando ancora non veniva eseguito uno screening sui donatori, né tantomeno si poneva in quarantena lo sperma donato, furono infettate tra 8 e 141 donne con sperma da donatore (51).

Numerosi studi mostrano una correlazione tra infettività e carica virale; questo è dimostrato per qualunque via di trasmissione. Da queste osservazioni non bisogna trarre la pericolosa conclusione che, in caso di carica virale ridotta o non misurabile, il rischio di trasmissione scompaia. Infatti è noto come vi sia scarsa relazione tra la carica virale ematica e la concentrazione spermatica. Il compartimento spermatico, rispetto al sangue, sembra avere una certa autonomia periferica: vi è replicazione locale (presenza di DNA ed RNA virale nello sperma), con una concentrazione virale maggiore o inferiore rispetto a quella plasmatica, con ceppi virali differenti e con caratteristiche di resistenza indipendenti. Inoltre vi sono dati scarsi riguardo alla variabilità della carica virale del seme in pazienti altrimenti considerati stabili (50).

La presenza di particelle virali è stata dimostrata nella componente plasmatica dello sperma in forma libera, nella componente cellulare e nel compartimento intracellulare (50).

Non vi è ancora accordo unanime riguardo alla possibilità dello spermatozoo di agire di per sé come vettore del virus. D'altra parte, è dimostrato come i metodi di preparazione del liquido seminale, attualmente testati e validati, siano in grado di ridurre la carica virale a livelli non misurabili dalle tecniche di laboratorio più sensibili.

### Procedure diagnostiche

È possibile fare diagnosi di infezione da HIV tramite

uno dei seguenti metodi: ricerca degli anticorpi rivolti contro il virus; ricerca dell'antigene p24; ricerca degli acidi nucleici virali (NAT, *nucleic acid amplification testing*) (52, 53, 54). I test più diffusamente impiegati nella pratica clinica si basano sulla ricerca di anticorpi contro gli antigeni dell'HIV nel siero.

I test specifici per la ricerca degli anticorpi anti-HIV più diffusi sono il test Elisa e il metodo Western Blot. Il primo viene usato come test preliminare mentre il secondo come test di conferma (ISS, 2009).

La determinazione della carica virale è attualmente impiegata di routine nel management delle pazienti HIV positive. Il livello di HIV-RNA in circolo si è infatti dimostrato predittore del tempo di progressione verso l'AIDS o il decesso; è un utile indicatore del momento più opportuno per l'inizio della terapia antiretrovirale e per il monitoraggio della stessa; in situazioni specifiche, l'infezione del neonato e l'infezione acuta, è l'unico metodo per fare diagnosi.

La Food and Drug Administration (FDA) ha approvato cinque test commerciali per quantificare l'HIV-1 RNA nei campioni di plasma. La nuova real-time RT-PCR offre numerosi vantaggi: è un test sensibile (40-50 copie/mL) con un ampio intervallo lineare (6log10). Attraverso metodi che rimuovono le sostanze che possono inibire l'amplificazione (55), è possibile adottare tale tecnica anche su altri campioni di materiale biologico, incluso il plasma, il liquido cerebrospinale, il sangue, le cellule, il liquido seminale e le secrezioni cervicali.

### Trattamento

I farmaci antiretrovirali, attualmente in uso nel nostro Paese, appartengono a tre differenti classi: Inibitori Nucleosidici della Trascrittasi Inversa (NR-TI), Inibitori Non Nucleosidici della Trascrittasi Inversa (NNR-TI), ed Inibitori della Proteasi (IP) a seconda del meccanismo di azione nell'inibire la replicazione virale. Il loro utilizzo in associazione HAART ha permesso di raggiungere la soppressione del livello di viremia plasmatica dell'HIV, considerata indosabile al di sotto delle 40 copie/ml e la conseguente ricostituzione immunitaria sia qualitativa che quantitativa. L'aumento del numero dei linfociti CD4 ha portato al miglioramento clinico dei pazienti con un minor rischio di contrarre infezioni opportunistiche ed un declino delle morti per AIDS. Tuttavia non è ancora ben noto l'effetto teratogeno dei farmaci anti-HIV.

### Effetti sulla fertilità

Gli studi fino ad oggi condotti sugli effetti dell'infezione a livello della capacità riproduttiva sono limitati. Numerosi fattori sono stati chiamati in causa circa una possibile influenza dell'infezione da HIV sulla fertilità sia nell'uomo che nella donna.

Peraltro, l'aumentata incidenza di infezioni che caratterizza tale patologia può essere anch'essa correlata ad una riduzione della fertilità in entrambi i partner, in particolare nei casi di infezioni coinvolgenti l'apparato genitale. Ulteriori fattori chiamati in causa vengono correlati ad abitudini di vita quali l'uso di droghe, il consumo di alcool, il fumo (50).

In particolare, nelle donne, se alcuni studi sembrano indicare un'aumentata frequenza di disturbi mestruali in pazienti con stadio avanzato dell'infezione da HIV, altri non confermano tali reperti. Chirgwin et al. hanno descritto un'aumentata incidenza di amenorrea nelle pazienti HIV positive, indipendente dal numero di CD4+ o dallo stadio della malattia, ma correlato positivamente con lo stile di vita (pregresso uso di droghe endovena) (56). Alcuni studi condotti in regioni africane suggeriscono una minore probabilità di gravidanza in donne affette da HIV. È stata riportata inoltre una maggior prevalenza di insufficienza ovarica senza effetto apparente della terapia antiretrovirale (57).

Tuttavia bisogna sottolineare il limite dei dati oggi disponibili ed i numerosi biases. Le donne con AIDS spesso presentano disordini endocrini che possono avere ripercussioni importanti sulla capacità riproduttiva. Inoltre, le terapie antiretrovirali, soprattutto gli inibitori delle proteasi, sono note per avere effetti sul metabolismo lipidico e sulla resistenza all'insulina e pertanto possono avere effetti sulla follicologenesi e sul processo di regolazione dell'ovulazione (50).

Nell'uomo HIV positivo è stata osservata la presenza di ridotti livelli di testosterone nonché un'aumentata incidenza di anomalie del seme. In particolare è stato evidenziato come il progredire della malattia e la riduzione dei linfociti CD4+ fosse correlata ad una riduzione della motilità spermatica, del numero di spermatozoi e delle forme normali mentre l'impiego di terapie antiretrovirali conduceva ad un miglioramento della qualità del seme (50). È stato infatti dimostrato che i trattamenti antivirali comportano una riduzione della carica virale nello sperma (58).

Un recente studio longitudinale di coorte ha esam-

zato i campioni di sperma in 34 pazienti HIV-positivi che dovevano iniziare diverse terapie antiretrovirali, prima della terapia e, successivamente, a 4, 12, 24, 36 e 48 settimane. La terapia antiretrovirale combinata è risultata avere effetti negativi sulla percentuale di motilità progressiva degli spermatozoi. Quanto tale effetto influenzi a sua volta la possibilità di concepire spontaneamente rimane argomento di studio (59). Inoltre, ad oggi, non disponiamo di dati certi su un ipotetico rischio teratogeno dei farmaci impiegati nell'uomo HIV positivo qualora si ottenesse una gravidanza (50).

Dati recenti, ottenuti mediante PCR in situ e in fase solubile, dimostrano che soggetti HIV-1 sieropositivi possono eiaculare piccole quantità di spermatozoi strutturalmente anormali, che contengono DNA virale al loro interno (60). Questi risultati potrebbero essere irrilevanti per la riproduzione assistita in coppie sierodiscordanti. In questi casi, infatti, le procedure usate per la preparazione degli spermatozoi, consentono di recuperare spermatozoi normoconformati e dotati di motilità. Inoltre, non è stata riportata in letteratura la nascita di bambini infettati da HIV-1 in coppie sierodiscordanti dopo fecondazione assistita. Gli spermatozoi portatori di alterazioni strutturali e positivi per il DNA virale potrebbero quindi essere incapaci di fecondare e/o di generare embrioni vitali.

Circa il 2% di uomini HIV o HCV positivi presenta oligospermia severa e solo l'1% ha una totale assenza di cellule spermatiche nell'eiaculato (61). Inoltre, negli uomini con infezione da HIV in terapia antiretrovirale, in particolare in caso di trattamento con inibitori delle proteasi, sono state evidenziate frequenti disfunzioni sessuali (50).

### **Effetti sulla gravidanza**

Nelle donne asintomatiche, in cui l'infezione è ben controllata, la gravidanza non ne aggrava l'evoluzione, ma favorisce le infezioni opportunistiche che possono avere effetti deleteri sia per la donna che per il feto. In uno studio recente, il decorso della gravidanza non sembra associato a progressione della malattia da HIV. Su più di 350 gravidanze seguite per la comparsa di eventi AIDS, solo due eventi sono stati segnalati in corso di gravidanza, corrispondenti allo 0,1% delle gravidanze [ISS 2008, Not Ist Super Sanità 2008;21(2):11-14].

La HAART in gravidanza ha mostrato di migliorare l'outcome ostetrico, tuttavia è raccomandato uno

stretto monitoraggio delle complicanze e dei possibili effetti tossici (47).

## **HIV E RISCHIO DI TRASMISSIONE VERTICALE**

Lo screening prenatale per l'HIV è raccomandato per prevenire la trasmissione dell'infezione dalla madre al feto. I test disponibili ad oggi per la diagnosi di HIV si sono dimostrati altamente sensibili e specifici, mentre la mancanza o il ritardo diagnostico, rappresentano il principale fattore di rischio per la trasmissione verticale (47).

Le terapie anti-HIV hanno notevolmente esteso la speranza di vita ed i problemi etici che si prospettano sono simili a quelli delle coppie di portatori di danno genetico recessivo autosomico (rischio di 25%), con anemia falciforme o fibrosi cistica, di chi adotta un bambino o usa gameti di donatore. Se la viremia è ridotta fino ad essere "non misurabile" nell'uno e nell'altro partner (meno di 40 copie/ml), la coppia può avere un bambino negativo per HIV (rischio inferiore al 2%) (14).

Le donne HIV positive non trattate hanno un rischio di trasmissione verticale maggiore del 20% in relazione alla viremia. Tuttavia, trattando la donna infetta con zidovudina durante il parto e somministrando una dose supplementare al neonato nelle prime 6 settimane, si riduce il rischio al 5-8%. Tramite la programmazione del parto con taglio cesareo alla 38ª settimana di gestazione ed evitando l'allattamento al seno, il rischio si riduce ulteriormente a meno dell'1% (1, 14, 47). L'amniocentesi è fortemente controindicata in questi casi, in quanto il passaggio dell'ago attraverso la parete addominale aumenta il rischio di trasmissione verticale attraverso il sacco amniotico.

### **Riproduzione assistita in coppie con infezione da HIV**

La ASRM, ha stabilito che, a meno che gli operatori di un centro PMA non dimostrino la mancanza di competenze e mezzi per trattare pazienti HIV positivi in maniera sicura, o i pazienti rifiutino i test ed i trattamenti raccomandati, essi si devono ritenere legalmente ed eticamente tenuti a fornire l'assistenza riproduttiva richiesta. L'ACOG condivide la stessa posizione (62).

Per la complessità e la comorbidità che spesso caratterizzano i pazienti infetti, è consigliabile inviare le coppie sierodiscordanti che fanno richiesta di assistenza, a centri attrezzati con la necessaria esperienza. Difatti, si rende necessario un team multidisciplinare composto da specialisti come il ginecologo fisiopatologo della riproduzione, il medico infettivologo, lo psicologo e di altre figure specialistiche come consulenti. Di pari importanza risulta la specifica organizzazione del laboratorio per garantire la sicurezza della coppia, del prodotto del concepimento, degli operatori e degli altri utenti.

Si presentano di seguito tre possibili scenari:

1. Uomo HIV positivo e Donna HIV negativa
2. Donna HIV positiva e Uomo HIV negativo
3. Entrambi i partners positivi.

### 1. Uomo HIV+ e Donna HIV-

I criteri di inclusione per la coppia, prima di accedere alla PMA, sono la conferma della negatività del partner e l'assenza di infezioni attive del tratto genitale.

Secondo una consensus italiana (47), le procedure da seguire sono le seguenti:

- a) uomo HIV+ normospermico e donna normale: washing dello sperma ed IUI
- b) uomo HIV+ dispermico, o dopo 6 tentativi IUI con HIV+ uomo normospermico: FIVET-ICSI con washing dello sperma.

Prima di procedere alla PMA, sia l'assenza di HIV-RNA sulla frazione separata di sperma che la qualità dello sperma dovrebbero essere verificate. I pazienti con co-infezione da HCV possono essere trattati ma disponiamo ad oggi di pochi dati.

In alcuni studi viene enfatizzato il ruolo della ICSI nel ridurre ulteriormente il rischio di trasmissione del virus in virtù del fatto che con tale metodica viene utilizzato un singolo spermatozoo per ovocita (50, 63, 64). D'altra parte, non tutti gli Autori sono concordi sull'impiego della ICSI come metodica di scelta in queste coppie in quanto:

- i dati di cui disponiamo ad oggi sulle IUI effettuate in coppie discordanti (partner maschile HIV+) sono rassicuranti e non hanno evidenziato in alcun caso il contagio della partner femminile
- la tecnica ICSI è sicura ed efficace in questi casi ma non offre maggiori livelli di sicurezza rispetto alla IUI con washing dello sperma
- rispetto alla IUI, la ICSI comporta un aumentato ri-

schio di iper-stimolo e richiede il pick-up ovocitario, esponendo le pazienti ai rischi ad esso legati

- la micromanipolazione del seme, conseguente appunto alla ICSI, può in qualche modo by-passare il meccanismo di protezione che avrebbe luogo quando la fertilizzazione si verifica *in vitro* o *in vivo* naturalmente (ossia quando lo spermatozoo entra spontaneamente all'interno dell'ovocita)

Secondo Bujan, i pazienti dovrebbero essere informati sulle opzioni di cui disponiamo oggi per ridurre il rischio di infezione e la scelta sulla tecnica PMA dovrebbe essere basata unicamente sullo stato di fertilità dei pazienti (65).

In Italia, secondo le disposizioni del Consiglio Superiore di Sanità, i centri ai quali si affidano coppie in cui l'uomo sia portatore di malattie virali sessualmente trasmissibili, quali HIV, HBV e HCV, devono essere in grado di effettuare la ICSI.

Esistono pochi dati sull'impiego dell'open-TESE negli uomini sieropositivi. Questo può essere dovuto alla convinzione che i campioni TESE, che contengono sangue ed altre cellule diverse da quelle spermatiche, potrebbero presentare un rischio incrementato di presenza di particelle virali. Nei pochi casi riportati, il trattamento TESE-ICSI negli uomini sieropositivi e spermici rappresenterebbe un approccio sufficientemente sicuro ed efficace in associazione alla tecnica ICSI, all'eventuale washing del campione previa conferma dell'assenza del virus tramite *nested-PCR* (34).

### 2. Donna HIV+ e Uomo HIV-

- a) donna HIV+ normale e uomo normospermico: inseminazione 'auto-gestita' in periodo fertile con sperma del partner
- b) partner maschile sub-fertile: IUI
- c) coppia infertile sia da fattore femminile e/o da fattore maschile: FIVET/ICSI in relazione alla qualità del liquido seminale (47).

### 3. Entrambi i partner HIV+

- a) coppia fertile e sub-fertile: washing del liquido seminale; in casi selezionati, ad alto rischio di superinfezione, Carosi suggerisce l'inseminazione artificiale (47)
- b) coppia infertile sia da fattore femminile e/o da fattore maschile: FIVET/ICSI in relazione alla qualità del liquido seminale (47).

## Risultati

Da 1987 numerosi studi di coorte osservazionali hanno riportato i risultati di oltre 4500 procedure di PMA che utilizzavano il liquido seminale da uomini HIV positivi per ottenere la gravidanza in donne HIV negative. Sebbene non vi siano studi controllati randomizzati per valutare l'efficacia di queste procedure rispetto ad altri metodi di concepimento, non ci sono reports sulla trasmissione dell'HIV dalla madre al neonato dopo l'impiego delle tecniche standardizzate di trattamento dello sperma (46).

Nel 1990 il CDC ha riportato un singolo caso di trasmissione del virus HIV al partner femminile da uomo infetto dopo IUI di liquido seminale processato; tuttavia il trattamento iniziale dello sperma sarebbe stato considerato sub-ottimale rispetto agli attuali standard di trattamento (66). Inoltre, un recente studio multicentrico europeo (*European CREATe network*) ha mostrato dati rassicuranti sulle tecniche PMA in 1036 coppie discordanti (65).

## REQUISITI STRUTTURALI, ORGANIZZATIVI E GESTIONALI DEL CENTRO DI PMA PER IL TRATTAMENTO DELLE COPPIE CON INFEZIONE

La prevenzione è estremamente importante per evitare il rischio biologico per gli operatori sanitari e per i pazienti (infetti e non). L'obiettivo è la massima sicurezza ottenibile con gli strumenti ad oggi disponibili. Tale prevenzione sarà effettuata a vari livelli, attraverso l'adeguamento ai criteri delle norme in materie igienico-sanitarie, l'osservanza delle precauzioni standard, e la prevenzione delle lesioni.

Grande attenzione è stata posta all'organizzazione del laboratorio in caso di campioni di pazienti infetti in seguito alla pubblicazione di un case report sulla trasmissione dell'infezione da HCV, da un paziente infetto ad un paziente non infetto, entrambi in trattamento FIVET nella stessa clinica e nello stesso laboratorio (67). Questi casi hanno portato allo sviluppo di una regolamentazione addizionale per la riproduzione assistita in pazienti con epatiti virali o HIV e alla comparsa dei laboratori "viral risk" in Francia nel 2001. Inoltre, la trasmissione dell'HBV da midollo osseo criopreservato

contaminato a midollo osseo HBV negativo ha sollevato la questione sulla possibilità di contaminazione dei campioni di seme e degli embrioni crioconservati (2).

È pertanto essenziale valutare attentamente ogni singolo stadio delle complesse procedure di PMA per garantire la massima sicurezza. Nella pratica clinica, particolare attenzione deve essere riservata all'ecografia trans-vaginale, al recupero ovocitario e all'anestesia (67) e alla manipolazione e stoccaggio del liquido seminale.

## SCREENING PRIMA DELLA PMA

La circolare del Ministero della Sanità n. 17 del 10 Aprile 1992 che stabiliva le misure di prevenzione della trasmissione dell'HIV e di altri agenti patogeni nella donazione di liquido seminale, suggeriva al medico che effettuava tecniche di PMA, l'accertamento delle condizioni di salute dei partners, per assicurarsi che da tali tecniche non derivasse danno; pertanto raccomandava di eseguire gli accertamenti preconcezionali "secondo le indicazioni di una corretta pratica clinica, compresa la ricerca degli anticorpi anti-HIV".

La Commissione Direttiva dell'Unione Europea (2006/17/EC Annex III) ha sottolineato la necessità di adottare misure di screening routinariamente sui pazienti donatori di gameti e su campioni seminali, per HIV, HBV, HCV e altre malattie a trasmissione sessuale prima dell'inizio delle procedure PMA e/o crioconservazione. Le linee guida per il laboratorio FIVET dell'*European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) sottolineano come lo staff preposto al trattamento debba essere messo al corrente di eventuali pazienti/campioni infetti (68).

Il criterio generale di screening indica l'utilità di accertamenti diagnostici quando i risultati permettano di migliorare la prognosi naturale della patologia. Dal punto di vista medico-legale, i medici che trattano pazienti infetti sono coinvolti nella potenziale trasmissione degli agenti patogeni ai nati dopo trattamento PMA o nel contagio di altri soggetti non infetti (partner negativo nelle coppie HIV discordanti o pazienti negativi trattati nella stessa clinica) (69). Nelle procedure di PMA gli accertamenti infettivologici pretrattamento devono pertanto mirare a:

- informare la coppia della possibilità di infezione per

il partner, per il concepito e della possibilità della riduzione del tasso di successo dovute all'infezione stessa o alle modifiche delle procedure assistenziali richieste dalla presenza di microrganismi trasmissibili, tramite apposito consenso informato

- provvedere le misure assistenziali adatte a minimizzare o eliminare il rischio di infezione per il partner o il concepito
- attivare nel laboratorio le misure utili a ridurre il rischio di contaminazione di ambienti, strumenti e personale (68).

Una stima generale del rapporto fra costi di screening e benefici attesi, in considerazione della prevalenza delle infezioni trasmissibili con derivati umani, suggerisce un controllo dei partner abituali per infezione da CMV, HBV, HCV e HIV (oltre a quelli abituali per sifilide, chlamydia e gonorrea) (69).

## IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI NEL LABORATORIO FIVET

Il laboratorio FIVET è una struttura complessa dove ogni cosa è pianificata per creare le condizioni necessarie per la sopravvivenza e coltura delle cellule, condizioni queste ugualmente favorevoli allo sviluppo di virus e batteri.

La possibilità di trattare coppie affette da infezioni virali, come epatiti ed HIV, ha portato alcune cliniche a trattare coppie con infezioni in un laboratorio separato, 'high risk', con strumenti specifici e dedicati per la riproduzione assistita (69).

L'approccio di separazione per il trattamento delle coppie infette e non-infette nello spazio e nel tempo, in Francia è imposto per legge (*Decree about Assisted Reproductive Treatment of Patients with Viral Risks: Journal Officiel de la République Française, May 15, 2001 cited by Ohl et al., 2003*). Alcune cliniche in Francia hanno scelto di separare i casi infetti nel tempo, piuttosto che nello spazio, stabilendo dei giorni/settimane per il trattamento dei soli casi infetti. Questa può essere una buona soluzione quando lo spazio a disposizione è limitato ma non risolve il problema della crioconservazione dei campioni infetti.

Un laboratorio specifico per i pazienti con infezioni dovrebbe seguire le seguenti raccomandazioni strutturali (14, 50, 68):

- definizione di uno spazio di laboratorio con strumentazione dedicata e adattato L2 (con ambiente ermetico, pressurizzato e procedure di accesso in sicurezza) disposto separatamente per il trattamento di materiale biologico (sperma, ovociti, embrioni) proveniente da pazienti con infezioni da HCV, HBV o HIV (Figura 32.2)
- luoghi strettamente limitati in cui il materiale biologico, potenzialmente infetto può circolare
- anticamera separata da una porta a vetri scorrevole, dall'interno del laboratorio come unica comunicazione con l'esterno
- possibilità di aprire solo una porta per volta
- trattamento dei campioni uno alla volta come se fossero contaminati
- cappa a flusso verticale di classe II per evitare esposizione degli operatori a possibili spill o spray durante il trattamento, con il 100% dell'aria filtrata
- microscopio con visione video che garantisca un'area di lavoro sicura al personale addetto
- uso di materiale 'usa e getta'
- superfici di lavoro facilmente lavabili, di materiale non poroso, impermeabili all'acqua
- cartello con sopra scritto 'Bioazard' e le coordinate del responsabile del laboratorio affisso sulla porta del laboratorio
- porte e finestre mantenute chiuse durante ogni tipo di manipolazione
- manipolazione di gameti ed embrioni mediante pipette meccaniche a pressione positiva e punte forniti di filtro anti-aerosol (il pipettaggio a bocca è strettamente proibito)
- coltura embrionaria in micro gocce coperte da strato di olio
- rifiuti inattivati prima di essere rimossi dal laboratorio
- tutto il materiale non 'usa e getta' inattivato prima del lavaggio
- disponibilità di un lavabo, di preferenza automatico
- procedure di sanificazione ambientale e strumentale che tengano conto della sensibilità dei diversi virus ai prodotti inattivanti, ripetuti dopo il trattamento di ogni singolo caso
- ispezione degli aspetti generali per la sicurezza almeno una volta all'anno dal medico igienista, responsabile della Commissione locale di Biosicurezza



rezza e dal responsabile della Commissione interna per la prevenzione e protezione del lavoro.

Ulteriori indicazioni riguardano gli operatori del centro e sono le seguenti (14, 50, 68):

- sono ammessi al laboratorio solo operatori sani e vaccinati per l'epatite B
- il personale deve sottoporsi a periodici corsi di addestramento
- uso di abbigliamento apposito per il laboratorio
- uso di guanti non-tossici (senza polvere) e mascherine quando richiesto
- quando venga maneggiato materiale crio-genico, uso

di protezione per occhi e viso e guanti appositi

- maneggiare con estrema cautela lame e aghi e riporli in appositi contenitori dopo l'uso
- evitare l'uso di materiale in vetro e, se necessario, smaltirlo in appositi contenitori in caso di rottura
- è proibito mangiare, bere, fumare, mettere le lenti a contatto
- limitare l'uso di cosmetici e profumi intensi.

Un laboratorio così organizzato comporterebbe di per sé solo un piccolo incremento degli investimenti necessari all'allestimento di un centro di PMA (50).

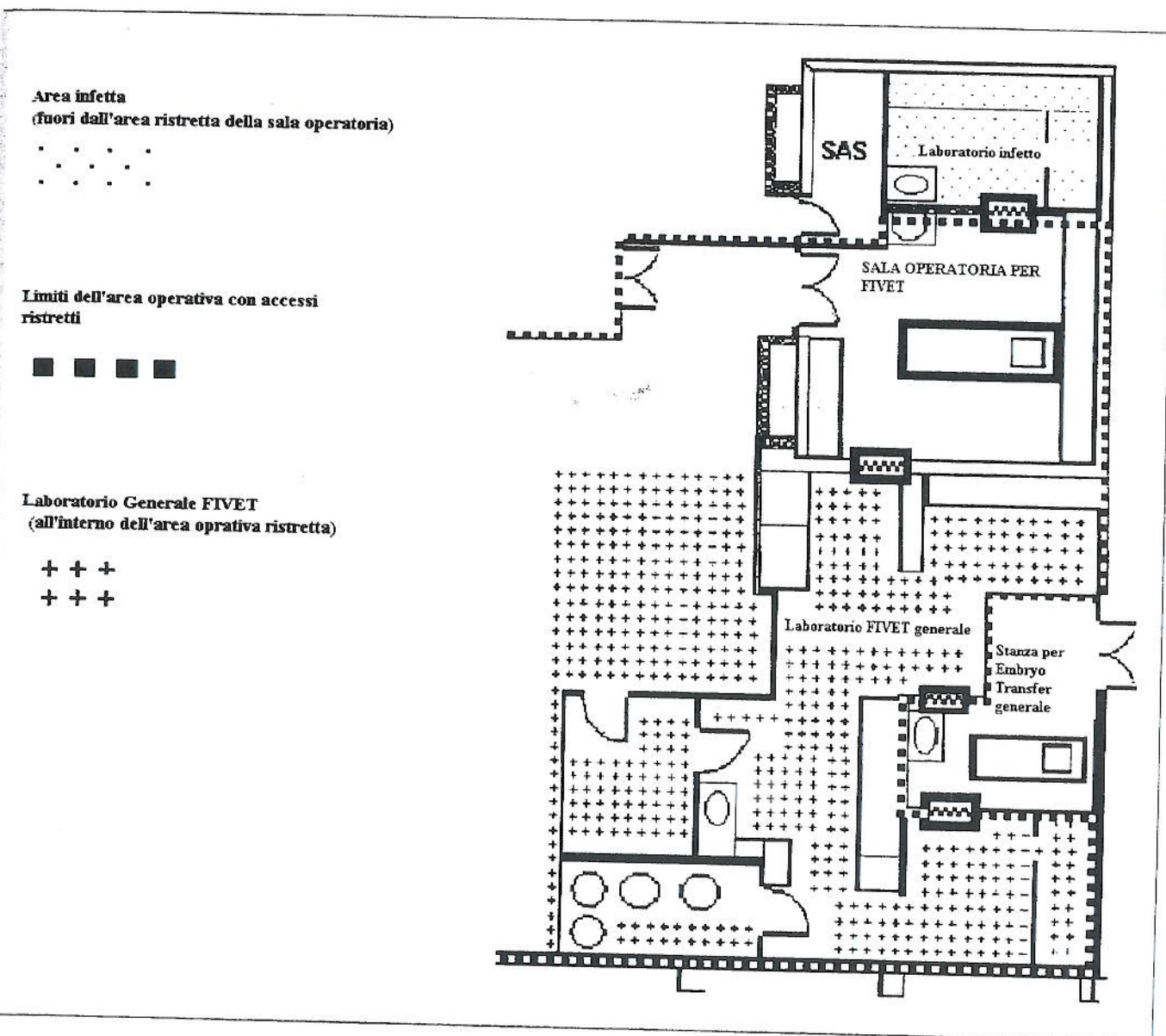


Figura 32.2. Organizzazione del laboratorio (da Englert 2004).

## RISCHIO DI CONTAGIO PER GLI OPERATORI

Il rischio di contagio per gli operatori sanitari che maneggiano materiale infetto è stato valutato 10 volte più alto rispetto alla popolazione generale ed in particolare 3 volte superiore per il personale del laboratorio FIVET rispetto al resto del personale ospedaliero (69).

I CDC, nel 1998, raccomandavano l'adozione di precauzioni universali ovvero maneggiare tutti i campioni come se fossero infetti in tutti i laboratori e in tutti i pazienti (70). Tuttavia, nel caso di agenti infettanti come l'HBV, HCV e HIV, le precauzioni standard di sicurezza presentano dei limiti in quanto esistono delle procedure da seguire quanto prima in caso di esposizione accidentale del personale ad un campione ritenuto bio-pericoloso.

In generale, qualsiasi schizzo sulla cute deve essere lavato immediatamente con sapone e acqua corrente; dalle eventuali ferite invece è necessario far uscire una certa quantità di sangue prima di procedere con il lavaggio sotto acqua corrente. Le mucose devono essere irrorate con abbondante acqua ed è inoltre necessario tenere sempre a disposizione un flaconcino per il lavaggio degli occhi (71).

In particolare, l'HBV è un fattore di rischio occupazionale ormai riconosciuto per tutti gli addetti alla sanità che maneggiano derivati ematici, fluidi corporei, e strumenti clinici, sebbene il rischio da esposizione sia stato ridotto notevolmente dall'impiego del vaccino. La vaccinazione del personale clinico, con la verifica dello stato immunitario ogni 5 anni, è una pratica accettata e diffusa in tutta Europa (69). Ad un operatore che non abbia siero convertito dopo vaccinazione per HBV devono essere somministrate immunoglobuline anti HBV quando accidentalmente esposto al virus. Per operatori eventualmente non vaccinati è consigliato somministrare immunoglobuline entro 1 settimana, 0,06 mL/Kg a dosi multiple ed iniziare la somministrazione delle dosi di vaccino (14).

Nel caso dell'HCV, non è stato identificato nessun tipo di risposta caratterizzata dalla presenza di anticorpi protettivi, successiva all'infezione. Pertanto, dopo esposizione accidentale al virus, la somministrazione di immunoglobuline risulta irrilevante ed inefficace. Allo stesso tempo, i trattamenti con IFN, oltre a non essere approvati, risultano inefficaci. Il trattamento successivo

ad un'esposizione mira alla diagnosi precoce della malattia ed alla rapida valutazione delle possibili opzioni terapeutiche; sembra che somministrare IFN quando si manifestino i primissimi sintomi della malattia possa risultare efficace. Si deve procedere all'esecuzione sul siero del test anti-HCV e del test dell'Alanina-amminotransferasi (ALT) subito dopo l'esposizione, poi dopo 4-6 settimane ed infine dopo 4-6 mesi (14).

Nel caso un operatore del centro sia accidentalmente ferito ed entri in contatto con materiale biologico proveniente da paziente infetto da HIV, e somministrazione di antiretrovirali, immediatamente dopo l'esposizione, potrebbe prevenire o inibire l'infezione sistemica limitando la proliferazione del virus nelle cellule bersaglio iniziali oppure nei linfonodi. La situazione del personale esposto all'HIV dovrebbe essere valutata entro poche ore e comunque deve essere eseguito immediatamente un test per HIV che va ripetuto dopo 72 ore. Nell'eventualità in cui al soggetto non sia stato somministrato un trattamento anti-retrovirale sarà necessario poi procedere a controlli successivi (a 6 e 12 settimane, a 6 e 12 mesi) (14).

## RACCOMANDAZIONI SPECIFICHE

Il virus dell'epatite B persiste nell'ambiente per lungo tempo (> 7 giorni). Sulla superficie può contaminare più del 50% delle aree. Il rischio di infezione per gli strumenti contaminati è del 30%. È raccomandata la vaccinazione del personale (medici, biologi, infermieri). L'HBV è inattivato da composti di ammonio quaternario, etanolo, e soluzioni di ipoclorito di sodio (14).

L'HCV è instabile e persiste nell'ambiente per breve tempo. Il rischio di infezione attraverso le ferite penetranti è dell'1,8%. Sono raccomandati guanti, divise e occhiali protettivi. L'HCV è inattivato da composti di ammonio quaternario, etanolo, e soluzioni di ipoclorito di sodio (14).

L'HIV è instabile e rimane infettivo per un breve lasso di tempo dopo essiccazione. Il rischio di infezione da ferite penetranti è di 3 su 1.000 e di 1 su 1.000 per la contaminazione delle mucose. Sono raccomandati guanti, divise e occhiali protettivi. Il virus HIV è inattivato da soluzioni di ipoclorito di sodio al 10% per le superfici contaminate. Per gli strumenti sono raccomandati, ossido di etilene o sterilizzazione umida (14).

## SPERM WASHING

Dr. Semprini è stato il pioniere sull'uso dell'inseminazione intra-coniugale nelle coppie HIV discordanti impiegando sperma trattato con metodo *washing* (72).

Sebbene ancora la presenza dell'HCV-RNA nello sperma di uomini cronicamente affetti sia un evento raro, tale metodica si è dimostrata efficace nei casi di HCV ed è raccomandata dalle linee guida dell'ASRM. Lo *sperm-washing* non è necessario nelle coppie sierodiscordanti per HBV per prevenire la trasmissione sessuale, a meno che il partner femminile non abbia sierconvertito dopo vaccinazione (2).

Le procedure di lavaggio del seme è stata inizialmente proposta per le coppie HIV-discordanti ed è illustrata nei seguenti passaggi (Figura 32.3) (72):

- stratificare in una provetta sterile 2 ml di Isolate al 90% e al 47%
- valutare la qualità del liquido spermatico: numero, motilità e morfologia
- stratificare dai 2 ai 4 ml di seme sopra il gradiente
- centrifugare per 30' a 1600 rpm
- togliere il surnatante con una nuova pipetta e trasferire, con una nuova provetta, il pellet in un'altra provetta
- risospendere il pellet in 3 ml di Sperm Washing solution
- centrifugare per 10' a 1600 rpm
- togliere il surnatante con una nuova pipetta e stratificare lentamente sul pellet 1 ml di Sperm Washing
- incubare il campione per un'ora a 37°C

- recuperare circa 0,5 ml di spermatozoi migrati in superficie e trasferirli in una nuova provetta
- valutare il numero, la motilità e la morfologia degli spermatozoi migrati
- destinare 100 µl del campione capacitato per la determinazione di contaminazione residua con HIV RNA
- incubare i restanti 400 µl a 4°C
- dopo aver escluso la contaminazione del campione di spermatozoi lavati con HIV RNA, riscaldare gli spermatozoi a 37°C per 15' e procedere con la tecnica di fecondazione assistita adeguata al potenziale fertile della coppia.

Tale metodica ha subito poi nel tempo vari adattamenti. Garrido propone ad esempio la seguente procedura (73):

- dopo liquefazione, il liquido seminale viene diluito con un rapporto 1:1 con il medium (MediCult, Danimarca) e centrifugato a 400 g per 10 minuti
- il surnatante viene successivamente eliminato
- il pellet diluito con un volume di 1 ml di sperm medium a cui è stato stratificato *Pure-Sperm* a triplo gradiente di concentrazione (Nidacon, Svezia) (1 ml per ogni gradiente, 90-70-45%) e successivamente centrifugato per 20 minuti a 300 g
- ogni pellet così ottenuto viene lavato con 5 ml di *sperm medium* e nuovamente ripetuta la procedura
- il surnatante viene quindi eliminato e, rotto il pellet, si procede ad una stratificazione di 0,5-0,7 ml per lo *swim-up*
- dopo 45 minuti, 0,35 ml della porzione sovrastante

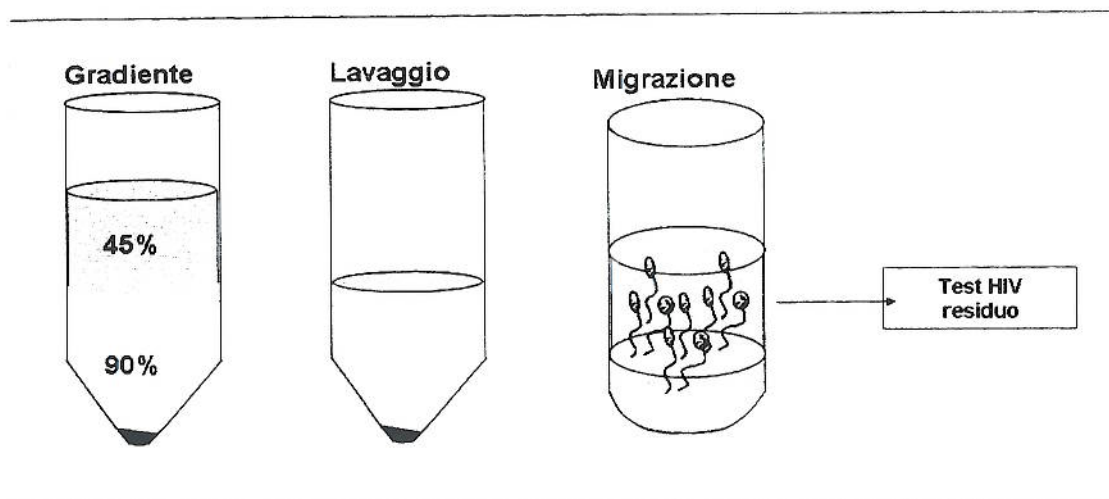


Figura 32.3. Sperm washing secondo Semprini.

di ogni provetta vengono aspirati ed il pool di spermatozoi mobili diviso in due campioni uguali, uno immerso immediatamente in azoto liquido per la determinazione PCR, l'altra metà crioconservata con *sperm-freezing Medium (MediCult)* in attesa della risposta.

Politch propone il metodo del gradiente a doppio tubo. In questo caso, il tubo di una siringa 'usa e getta' da 10 cc, dopo rimozione dell'ago, viene posto all'interno di una provetta conica standard, in polistirene da 15 ml utilizzata per normali test clinici. La provetta esterna viene accorciata di circa 3,25 cm per ampliare l'apertura per il posizionamento del tubo interno. Lo sperma viene stratificato su un gradiente discontinuo di mezzo di separazione per liquido seminale che era stato creato nel tubo interno. Il tubo interno viene quindi chiuso con *Parafilm "M" laboratory film (American National Can, Greenwich, CT)*. Durante la centrifugazione gli spermatozoi mobili migrano in basso verso l'apertura apicale del tubo interno e formano un pellet in fondo al tubo esterno.

Dopo la centrifugazione, il tubo interno ed il contenuto (plasma seminale e materiale cellulare) vengono facilmente rimossi dal tubo esterno spingendo verso l'alto; il contenuto del tubo interno viene mantenuto dal vuoto creato dal *Parafilm*. Il pellet viene nuovamente sospeso in 0,5 mL di mezzo di lavaggio e trasferito in una provetta pulita. Si aggiunge altro liquido di lavaggio, per un totale di 3 ml e si centrifuga per 10 minuti a  $400 \times g$  (Figura 32.4) (74).

La tecnica *washing* con gradiente di centrifugazione presenta dei limiti in caso di pazienti estremamente oligozoospermici, nei quali deve essere eseguito il recupero degli spermatozoi dall'epididimo e dai testicoli. Bostan et al., propongono la tecnica *washing* del singolo spermatozoo, nella quale gli spermatozoi, dopo il recupero, sono sottoposti a lavaggio con l'aiuto di un micromanipolatore, per ottenere la decontaminazione ed essere impiegati per la ICSI (75).

Diverse metodiche sono state impiegate per individuare la presenza dei virus nel campione dopo il trattamento dello sperma. La *nested-PCR* si è dimo-

strata la più sensibile in quanto capace di identificare anche una singola sequenza di RNA o DNA virale (76).

## PROCREAZIONE ASSISTITA ETEROLOGA

Le linee guida americane ed europee ribadiscono la necessità di screenare i donatori di sperma e di congelare e conservare in quarantena, per un periodo di almeno 6 mesi, lo sperma donato, dopo il quale il seme viene utilizzato solo dopo che un nuovo test effettuato abbia confermato la negatività del campione (50).

La capacità di trasmettere il virus da parte degli ovociti, non è del tutto chiara. Ad oggi la crioconservazione degli ovociti, a differenza della crioconservazione del seme, non è utilizzata routinariamente neanche nei programmi di ovo-donazione. Nella pratica clinica, la maggior parte degli ovociti donati non viene posta in quarantena con la crioconservazione in quanto il tasso di gravidanza sui cicli a fresco è maggiore. Solo in Francia, la normativa vigente, rende obbligatorio tale passaggio (50).

Basandoci sulle linee-guida americane, le potenziali donatrici vengono selezionate sulla base della presenza o meno di fattori di rischio (rapporti con partners positivi, trasfusioni, uso di droghe endovena, ecc.), ed inoltre la FDA richiede l'esecuzione di test di screening entro 30 giorni dal prelievo ovocitario [anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, anticorpi anti HCV e ricerca del siero per la noma virale HCV, HBs-Ag e anti HBc (IgG e IgM)].

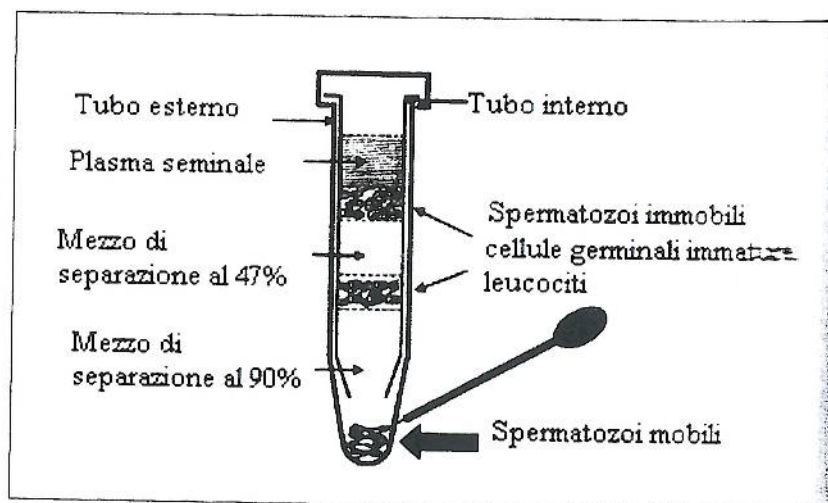


Figura 32.4. Politch, 2004, metodica del doppio tubo.

sierologico per sifilide, coltura cervicale o test di ricerca degli acidi nucleici su campioni urinari o tamponi ottenuti da cervice, meato uretrale o vagina per la *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*]. Così, a nostro avviso, dovrebbe essere l'approccio anche per quelle donne per le quali si prevede la criopreservazione di ovociti e/o tessuto ovarico, per meglio individuare quei soggetti infetti che richiederebbero l'adozione di misure di sicurezza.

## CRIOPRESERVAZIONE

L'HBV e l'HCV possono sopravvivere all'esposizione diretta all'azoto liquido e, sotto certe condizioni, possono provocare una cross infezione. Altri virus possono sopravvivere alla diretta esposizione all'azoto liquido, incluso l'herpes virus, l'adenovirus ed il papilloma virus. Vi è inoltre evidenza che l'azoto liquido possa essere contaminato da altri agenti come batteri e funghi (77, 78). Uno studio recente conclude che la fonte più probabile di cross-contaminazione è costituita dal processo di crio-conservazione, probabilmente attraverso la contaminazione dell'azoto liquido (67).

La rottura delle paillettes e la perdita dei vials rappresentano ipotetiche vie di trasmissione virale attraverso l'azoto liquido (2). Le paillettes possono assorbire le sostanze contaminanti presenti nell'azoto ed essere causa di una cross-infezione durante gli usi successivi (14).

Riguardo alla conservazione dei campioni infetti, l'ASRM ha proposto delle opzioni di sicurezza (2):

- 1) conservazione separata *off-site* dei campioni sia di sperma che di embrioni di coppie infette
- 2) uso di container garantiti dalla casa produttrice per la resistenza alle temperature di congelamento e ai cicli di scongelamento
- 3) uso di "double bagging" o tecnica "sealing" per evitare il contatto diretto dei crio-containers con l'azoto liquido
- 4) raccolta dei campioni nell'azoto allo stato di vapore piuttosto che in fase liquida
- 5) criopreservazione dei campioni di sperma dopo "washing", per ridurre la carica virale.

Tuttora non vi sono evidenze definitive e sperimentali che provino la superiorità di una procedura rispetto alle altre. Bisogna, inoltre, considerare un'ul-

tima opzione, ovvero quella di non criopreservare i campioni provenienti da coppie infette, a meno che non vi sia la possibilità di conservarli separatamente da quelli dei pazienti non infetti (2).

Idealmente, i campioni crioconservati di cui non sia noto lo stato infettivo, dovrebbero essere conservati separatamente in tank di quarantena fino a quando non sia noto il risultato degli esami (2, 14).

## CONCLUSIONI

Il Ministero della salute ha esteso la possibilità di ricorrere alle tecniche PMA anche alle coppie in cui l'uomo sia portatore di malattie virali sessualmente trasmissibili, e in particolare del virus HIV e di quelli delle epatiti B e C

- in una coppia infertile sarebbe opportuno screenare tutti i marcatori sierologici per epatite B ed eventualmente dosare la viremia
- ad eccezione dei casi di esacerbazione acuta della malattia, la gravidanza non sembra influenzare il decorso dell'infezione da HBV né l'infezione stessa sembra essere causa di complicanze in corso di gravidanza
- la somministrazione della vaccinazione per epatite B e di una dose di immunoglobuline entro 24 ore dalla nascita è efficace nel prevenire sia la trasmissione perinatale che lo stato di portatore cronico del neonato nell'85-95% dei casi
- nei casi di coppie discordanti per infezione da HBV, il partner sieronegativo dovrebbe essere vaccinato contro il virus
- qualora non ci fosse la siero conversione sarebbe opportuno effettuare autoinseminazione o tecniche PMA (Donna HBV +); IUI o IVF/ICSI dopo washing dello sperma (Uomo HBV +)
- lo screening di routine per HCV nelle coppie che accedono ai Centri di Infertilità è consigliato anche dalle linee guida americane
- non sembra esserci un incremento dell' outcome sfavorevole nelle donne in gravidanza con infezione da HCV
- il rischio di trasmissione verticale dell'HCV è stato stimato del 5-6% dei casi di madre HCV-RNA positiva e anti HIV-negativa. In caso di donna HCV positiva e HCV-RNA negativa, il rischio di trasmissione al neonato è molto basso, <1%

- la combinazione di ribavirina e interferone peghilato è il trattamento raccomandato per prevenire le complicanze dell'infezione da HCV
  - entrambi questi farmaci sono controindicati in gravidanza
  - in tutti i casi di infezione da HCV, la coppia, dopo essere adeguatamente informata su modalità e tempi di trattamento dell'infezione, potrebbe prendere in considerazione il trattamento con ribavirina e interferone prima della PMA
  - numerosi fattori sono stati chiamati in causa circa una possibile influenza dell'infezione da HIV sulla fertilità sia nell'uomo che nella donna
  - se la viremia è ridotta fino ad essere "non misurabile" nell'uno e nell'altro partner (meno di 40 copie/ml), la coppia può avere un bambino negativo per HIV (rischio inferiore al 2%)
  - non ci sono reports sulla trasmissione dell'HIV dalla madre al neonato dopo l'impiego delle tecniche standardizzate di trattamento dello sperma
  - per la complessità e la comorbidità che spesso caratterizzano i pazienti con infezioni sessuali trasmissibili, è consigliabile inviare le coppie sierodiscordanti che fanno richiesta di assistenza, a centri attrezzati con la necessaria esperienza
  - dalle più recenti linee guida, emerge la necessità di adottare misure di screening routinariamente su pazienti e donatori di gameti, per HIV 1 e 2, HBV, HCV e altre malattie a trasmissione sessuale (sifilide, gonorrea, *Chlamydia*, CMV), prima dell'inizio delle procedure PMA e criopreservazione
  - le coppie con infezioni virali come epatiti e HIV dovrebbero essere trattate in un laboratorio separato, 'high risk', con strumenti specifici e dedicati per la riproduzione assistita
  - i donatori di sperma dovrebbero essere screenati e i campioni seminali congelati e conservati in quarantena, per un periodo di almeno 6 mesi
  - il congelamento degli ovociti dovrebbe seguire le medesime procedure di sicurezza di quello dello sperma.
- 2 The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Hepatitis and reproduction. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S226-35.
  - 3 Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP: Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 2006, 28:112-125.
  - 4 Mele A, Tosti ME, Mariano A, Pizzuti R, Ferro A, Borini E, Zotti C, Lopalco P, Curtale F, Balocchini E, Spada E: National Surveillance System for Acute Viral Hepatitis (SEIEVA) Collaborating Group. Acute hepatitis B 14 years after the implementation of universal vaccination in Italy: areas of improvement and emerging challenges. *Clin Infect Dis*. 2008;46(6):868-75.
  - 5 Alter HJ, Purcell RH, Gerin JL, et al. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. *Infect Immun* 1977;16:928-33.
  - 6 Bancroft WH, Snitbhan R, Scott RM, et al. Transmission of hepatitis B virus to gibbons by exposure to human urine containing hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1977;135:79-85.
  - 7 Karayiannis P, Novick DM, Lok AS, Fowler MJ, Monaghan J, Thomas HC. Hepatitis B virus DNA in saliva, urine and seminal fluid of carriers of hepatitis B e antigen. *Br J Clin Res Ed*. 1985;22;290(6485):1853-5.
  - 8 Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, Molinie C, Villa E, Desreux F, Brechot C. Presence of HBV DNA in spermatozoa: possible vertical transmission of HBV via the genital tract. *Med Virol*. 1985;16(1):61-6.
  - 9 Moretti E, Federico MG, Giannerini V, Collodel G, Sestini G. Ultrastructure and meiotic segregation in a group of patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Hepatol*. 2008;40(5):286-91.
  - 10 Hendricks DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine SD, Wald PD, Urdea MS, Perrillo RP. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am J Clin Pathol* 1995;104(5):537-44.
  - 11 Hu KQ, Vierling JM. Molecular diagnostic techniques for viral hepatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1994;23:479-98.
  - 12 Ballard AL, Boxall EH. Assessing the infectivity of hepatitis B carriers. *Commun Dis Public Health*. 1999;2(3):175-8. Erratum.
  - 13 Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(8):936-62.
  - 14 Coccia ME, Borini A, Massacesi A, Ragusa G. Infezioni e riproduzione. Consensus Conference. Cic, Edizioni Scientifiche Internazionali. Roma 2003.
  - 15 Englert Y, Lesage B, Place I, Kirkpatrick C, Farber M, Vanrecker F, Liesnard C, Van Vooren JP. Medically assisted reproduction in couples carrying the human immunodeficiency virus. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2002;57(2):103-9.

## Bibliografia

- 1 The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Guidelines for reducing the risk of viral transmission during fertility treatment. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S156-62.

- 32 Lam PM, Suen SH, Lao TT, Cheung LP, Leung TY, Haines C. Hepatitis B infection and outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer treatment. *Fertil Steril*. 2009; 25.
- 33 Pirwany I, Phillips S, Kelly S, Buckett W, Tan S. Reproductive performance of couples discordant for hepatitis B and C following IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 2004;21: 157-61.
- 34 Mishra L, Seeff LB: Viral hepatitis, A though E, complicating pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:873-887.
- 35 Okada K, Kamiyama I, Inomata M, Imai M, Miyakawa Y. e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med* 1976; 294:746-9.
- 36 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Qiu JW. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002;4:209-212.
- 37 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Liu HX, Wang YH, Deng LZ, Qiu JW. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol* 2003;9:736-740.
- 38 Huang TH, Zhang QJ, Xie QD, Zeng LP, Zeng XF. Presence and integration of HBV DNA in mouse oocytes. *World J Gastroenterol* 2005;11:2869-2873.
- 39 Quint WG, Fetter WP, van Os HC, Heijtkink RA. Absence of hepatitis B virus (HBV) DNA in children born after exposure of their mothers to HBV during in vitro fertilization. *J Clin Microbiol* 1994;32:1099-1100.
- 40 Lutgens SP, Nelissen EC, van Loo IH, Koek GH, Derhaag JG, Dunselman GA. To do or not to do: IVF and ICSI in chronic hepatitis B virus carriers. *Hum Reprod*. 2009;24 (11):2676-8.
- 41 Perinatal Infections. In: American Academy of Pediatrics and the American College of Obstetricians and Gynecologists: Guidelines for perinatal care. 5th edition.; 2002:287-92.
- 42 Sodeyama T, Kiyosawa K, Akahane Y, Tanaka E, Wada S, Oike Y, et al. Evolution of HBeAg/anti-HBe status and its relationship to clinical and histological outcome in chronic HBV carriers in childhood. *Am J Gastroenterol* 1986;81: 239-45.
- 43 Bortolotti F, Calzia R, Cadrobbi P, Giacchini R, Ciravegna B, Armigliato M, et al. Liver cirrhosis associated with chronic hepatitis B virus infection in childhood. *J Pediatr* 1986; 108:224-7.
- 44 American Academy of Pediatrics. Hepatitis C virus infection: Committee on Infectious Diseases. *Pediatrics* 1998; 101:481-5.
- 45 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2002. *MMWR* 10, 2002/51(RR06);1-80.
- 46 ACOG educational bulletin. Viral hepatitis in pregnancy. Number 248, July 1998. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*. 1998 ;63:195-202.
- 47 Savasi V, Ferrazzi E, Fiore S. Reproductive assistance for infected couples with bloodborne viruses. *Placenta*. 2008;29 Suppl B:160-5.
- 32 Mariano A, Scalia Tomba G, Tosti ME, Spada E, Mele A. Estimating the incidence, prevalence and clinical burden of hepatitis C over time in Italy. *Scand J Infect Dis*. 2009;4:1-12.
- 33 Levy R, Bourlet T, Maertens A, Salle B, Lornage J, Laurent JL, et al. Pregnancy after safe IVF with hepatitis C virus RNA-positive sperm. *Hum Reprod* 2002;17:2650-3.
- 34 Garrido N, Gil-Salom M, Martínez-Jabaloyas JM, Meseguer M. First report of the absence of viral load in testicular sperm samples obtained from men with hepatitis C and HIV after washing and their subsequent use. *Fertil Steril*. 2009;92(3):1012-5.
- 35 Sánchez Tapias JM, Rodés J. Hepatitis C: who should you treat and how? *Blood Purif*. 2002;20(1):124-36.
- 36 Mast EE, Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Sem Virol* 1993;4:273-83.
- 37 McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C: Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-92.
- 38 Pecou S, Moinard N, Walschaerts M, Pasquier C, Daudin M, Bujan L. Ribavirin and pegylated interferon treatment for hepatitis C was associated not only with semen alterations but also with sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in humans. *Fertil Steril*. 2009;91(3):933.e17-22.
- 39 MacDonald MA, Wodak AD, Dolan KA, van Beek I, Cunningham PH, Kaldor JM. Hepatitis C virus antibody prevalence among injecting drug users at selected needle and syringe programs in Australia, 1995-1997. Collaboration of Australian NSPs. *Med J Aust*. 2000, 17;172(2):57-61
- 40 Sharma D, Spearman P. The impact of cesarean delivery on transmission of infectious agents to the neonate. *Clin Perinatol*. 2008 Jun;35(2):407-20, vii-viii.
- 41 Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2009;81(5):836-43.
- 42 Levy R, Tardy JC, Bourlet T, Cordonier H, Mion F, Lornage J, et al. Transmission risk of hepatitis C virus in assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:810-6.
- 43 Manno M, Marchesan E, Crovatto M, Martelli P, Tomei F, Adamo V. Preliminary evidence on the safety of ICSI with testicular spermatozoa in HCV-infected male: a case report. *Hum Reprod* 2003;18:1666-8.
- 44 Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2008. Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008: executive summary. [http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008\\_Global\\_report.asp](http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp)
- 45 Centers for Disease Control (CDC) and Prevention. US Department of Health and Human Services, Public Health Service: Health Information for International Travel 2008. Atlanta 2007.
- 46 Barnhart N, Shannon M, Weber S, Cohan D. Assisted reproduction for couples affected by human immunodeficiency virus in California. *Fertil and Steril* 2009; 91 (4S):1541-42
- 47 Carosi G., Nasta P., Fiore S., Matteelli A., et al. Women Facing HIV. Key Question on Women with HIV Infection: Ita-

- lian Consensus Workshop. *Infection*, 2009; 2: 168-178
- 48 Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 2001; 357:1149-53.
  - 49 Mandelbrot L, Heard I, Henrion-Geant E, Henrion R. Natural conception in HIV-negative women with HIV-infected partners. *Lancet* 1997;349:850-1.
  - 50 Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vanin AS, Emiliani S, Delbaere A. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):149-62.
  - 51 Wortley PM, Hammett TA, Fleming PL. Donor insemination and human immunodeficiency virus transmission. *Obstet Gynecol* 1998;91:515-8.
  - 52 Gurtler L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* 1996; 20;348(9021):176-9.
  - 53 Allain JP, Laurian Y, Paul DA, Senn D. Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. *Lancet* 1986, 29;2(8518):1233-6.
  - 54 Horsburgh CR Jr; Ou CY; Jason J; Holmberg SD; Longini IM Jr; Schable C; Mayer KH; Lifson AR; Schochetman G; Ward JW; et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 1989;16;2 (8664):637-40.
  - 55 Boom R; Sol CJ; Salimans MM; Jansen CL; Wertheim-van Dillen PM; van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3):495-503.
  - 56 Chirgwin KD, Feldman J, Muneyyirci-Delale O, Landesman S and Minkoff H. Menstrual function in human immunodeficiency virus-infected women without acquired immunodeficiency syndrome. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;12:489-494.
  - 57 Partisani M, Ohl J, Demangeat C, Binder-Foucard F, Nisand J, Lang JM: Premature ovarian deficiency in HIV infected women. In: Program and abstracts of 15th conference on retroviruses and opportunistic infections, February 3-6, 2008, Boston, MA (Abstract 669).
  - 58 Bourlet T, Cazorla C, Berthelot P, Grattard F, Cognasse F, Fresard A, Defontaine C, Lucht FR, Genin C and Pozzetto B. Compartmentalization of HIV-1 according to antiviral therapy: viral correlated in blood and semen but poorly in blood and saliva. *AIDS* 2001;15:284-285.
  - 59 van Leeuwen E, Wit FW, Repping S, Eeftinck Schattenkerk JK, Reiss P, van der Veen F, Prins JM. Effects of antiretroviral therapy on semen quality. *AIDS*. 2008, 12;22(5):637-42.
  - 60 Muciaccia B, Corallini S, Vicini E, Padula F, Gandini L, Liuzzi G, Lenzi A, Stefanini M. HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects. *Hum Reprod*. 2007;22(11):2868-78.
  - 61 Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod* 2005;20:1028-34.
  - 62 American College of Obstetrics and Gynecology. ACOG Committee Opinion No. 389, December 2007. Human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*. 2007;110 (6):1473-8.
  - 63 Kunstmann JM, Guibert J, Merlet F et al. (2000) AMP intra conjugale : quelle stratégie de prise en charge? Expérience protocole NECO. Communication à la journée: Le désir d'enfant chez les couples VIH sérodifférents. Toulouse, pp. 31-32.
  - 64 Sauer MV, Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Vardhana P, Jovanovic V, et al. Providing fertility care to men seropositive for human immunodeficiency virus: reviewing 10 years of experience and 420 consecutive cycles of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. Published online 13 June 2008
  - 65 Bujan L, Hollander L, Coudert M, Gilling-Smith C, Vucetich A, Guibert J, et al. Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREATHE network. *AIDS* 2007;21:1909-14.
  - 66 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). HIV-1 infection and artificial insemination with processed semen. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990;39(249):55-6.
  - 67 Lesourd F, Izopet J, Mervan C, Payen JL, Sandres K, Monrozier X, et al. Transmissions of hepatitis C virus during the ancillary procedures for assisted conception. *Hum Reprod* 2000;15:1083-5.
  - 68 Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L; Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1253-62.
  - 69 Gilling-Smith C, Emiliani S, Almeida P, Liesnard C, Englert Y. Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Hum Reprod*. 2005;20(6):1433-8.
  - 70 Centers for Disease Control and Prevention. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and other blood-borne pathogens in health-care settings. *Morb Mort Wkly Rep* 1998;37:377-388.
  - 71 Coccia ME, Cammilli F, Ginocchi L, Rizzello F. Role of infection in in vitro fertilization treatment. *Ann NY Acad Sci* 2004;1034:219-35.
  - 72 Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, et al. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 1992;340 (8831):1317-9.
  - 73 Garrido N, Meseguer M, Bellver J, Remohi J, Simón C, Pellicer A. Report of the results of a 2 year programme of sperm wash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. *Hum Reprod*. 2004;19(11):2581-6.
  - 74 Politch JA, Xu C, Tucker L, Anderson DJ. Separation of



- human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method versus other methods. *Fertil Steril*. 2004;81(2):440-7.
- 5 Bostan A, Vannin AS, Emiliani S, Debaisieux L, Liesnard C, Englert Y. Development and evaluation of single sperm washing for risk reduction in artificial reproductive technology (ART) for extreme oligospermic HIV positive patients. *Curr HIV Res*. 2008;6(5):461-5.
- 6 Meseguer M, Garrido N, Gimeno C, Remohí J, Simon C, Pellicer C. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. *Fertil Steril* 2002;78:1199-202.
- 77 Hawkins AE, Zuckerman MA, Briggs M, Gilson RJ, Goldstone AH, Brink NS, et al. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods* 1996;60:81-8.
- 78 Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995;346: 137-40.