

Биологическая безопасность образцов (сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов человека) при длительном хранении в жидком азоте

Е.В. Петрова¹, Н.П. Макарова¹, Л.Ф. Курило²

¹Отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва;

²лаборатория генетики нарушений репродукции ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

Контакты: Любовь Федоровна Курило kurilo@med-gen.ru

Криоконсервация сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов играет важную роль в современных вспомогательных репродуктивных технологиях. На сегодняшний день единственным доступным источником низких температур, удовлетворяющим условиям долгосрочного хранения клеток, является жидкий азот. Однако необходимо учитывать, что существует вероятность передачи инфекционных агентов между образцами через жидкий азот при их совместном размещении в криохранилище. В статье обсуждаются пути снижения риска перекрестной контаминации и комплексный подход к обеспечению биологической безопасности процесса криоконсервации в рамках создания криобанков.

Ключевые слова: криохранилище, сперматозоиды, ооциты, эмбрионы человека, вспомогательные репродуктивные технологии, жидкий азот, перекрестная контаминация

Biosafety samples (sperm, oocytes and embryos person) during prolonged storage in liquid nitrogen

Ye. V. Petrova¹, N. P. Makarova¹, L. F. Kurilo²

¹Department of Assistive Technology in the Treatment of Infertility, Acad. V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, Moscow;

²Laboratory of Genetics of Reproduction Disorders, Medical Genetics Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Cryopreservation of sperm, oocyte and embryo plays an important role in modern assisted reproductive technologies. To date the only available source of low temperatures satisfying the conditions of long-term storage of cells is liquid nitrogen. However there is a possibility of transmission of infectious agents between samples in liquid nitrogen at their co-location in a cryostorage. The article discusses ways to reduce the risk of cross-contamination and the integrated approach to biosecurity.

Key words: cryostorage, sperm, oocyte, human embryos, in vitro fertilisation, liquid nitrogen, cross contamination

Введение

Криоконсервация сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов играет важную роль в репродуктивной медицине, в том числе во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ). На сегодняшний день единственным доступным источником низких температур, удовлетворяющим условиям долгосрочного хранения клеток, является жидкий азот (LN₂). Объектом многих научных исследований становится безопасностью хранения в жидком азоте половых клеток и эмбрионов, минимизация риска потери их жизнеспособности. Но не менее важной проблемой является биологическая безопасность образцов и возможность перекрестной контаминации в криохранилище, так как при этом сперматозоиды, ооциты и эмбрионы могут быть инфицированы различными микроорганизмами.

Выживаемость микроорганизмов в условиях жидкого азота

Большинство видов микроорганизмов способны выдерживать хранение при низких температурах, в том числе и в жидком азоте (–196 °С). Кроме того, компоненты семенной плазмы, питательных сред и криопротекторы, используемые при замораживании, могут защищать вирусы и бактерии от холодовых повреждений [1].

М. J. Van der Maaten (1987) заражал аликвоты жидкости из криобанка эмбрионов различными изолятами *Infectious bovine rhinotracheitis*, *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)*, *Parainfluenza-3 virus* и *Bluetongue virus*. Затем он помещал эти аликвоты в хранилища при 4, –20 и –70 °С. Все вирусы сохраняли свои титры при 4 °С лишь в течение 6 сут. После хранения при –20 °С в те-

чение 3 мес наблюдали некоторое снижение титров, но при -70°C все вирусы хорошо сохранились [2]. Также показано, что и другие вирусы, например *Herpes simplex virus* и *Cytomegalovirus (CMV)*, выживают в сперме при криоконсервации [3–6].

Бактерии чрезвычайно устойчивы к замораживанию [7, 8]. N. Iaffaldano et al. (2010) показали снижение концентрации *Salmonella* spp. в сперме индюков после замораживания и сохранение при этом способности вызывать заболевание у птиц при инсеминациях [9]. J.K. Sherman et al. (1991) описали выживаемость *Trichomonas vaginalis* при замораживании спермы человека [10]. S.L. Aarnaes et al. (1984) показали, что при температуре -176°C выживают до 65 % *Chlamydia trachomatis*, в то время как при 4 и -20°C — лишь 0–3 % бактерий [11].

Замораживание в жидком азоте даже используют для сохранения различных штаммов микроорганизмов: *Mycoplasma* замораживают в среде, содержащей сахарозу в качестве криопротектора [12], *T. vaginalis* — в среде с диметилсульфоксидом или глицерином и др. [13].

Грибы же, напротив, очень чувствительны к действию низких температур и криопротекторов. Криоконсервация приводит к снижению концентрации грибов в сперме более чем на 90 % [14].

R.S. Tedder et al. (1995) описали случай перекрестной контаминации в криобанке. Из-за недостаточной герметичности контейнеров для хранения образцов костного мозга произошло заражение *Hepatitis B virus (HBV)* жидкого азота в криохранилище и инфицирование пациентов после трансплантации [15].

Имеющиеся данные литературы доказывают, что действие низких температур не дезинфицирует биологический материал, а следовательно, существует вероятность передачи инфекционных агентов между образцами через жидкий азот при их совместном размещении в криохранилище.

Пути снижения риска перекрестной контаминации

В настоящее время один из подходов к преодолению перекрестной контаминации в криохранилище — серологическое обследование всех доноров и пациентов на носительство *Human immunodeficiency virus (HIV)*, *Hepatitis C virus (HCV)*, *HBV* и *Treponema pallidum* перед криоконсервацией образцов.

Другой способ — создание карантинных хранилищ для размещения образцов до момента получения результатов скринингового обследования пациентов, после чего образцы от здоровых пациентов помещают в общее криохранилище, а образцы от серопозитивных пациентов — в специальное для инфицированных образцов [16, 17].

Но таких мер предосторожности может оказаться недостаточно, так как пациенты могут быть носителями инфекций, на наличие которых обследование не проводили. Кроме того, не может быть полностью

исключено инфицирование у серонегативных пациентов, ввиду того что серологические тесты не обладают 100 % чувствительностью, а вирусы могут быть обнаружены в семенной жидкости серонегативных обследуемых. Ряд авторов [5, 6] в своих исследованиях показали, что *CMV* не только определяется в семенной жидкости, но и сохраняет свою жизнеспособность после размораживания. При этом вирус может персистировать в сперме как серопозитивных, так и серонегативных (в день получения образцов и после 6-месячного карантина) пациентов.

Именно поэтому необходим комплексный подход к вопросу преодоления перекрестной контаминации в криохранилище.

Подготовка половых клеток и эмбрионов к криоконсервации

Одной из важных превентивных мер является подготовка половых клеток и эмбрионов к замораживанию.

Ооциты необходимо тщательно очищать от фолликулярных клеток и промывать в культуральной среде. Промывка ооцит-кумулосных комплексов в день пункции фолликулов, повторная промывка в день оценки пронуклеарного статуса и промывка эмбрионов в день переноса снижают концентрацию *HCV* в культуральной среде ниже детектируемого уровня [18]. Важным защитным барьером для ооцитов и эмбрионов является прозрачная оболочка (*zona pellucida, ZP*). Нужно стараться сохранять ее целостность при замораживании и размораживании. К сожалению, вспомогательные техники в эмбриологии (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, биопсия полярных телец или blastomeres, искусственное рассечение прозрачной оболочки) повреждают *ZP*, что делает клетки более чувствительными к действию микроорганизмов [19].

Несмотря на криопротекторную функцию семенной плазмы [20], обработанный эякулят предпочтительнее с точки зрения биологической безопасности.

Для удаления бактериальной микрофлоры из спермы желательно использовать метод обработки в градиенте PureSperm, что позволяет избежать добавления антибиотиков в среду для промывки сперматозоидов [21]. Однако вирусная контаминация (*HIV, HCV*) семенной жидкости снижается ниже уровня детекции только при сочетании обработки в градиенте PureSperm и метода Swim-up [22–27]. В то же время отделение всех вирусов от популяции сперматозоидов не всегда возможно, так как половые клетки могут служить векторами для определенных вирусов [28].

Выбор метода замораживания биологических объектов

На вероятность возникновения перекрестной контаминации в криобанке влияет тип носителя, выбранного для замораживания сперматозоидов, ооцитов или эмбрионов (открытый или закрытый).

Наиболее распространенными в России открытыми носителями являются системы для витрификации производства Origio (McGill Cryoleaf) и Kitazato BioPharma. При использовании открытых носителей предполагается непосредственный контакт образца с жидким азотом.

К носителям закрытого типа относят соломины для спермы и эмбрионов (CryoBioSystem). Соломины PETG с одного конца имеют фабричную хлопковую пробку, а с другого запечатываются (после заполнения их биологическим материалом) криопастой, специальным порошком, запаиваются термически или с помощью ультразвука, что предотвращает прямой контакт образца с жидким азотом.

С точки зрения биологической безопасности наиболее предпочтительным считают использование закрытых носителей.

А. Bielanski et al. (2000) [29] витрифицировали эмбрионы в открытых соломинах и пластиковых криовиалах и затем помещали в жидкий азот, содержащий *BVDV*, *Bovine herpesvirus 1 (BHV-1)* и *Bovine immunodeficiency virus (BIV)*. После 3–5-недельного хранения в жидком азоте эмбрионы с интактной ЗР были обследованы на контаминацию данными вирусами. В 13 из 61 образца, подвергавшихся воздействию *BVDV* и *BHV-1*, результат оказался положительным, в то время как все 22 образца, хранившиеся в среде с *BIV*, остались стерильными. В контрольных образцах, витрифицированных в закрытых виалах, вирусную контаминацию не наблюдали [29].

Однако и закрытые носители не обеспечивают абсолютной защиты от перекрестной контаминации.

Наиболее распространенными причинами заражения жидкого азота являются недостаточная герметичность, разрушение пробки или самого носителя при хранении.

При использовании раствора с PVA-порошком (в контейнерах многоразового использования) или криопасты риск контаминации максимален, так как данные субстанции могут аккумулировать микроорганизмы. Именно поэтому для образцов, полученных от разных пациентов, необходимо применять аликвоты (однократного использования) материалов для запечатывания. Применение ультразвукового запаивания также не исключает риск передачи инфекционных агентов между соломинами. Авторы предполагают, что существуют 2 причины возникновения этого риска: разбрызгивание образца и контаминация внешней поверхности соломинки при запечатывании ультразвуком и неполная герметизация носителя [30]. Таким образом, минимальный риск контаминации обеспечивает термическое запаивание носителей.

Кроме того, некоторые носители могут абсорбировать жидкий азот всей поверхностью или через свои пробки [16]. Для преодоления этой проблемы возможно использование метода «соломина-в-соломине», что

предотвращает прямой контакт биологического материала с жидким азотом, повышает надежность запечатывания носителя и, следовательно, снижает риск перекрестной контаминации в процессе хранения [31]. Или необходимо повышать надежность материала носителя. На данный момент наиболее безопасными (из доступных в России) считают соломины из иономерного полимера (IR) производства CryoBioSystem. Данный материал физически и химически инертен, не поглощает и не выделяет никакие вещества, что гарантирует безопасность образцов. Закрытая с 3 сторон система обеспечивает биологическую безопасность материала в ходе процедур заполнения и опустошения. Герметично термически запаиваемые с обоих концов IR-соломины CryoBioSystem предотвращают контаминацию материала и среды, они нечувствительны к термическому шоку, не бьются. Биологическая безопасность IR-соломин была доказана в исследованиях с гаметами и эмбрионами человека, зараженными *HCV* и *HIV* [30, 32].

Микроорганизмы из зараженного образца могут загрязнять инструменты и наружную поверхность соломин в процессе запечатывания (особенно в случае ультразвукового запаивания), поэтому инструменты необходимо подвергать дезинфекции после использования, а соломины должны быть не только герметично запечатаны, но и обработаны снаружи 3 % гипохлоритом натрия или 70 % этиловым спиртом после запечатывания и после размораживания.

Профилактическая дезинфекция криохранилищ

Помимо биологических образцов, источником контаминации жидкого азота при многолетнем использовании сосудов Дьюара в отсутствие дезинфекции может стать окружающая среда: воздух криокомнаты, эмбриолог, работающий с материалом (дыхание, кожа рук). В исследовании А. Bielanski et al. (2003) [33] была показана контаминация спермы и эмбрионов, хранившихся в запечатанных пластиковых соломинах в течение 6–35 лет в жидком азоте. В сосудах Дьюара были обнаружены 32 вида бактерий и 1 вид грибов, в основном представлявших собой возбудителей оппортунистических инфекций, способных вызывать заболевания у человека и животных, снижать фертильность спермы после размораживания и подавлять развитие эмбрионов *in vitro* [33]. Поэтому необходима периодическая дезинфекция криохранилищ и жидкого азота. На основании рекомендаций производителей и поставщиков для обработки сосудов Дьюара можно использовать любые растворы, не вступающие в химические реакции с алюминием и нержавеющей сталью. В большинстве случаев применима хлорная известь, бытовые детергенты и даже жидкое мыло. Кроме того, приемлема и 3–6 % перекись водорода, и 37 % денатурированный спирт. Для борьбы с высококонтагиозными вирусами (ретровирусы, аденовирусы и др.), бакте-

риями (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp.) и грибами (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*) могут быть рекомендованы другие дезинфектанты, например Вирконт S (натрия хлорид/калия пероксомоносульфат). Важно помнить, что после обработки чистящим средством (в течение 15–30 мин) внутреннюю поверхность необходимо тщательно промывать стерильной водой. В настоящий момент нет опубликованных данных об эффективности дезинфектантов и детергентов для деконтаминации криохранилищ. Можно только предполагать их безопасность для сосудов Дьюара по опыту их применения в других отраслях для обработки алюминиевых и стальных сосудов. Пустые криобанки должны храниться чистыми, сухими, с плотно закрытыми крышками для предотвращения заселения их микроорганизмами, а перед заполнением свежим жидким азотом проходить дополнительную очистку.

Более сложной является дезинфекция так называемых сухих хранилищ (хранение образцов в парах жидкого азота) ввиду конструктивных особенностей сосудов. Выбор способа дезинфекции обусловлен типом абсорбента. Сосуды, содержащие гидрофобные абсорбенты, можно целиком заполнять дезинфицирующим раствором, затем тщательно ополаскивать и высушивать в ламинарном потоке. Сосуды с гидрофильным абсорбентом можно обрабатывать только паром, так как применение растворов приводит к их необратимому повреждению [19].

Хранение биологического материала в парах жидкого азота

Более безопасной альтернативой хранению в жидком азоте может стать хранение в его парах. Жизнеспособность эмбрионов и сперматозоидов, хранившихся в парах жидкого азота, после оттаивания сопоставима с результатами при хранении в жидкой фазе [16, 34, 35]. Однако этот способ сопряжен с различными трудностями при длительном хранении и поддержании постоянной температуры в диапазоне между –150 и –190 °С. А частые открывания и высокая влажность окружающего воздуха могут привести к образованию льда на крышке и стенках сосудов, который будет абсорбировать микроорганизмы из окружающей среды. Кроме того, вопрос перекрестной контаминации при длительном хранении в парах жидкого азота по-прежнему остается открытым, так как механизмы движения микроорганизмов в сухих хранилищах детально не известны. А. Bielanski et al. (2005) не выявили контаминации образцов спермы и эмбрионов после содержания их в сухом хранилище, предварительно зараженном вирусными и бактериальными агентами, в течение 7 дней [36]. Однако D. Fourtain et al. (1997) обнаружили бактерии и грибы в парах над жидким азотом в сосудах Дьюара. Эта контаминация была обус-

ловлена образованием аэрозоля, содержащего микроорганизмы, при кипении жидкого азота в сосудах, длительное время не подвергавшихся дезинфекции [37]. Именно поэтому в настоящее время более целесообразно использовать пары жидкого азота для краткосрочного хранения и транспортировки замороженного биологического материала. Тем не менее, хранение сперматозоидов и эмбрионов в парах жидкого азота успешно практикуется в некоторых зарубежных клиниках [16].

Стерилизация жидкого азота

Жидкий азот может быть контаминирован при хранении зараженного биологического материала, кроме того, производимый в промышленных масштабах, он сам по себе может стать источником микроорганизмов. Обеспечить стерильность жидкого азота в заводских условиях крайне сложно, если вообще возможно. Конечно, такие инфекции, как *HIV*, вирусные гепатиты и герпесвирусы, передаются только парентеральным путем и, следовательно, не могут стать причиной контаминации жидкого азота на производстве. Но возбудители воздушно-капельных инфекций могут снизить эффективность программ ВРТ, влияя на жизнеспособность сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов при их контаминации в криохранилище. Следовательно, необходимо производить периодическую дезинфекцию жидкого азота в хранилище.

Для удаления некоторых бактерий и спор грибов может быть рекомендована фильтрация жидкого азота. Эффективность этого метода дезинфекции была показана L.D. McBurnie и V. Bardo (2002) на примере 0,2 мкм PTEF-фильтров и *Brevudimonas diminut* в качестве инфекционного агента [38]. Также может быть рекомендована дезинфекция жидкого азота с помощью ультрафиолетового (УФ) излучения. Адекватная доза УФ-излучения останавливает рост всех микроорганизмов – от вирусов, таких как вирусы гепатитов (что требует 8000 мкВт/см²), до грибов, таких как *Aspergillus niger* (330 000 мкВт/см²) [39]. Широко известна стерилизация воды и других жидкостей с помощью УФ-облучения, но для стерилизации жидкого азота этот метод применить сложнее в связи с тем, что он очень быстро испаряется. Тем не менее, L. Parmegiani et al. (2009) [40] продемонстрировали возможность деконтаминации небольших количеств жидкого азота от бактерий и грибов, таких как *Aspergillus* (наиболее устойчивый к ультрафиолету микроорганизм, обнаруженный в жидком азоте [33, 41]), с помощью УФ-излучения. Их метод стерилизации основан на действии минимальных доз УФ-излучения, необходимых для уничтожения микроорганизмов, выживающих при температуре кипения жидкого азота (–196 °С), в течение короткого времени (за которое жидкий азот не успевает испариться полностью) [40]. Этот способ неприменим для получения стерильного азота в больших количествах,

но может быть использован, например, для безопасной витрификации или других методов замораживания биологического материала. В этом случае образец замораживают в небольшом объеме полученного жидкого азота, после чего помещают в стерильный герметичный контейнер и только в таком виде отправляют в криохранилище [42].

Выводы

Основными источниками контаминации жидкого азота микроорганизмами служат биологический материал (особенно при разрушении носителя или использовании открытых носителей), воздух криокомнаты, эмбриолог, работающий с биологическим материалом, и сам по себе жидкий азот, производимый в нестерильных условиях завода. Контаминация биологического материала в криохранилище и перекрестная контаминация между образцами может стать причиной инфицирования пациентов, участвующих в программах ВРТ, и снизить эффективность циклов ВРТ, оказывая негативное влияние на жизнеспособность гамет после размораживания и нарушая развитие эмбрионов. Именно поэтому необходимо соблюдать определенные меры предосторожности, позволяющие снизить риск контаминации в криохранилище. Они включают в себя:

- серологическое обследование всех доноров и пациентов на носительство *HIV*, *HCV*, *HBV* и *Tr. pallidum* перед криоконсервацией образцов;
- создание карантинных хранилищ для размещения образцов до момента получения результатов скринингового обследования пациентов;
- специальную обработку половых клеток и эмбрионов перед замораживанием, позволяющую снизить концентрацию микроорганизмов в потенциально инфицированном биологическом материале;
- использование, по возможности, закрытых носителей либо запаивание открытых носителей в герметичные контейнеры, а также дезинфекцию наружной поверхности при криоконсервации и размораживании;
- периодическую дезинфекцию криохранилищ, стерилизацию жидкого азота;
- работу в условиях, максимально приближенных к стерильным (использование масок, перчаток, дезинфекция рабочих поверхностей).

Необходимо учитывать, что существует вероятность передачи инфекционных агентов между образцами через жидкий азот при их совместном размещении в криохранилище. Только комплексный подход к обеспечению биологической безопасности процесса криоконсервации позволит избежать контаминации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wallis C., Melnik J.L. Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide. *J Virol* 1968;2:953–4.
2. Van der Maaten M.J. Determining the health status of embryos for international movement. In: Hare W.C.D., Seidel S.M. (eds.). *International Embryo Movement*. Montreal: IETS, 1987; pp. 147–161.
3. Sherman J.K., Menna J.H. Cryosurvival of herpes simplex virus-2 during cryopreservation of human spermatozoa. *Cryobiology* 1986;23:383–5.
4. Hammitt D.G., Aschenbrenner D.W., Williamson R.A. Culture of cytomegalovirus from frozen-thawed semen. *Fertil Steril* 1988;49(3):554–7.
5. Mansat A., Mengelle C., Chalet M. et al. Cytomegalovirus detection in cryopreserved semen samples collected for therapeutic donor insemination. *Hum Reprod* 1997;12(8):1663–6.
6. Bresson J.L., Clavequin M.C., Mazon M.C. et al.; Fédération Française des CECOS. Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. *Hum Reprod* 2003;18(9):1881–6.
7. Garcia A., Sierra M.F., Friberg J. Survival of bacteria after freezing of human semen in liquid nitrogen. *Fertil Steril* 1981;35(5):549–51.
8. Hirayama Y. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts without direct exposure to liquid nitrogen. *Reprod Fertil Dev* 2007;17:177–8.
9. Iaffaldano N., Reale A., Sorrentino E. et al. Risk of Salmonella transmission via cryopreserved semen in turkey flocks. *Poult Sci* 2010;89(9):1975–80.
10. Sherman J.K., Hostetler T.L., McHenry K., Daly J.J. Cryosurvival of *Trichomonas vaginalis* during cryopreservation of human semen. *Cryobiology* 1991;28(3):246–50.
11. Aarnaes S.L., Peterson E.M., De La Maza L.M. The effect of media and temperature on the storage of *Chlamydia trachomatis*. *Am J Clin Pathol* 1984;81(2):237–9.
12. Norman M.C., Franck E.B., Choate R.V. Preservation of *Mycoplasma* strains by freezing in liquid nitrogen and by lyophilization with sucrose. *Appl Microbiol* 1970;20(1):69–71.
13. Habib F.S., Metwally D.M., Habib K.S. Cryopreservation of *Trichomonas vaginalis*: a trial of using four different cryoprotectants. *J Egypt Soc Parasitol* 2004;34(3):931–40.
14. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 2003;46(3):205–29.
15. Tedder R.S., Zuckerman M.A., Goldstone A.H. et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995;346(8968):137–40.
16. Clarke G.N. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Hum Reprod* 1999;14(2):2941–3.
17. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online* 2004;9(2):134–51.
18. Devaux A., Soula V., Sifer C. et al. Hepatitis C virus detection in follicular fluid and culture media from HCV+ women, and viral risk during IVF procedures. *Hum Reprod* 2003;18(11):2342–9.
19. Bielanski A., Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009;24(10):2457–67.
20. Grizard G., Chevalier V., Griveau J.F. et al. Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *Int J Androl* 1999;22(3):190–6.
21. Моррелл Дж.М., Холмс П.В. Приготовление человеческих сперматозоидов

- в программах ВРТ. Пробл репродукции 2000;4:25–31.
22. Marina F. Special semen-washing technique as a safe method for using assisted-reproduction techniques in HIV-1 seropositive men. *Hum Reprod* 1998;15:155–6.
23. Marina S., Marina F., Alcolea R. et al. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum Reprod* 1998;13(11):3247–9.
24. Fridström M., Matilainen E., Hovatta O. et al. Is it possible to reduce the amount of HIV virus in semen. *Proc. XIII Nordic IVF Congress 2000*; p. 34.
25. Pasquier C., Daudin M., Righi L. et al. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS* 2000;14(14):2093–9.
26. Lyerly A.D., Anderson J. Human immunodeficiency virus and assisted reproduction: reconsidering evidence, reframing ethics. *Fertil Steril* 2001;75(5):843–58.
27. Cassuto N.G., Sifer C., Feldmann G. et al. A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Hum Reprod* 2002;17(12):3153–6.
28. Chan P.J., Su B.C., Kalugdan T. et al. Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 1994;61(5):982–5.
29. Bielanski A., Nadin-Davis S., Sapp T., Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000;40(2):110–6.
30. Letur-Könirsch H., Collin G., Sifer C. et al. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a study with human immunodeficiency virus-1 under cryopreservation conditions. *Hum Reprod* 2003;18(1):140–4.
31. Kuleshova L.L., Shaw J.M. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum Reprod* 2000;15(12):2604–9.
32. Maertens A., Bourlet T., Plotton N. et al. Validation of safety procedures for the cryopreservation of semen contaminated with hepatitis C virus in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2004;19(7):1554–7.
33. Bielanski A., Bergeron H., Lau P.C., Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003;46(2):146–52.
34. Tomlinson M., Sakkas D. Is a review of standard procedures for cryopreservation needed: safe and effective cryopreservation-should sperm banks and fertility centres move toward storage in nitrogen vapour? *Hum Reprod* 2000;15(12):2460–3.
35. Saritha K.R., Bongso A. Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. *J Androl* 2001;22(5):857–62.
36. Bielanski A. Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers. *Cryobiology* 2005;50(2):206–10.
37. Fountain D., Ralston M., Higgins N. et al. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* 1997;37(6):585–91.
38. McBurnie L.D., Bardo B. Validation of sterile filtration of liquid nitrogen. *Pharm Technol North America* 2002;26:74–82.
39. Srikanth B. Water Conditioning Purification. The basic benefits of ultraviolet technology, 1995; pp. 26–7.
40. Parmegiani L., Accorsi A., Cognigni G.E. et al. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril* 2009;2010;94(4):1525–8.
41. Morris G.J. The origin, ultrastructure, and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. *Cryobiology* 2005;50(3):231–8.
42. Parmegiani L., Cognigni G.E., Filicori M. Ultra-violet sterilization of liquid nitrogen prior to vitrification. *Hum Reprod* 2009;24(11):2969.