

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara GOLOB (JUG)

**VPLIV PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV, IZOLIRANIH Z
DELOVNIH POVRŠIN IN IZ ZRAKA, NA IZID POSTOPKA
ZUNAJTELESNE OPLODITVE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF THE PRESENCE OF THE MICROORGANISMS,
ISOLATED FROM WORKING SURFACES AND AIR, ON THE
OUTCOME OF *IN VITRO* FERTILIZATION PROCESS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

S tem diplomskim delom zaključujem univerzitetni študij mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Ginekološki kliniki v Univerzitetnem Kliničnem centru Ljubljana, analiza odvzetih vzorcev in brisov pa je bila izvedena na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorico doc. dr. Irmo Virant Klun in za recenzentko prof. dr. Edo Vrtačnik Bokal.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Somentorica: doc. dr. Irma Virant Klun

Recenzentka: prof. dr. Edo Vrtačnik Bokal

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Irma Virant Klun

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika, Oddelek za reprodukcijo

Član: prof. dr. Edo Vrtačnik Bokal

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika, Oddelek za reprodukcijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Barbara Golob se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Barbara Golob

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61:614.212:618.177-089.888.11 (043) = 163.6
KG	zunajtelesna oploditev/IVF/ICSI/kontaminacije/mikrobne kontaminacije/vir kontaminacij/vpliv kontaminacij/kontaminacije prostorov/bolnišnični prostori/izidi zunajtelesne oploditve
AV	GOLOB (JUG), Barbara
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica) / VIRANT-KLUN, Irma (somentorica) / VRTAČNIK BOKAL, Eda (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota meddodelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	VPLIV PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV, IZOLIRANIH Z DELOVNIH POVRŠIN IN IZ ZRAKA, NA IZID POSTOPKA ZUNAJTELESNE OPLODITVE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 9 pregl., 1 sl., 35 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	Med možnimi viri mikrobnih kontaminacij gojišč za gojenje spolnih celic in/ali zarodkov sta najbolj proučeni kontaminacija s predstavniki flore iz nožnice, ki se zgodi ob transvaginalni aspiraciji jajčnih celic, in kontaminacija z mikroorganizmi iz semenske tekočine. Manj poznan, ali pa sploh ni, je vpliv kontaminacij iz okolja (delovne površine, zrak, osebje, voda iz inkubatorjev). Da bi proučili njihov pomen, smo uporabili podatke, pridobljene ob rednem mikrobiološkem preverjanju snažnosti med letoma 2001 in 2006 in izide v pripravajočih postopkih zunajtelesne oploditve, ki so jih izvedli v tem časovnem obdobju v laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo na Ginekološki kliniki v Ljubljani znotraj intervala petih dni pred in po datumu odvzema vzorcev. Statistična obdelava podatkov je pokazala, da prisotnost mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin, iz zraka, brisov rok osebja in iz vode iz inkubatorjev, vpliva na izide postopkov zunajtelesne oploditve. Med izolati so najštevilčnejše zastopani predstavniki naravne flore ženskega genitalnega trakta. V največji meri obstaja statistično značilna povezava med vplivom prisotnosti mikroorganizmov, izoliranih iz obravnavanih odzemnih mest v okolju izvajanja postopka zunajtelesne oploditve, in izidi zunajtelesne oploditve pri pacientkah, ki so mlajše od 38 let, pri tem pa ni statistično značilne razlike med njimi glede na izbrano metodo (IVF ali ICSI). Vpliv prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na posamezne izide zunajtelesne oploditve je bil pozitiven v polovici primerov odzemnih mest in negativen za drugo polovico. Ob določanju statistično značilnih vplivov posameznih mikroorganizmov se je pokazalo, da posamezna vrsta ni imela vedno enakosmerne vpliva na izide postopkov zunajtelesne oploditve. Prav tako se je pokazalo, da za statistično značilen pozitiven ali negativen vpliv, ni bila vedno odgovorna samo ena vrsta (prevladujočih) mikroorganizmov, ampak so le-ti večkrat delovali v soodvisnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.61:614.212:618.177-089.888.11 (043) = 163.6
CX	<i>in vitro</i> fertilization/IVF/ICSI/contamination/microbial contamination /sources of contamination/ influence of contamination/environmental contamination/hospital premises/outcomes of fertilization
AU	GOLOB (JUG), Barbara
AA	MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor) / VIRANT-KLUN, Irma (co-advisor) / VRTAČNIK BOKAL, Eda (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	INFLUENCE OF THE PRESENCE OF THE MICROORGANISMS, ISOLATED FROM WORKING SURFACES AND AIR, ON THE OUTCOME OF <i>IN VITRO</i> FERTILIZATION PROCESS
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	X, 56 p., 9 tab., 1 fig., 35 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The most studied sources of all possible microbial contaminations of culture media for gametes and embryos are contaminations with vaginal flora during transvaginal oocyte retrieval and contamination with bacteria from semen. Less known or not known source of microbial contaminations in an <i>in vitro</i> fertilization-embryo transfer system is the influence of environmental contamination (working surfaces, air, persons, water from incubators). To study their influence we used data acquired during regular microbiological sanity testing between the years 2001 and 2006, and outcomes of cycles of <i>in vitro</i> fertilization done in the laboratory for fertilization with biomedical assistance in Gynecological clinic in Ljubljana. Cycles, used in the study, had to be done during interval of five days before and after the day of collecting the samples. Statistical analysis had shown, that the presence of the microorganisms, isolated from working surfaces, air, persons hands and water from incubators, influence on the outcomes of <i>in vitro</i> fertilization process. The most common isolates were microorganisms of the normal flora in female genital tract. The major statistical significance existed between the influence of the presence of the microorganisms, isolated from the treated sampling points in the place of <i>in vitro</i> fertilization process, and the outcomes of <i>in vitro</i> fertilization process among the female patients, younger than 38 years. With that there is no statistically characteristic difference among them regarding the chosen method. Half of the microbial presences showed positive influence on the particular outcome, and the other half showed negativ influence. When the statisticaly significant conection between the presence of individual microorganism and their influence on the outcomes of <i>in vitro</i> fertilization process had been determined, it was shown, that the individual microorganism did not have always the same influence on the outcomes. It was also shown, that for the statistical significant positive or negative influence was not always responsible just one species of the (major) microorganisms isolated, but they repeatedly worked in cooperation.

KAZALO VSEBINE

	STR.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	2
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	3
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	4
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	5
2 PREGLED OBJAV	6
2.1 NEPLODNOST IN POSTOPKA KLASIČNE <i>IN VITRO</i> FERTILIZACIJE (IVF) IN ICSI.....	6
2.1.1 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA IZID POSTOPKA KLASIČNE IN VITRO FERTILIZACIJE (IVF) in ICSI.....	8
2.2 INFEKCIJE IN MIKROBNE KONTAMINACIJE V POSTOPKIH IVF/ICSI.....	8
2.1.2 KONTAMINACIJE.....	9
2.1.2.1 VIRI KONTAMINACIJ.....	10
2.2.1.1.1 Jajčne celice kot vir kontaminacij.....	10
2.2.1.1.1.1 Naravna flora nožnice.....	11
2.2.1.1.2 Semenska tekočina in priprava semena	12
2.2.1.1.2.1 Prisotnost bakterij v semenski tekočini	13
2.2.1.1.2.2 Vpliv prisotnih bakterij v semenski tekočini.....	14
2.2.1.1.2.3 Semenčice, kot prenašalni vektor bakterij.....	15
2.2.1.1.3 Drugi viri kontaminacij	15
2.2.1.1.3.1 Zrak v prostorih izvajanja OBMP	15
2.2.1.1.3.2 Voda v inkubatorjih.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 ODVZEM VZORCEV.....	17
3.1.1 KONTROLA SNAŽNOSTI POVRŠIN Z BRISI.....	19
3.1.2 NADZOR ZRAKA S SEDIMENTACIJSKIMI PLOŠČICAMI.....	19
3.1.3 ODVZEM BRISOV ROK OSEBJA	20
3.1.4 ODVZEM VZORCA VODE IZ INKUBATORJA.....	20

3.2 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA	20
3.2.1 OBDELAVA BRISOV DELOVNIH POVRŠIN IN ROK OSEBJA	20
3.2.2 OBDELAVA VZORCEV VODE IZ INKUBATORJA	21
3.2.3 OBDELAVA PRISPELIH SEDIMENTACIJSKIH PLOŠČ	21
3.2.4 NADALJNA OBDELAVA VZORCEV	22
3.2.5 REZULTATI ANALIZE	23
3.3 OBDELAVA PODATKOV	23
3.3.1 STATISTIČNA OBDELAVA	23
4 REZULTATI	25
4.1 VPLIV PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV NA IZID POSTOPKOV ZUNAJTELESNE OPLODITVE	25
4.1.1 IZOLIRANI MIKROORGANIZMI GLEDE NA ODVZEMNO MESTO	25
4.1.2 VPLIV PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV NA POSAMEZNE ODVZEMNEM MESTU	30
4.1.3 REZULTATI ZUNAJTELESNE OPLODITVE GLEDE NA PRISOTNOST MIKROORGANIZMOV	33
4.1.4 SMER VPLIVA PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV	34
4.2 VPLIV PRISOTNOSTI POSAMEZNIH VRST MIKROORGANIZMOV NA IZID POSTOPKOV ZUNAJTELESNE OPLODITVE	39
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1 RAZPRAVA	42
5.2 SKLEPI	48
6 POVZETEK	50
7 VIRI	52

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled odvzemnih mest, ki so bila vključena v raziskavo.	17
Preglednica 2: Datumi odvzemov brisov delovnih površin, rok osebja, vzorcev zraka in vode iz inkubatorjev.	18
Preglednica 3: Seznam mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin v prostorih OBMP.	26
Preglednica 4: Seznam mikroorganizmov, izoliranih z rok osebja, ki sodeluje pri zunajtelesni oploditvi.....	27
Preglednica 5: Seznam izoliranih mikroorganizmov iz sedimentacijskih plošč (zrak v prostorih OBMP).	28
Preglednica 6: Seznam izoliranih mikroorganizmov iz vode iz inkubatorjev v prostorih OBMP.	29
Preglednica 7: Odvzemna mesta, za katera se je pokazala statistično značilna povezava med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov in izidom zunajtelesne oploditve ($p < 0,05$).	32
Preglednica 8: Prikaz smeri vpliva prisotnosti mikroorganizmov na delež oplojenih jajčnih celic, razvoj zarodkov do stopnje blastociste in stopnjo zanositve.	35
Preglednica 9: Vpliv prisotnosti posameznih izolatov na določenem odvzemnem mestu na izbrane postopke zunajtelesne oploditve.	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz postopka identifikacije bakterij s sistemom Crystal (priloga ob identifikacijskem kitu).....	23
--	----

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Statistično značilne povezave med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov na posameznih mestih na oploditev ($p < 0,05$) znotraj različnih skupin... ..
- Priloga A2: Statistično značilne povezave med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov na posameznih mestih na razvoj zarodkov ($p < 0,05$) do razvojne stopnje blastociste znotraj različnih skupin.....
- Priloga A3: Statistično značilne povezave med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov na posameznih mestih na nosečnost ($p < 0,05$) znotraj različnih skupin.....
- Priloga B1: Izračunane vrednosti deležev oplojenih jajčnih celic, zarodkov, razvitih do stopnje blastociste in stopenj nosečnosti za izbrana odvzemna mesta, glede na prisotnost mikroorganizmov.
- Priloga B2: Seznam osamljenih mikroorganizmov z odvzemnih mest, ki so zadostila kriterijem za nadaljno obravnavo.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

cm	centimeter
CMV	citomegalovirus
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ET	prenos zarodkov (angl. embryo transfer)
EU	Evropa
GMP	pravila dobre laboratorijske prakse (angl. good manufacturing practise/qualyti system)
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl. human imuno deficiens virus)
ICSI	neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice (angl. intracytoplasmic sperm injection)
IVF	klasični postopek zunajtelesne oploditve (angl. <i>in vitro</i> fertilization)
KA	krvni agar
KNS	koagulaza negativni streptokoki
LAP	laktoza andrade peptonska voda
mL	mililiter
OBMP	oploditev z biomedicinsko pomočjo
TIO	tioglikolatni bujon
∞	simbol za neskončno

1 UVOD

V laboratorijih za oploditev z biomedicinsko pomočjo (OBMP) je gojenje gamet in zarodkov podvrženo strogim pogojem. Glede na GMP (good manufacturing practise/quality system) je potrebno zagotavljati visoke standarde higiene, čiščenja in ravnanja z odpadnim materialom, da se preprečijo morebitne okužbe osebja in pacientov ter kontaminacije posod z gojišči ter opreme. Vsak korak pri laboratorijskem delu mora biti podrejen strogi disciplini aseptičnih tehnik (Elder in sod., 2005).

Niti nožnica, niti semenska tekočina nista sterilni (Kastrop in sod., 2007). Do kontaminacije jajčnih celic lahko pride ob ultrazvočni transvaginalni aspiraciji jajčnih celic (Moore in sod., 2000), ki je kljub možnemu tveganju še vedno metoda izbire pridobivanja jajčnih celic v postopku zunajtelesne oploditve (Saltes in sod., 1995). Do okužbe jajčnih celic ali razvijajočih zarodkov lahko pride tudi kasneje, med samim laboratorijskim delom postopka zunajtelesne oploditve, ob stiku s kontaminirano semensko tekočino (Moore in sod., 2000). Znano je, da je večina (94,2 %) semenske tekočine kolonizirane z mikroorganizmi (Krissi in sod., 2004) in čeprav se pred dodatkom v gojišče k jajčni celici semenčice ustrezno pripravi (npr. swim-up metoda) in sta v gojišče dodana penicilin in streptomycin, kar zmanjša število okuženih vzorcev v 95 % primerov (Cottel in sod., 1997), še vedno zaznavamo kontaminacije gojišča za gojenje spolnih celic in/ali zarodkov, kar pa vpliva na uspešnost zunajtelesne oploditve.

Pri parih s težjimi oblikami moške neplodnosti se izvaja mikromanipulacija (neposreden vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice ali postopek ICSI), pri kateri se vnese posamezno semenčico pod posebnim, invertnim mikroskopom neposredno v citoplazmo jajčne celice s pomočjo mikromanipulatorja. Mikromanipulacijo uporabljamo tudi, kadar semenčice pridobimo s punkcijo ali biopsijo nadmodka ali mod (Virant-Klun in sod., 2002). Krissi in sod. (Krissi in sod., 2004) navajajo možnost, da lahko ob vnosu semenčice neposredno v jajčno celico, prva služi kot prenašalni vektor različnih bakterij. Tako z

iatrogeno okužbo jajčne celice tvegamo neuspešno oploditev ali slabšo kvaliteto zarodka. Med možnimi posledicami vnosa semenčice z bakterijami predpostavljajo tudi kontaminacijo ooleme (plazmaleme jajčne celice), degeneracijo zigote in celo spremembo v zapisu DNA.

Na uspešnost oploditve, kvaliteto zarodkov in delež zanositev vpliva tudi zgolj sama prisotnost endotoksina v gojišču, ki se sprosti ob normalni avtolizi ali ob umetno povzročenem propadu po Gramu negativnih bakterij (Zarutskie in sod., 1992).

Največji vpliv prisotnosti mikroorganizmov je zaznati ob prenosu zarodka v maternico (postopek ET, angl. embryo transfer), kjer je uspešnost vgnezditve odvisna od prisotnosti nekaterih mikroorganizmov, izoliranih s konice katetra; medtem ko vrste iz rodu *Lactobacillus*, ki so sposobne sproščanja vodikovega peroksida, pripomorejo k uspešni vgnezditvi, pa npr. *Streptococcus viridans* uspešnost niža (Moore in sod., 2000).

Glede na možne posledice je torej pri laboratorijskem delu potrebna izjemna skrbnost, da znižamo tveganje za prenos mikroorganizmov na najnižjo možno raven (Kastrop in sod., 2007).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mikrobne kontaminacije so v laboratorijih, kjer se izvajajo postopki zunajtelesne oploditve (IVF/ICSI), sicer redko, a vendarle prisotne in glede na ogromno število postopkov, ki se vsako leto izvedejo po vsem svetu, njihovega vpliva ne bi smeli zanemarjati.

Dosedanje raziskave s tega področja so se osredotočale na dokazovanje prisotnosti mikroorganizmov v gojišču in določanju njihovega pomena za uspešnost umetne oploditve. Medtem ko je večina raziskovalcev mnenja, da hranjenje in razvoj tako spolnih celic kot zarodkov v mikrobiološko kontaminiranih gojiščih ne vpliva na izid postopka zunajtelesne oploditve oz. ima zgolj zanemarljiv vpliv (Cottell, 1996), pa je Kastrop s sodelavci v bakterijsko kontaminiranih gojiščih opazil razvoj zarodkov slabše kvalitete (Kastrop in sod., 2007).

Raziskave, ki bi pokazale vir kontaminacij, so omejene na dokazovanje okuženih vzorcev semenske in/ali folikularne tekočine kot vira pojavljanja prisotnih mikroorganizmov v gojiščih pri kasnejših korakih postopka zunajtelesne oploditve. Zelo redke, ali pa jih ni, pa so raziskave, ki bi podpirale zahteve evropske direktive (EU Directive 2006/86) po nadzoru kvalitete zraka (določanje števila delcev in števila mikrobnih kolonij), ko so tkiva ali celice, vključno s spolnimi celicami in zarodki, izpostavljene vplivom iz okolja.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo opazovali vpliv prisotnosti mikroorganizmov (bakterij in gliv), izoliranih iz zraka, delovnih površin, brisov rok osebja ter vzorcev vode iz inkubatorja (naprave, v kateri se goji spolne celice in zarodke pri 37 °C in 5 % CO₂) na izide postopkov zunajtelesne oploditve.

Z retrospektivno obdelavo podatkov, pridobljenih med leti 2001 in 2006, smo želeli določiti vpliv skupnega števila izoliranih mikroorganizmov in posameznih izolatov, glede na mesto odvzema vzorca, na delež oplojenih jajčnih celic, delež zarodkov, ki so se razvili do blastociste in stopnjo zanositve.

Glede na veliko število neplodnih parov in na povprečno uspešnost zanositve po zdravljenju s postopkom zunajtelesne oploditve (IVF/ICSI), ki znaša približno 30 % na postopek, bi poznavanje vpliva prisotnosti mikroorganizmov pomembno vplivalo na postopek in končne izide zdravljenja.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da mikroorganizmi, izolirani iz odvzetih vzorcev, kakorkoli vplivajo na izide postopkov zunajtelesne oploditve. Najverjetneje se z večanjem števila prisotnih mikroorganizmov oz. z večjo pestrostjo različnih izolatov uspešnost postopka zmanjšuje, pri tem pa ni nujno, da imajo vsi izolati enak vpliv.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NEPLODNOST IN POSTOPKA KLASIČNE *IN VITRO* FERTILIZACIJE (IVF) IN ICSI

Neploдность lahko definiramo na različne načine, čeprav jo v večini kliničnih študij razumemo kot nezmožnost zanositve po enem letu rednih, nezaščitenih spolnih odnosov pri heteroseksualnem paru (Sher in sod., 2005). S problemom neploдности se po ocenah v Evropi srečuje vsak deseti par in večina od teh tudi poišče zdravniško pomoč (van der Steeg, 2007).

V primeru, da ob vzročnem zdravljenju ne pride do nosečnosti, sledi poskus oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP).

IVF (*in vitro* fertilizacija) je eden izmed najpomembnejših postopkov oploditve z biomedicinsko pomočjo. Uporabimo ga za zdravljenje neploдности, če prejšnje zdravljenje z različnimi zdravili, hormonskimi preparati in kirurškimi postopki ni bilo uspešno.

Zdravljenje se prične s hormonskim spodbujanjem jajčnikov, da se izzove rast večjega števila jajčnih celic, ki jih, ko te dozori, z ultrazvočno aspiracijo (punkcijo) izsrkajo iz jajčnika. Po pridobitvi jajčnih celic se pridobi seme partnerja. Sledi postopek zunajtelesne oploditve. V vsako epruveto z 1 do 2 jajčnima celicama 2 do 4 ure po ultrazvočno vodeni aspiraciji dodamo po pripravi semena na koncentracijskem gradientu ali po metodi splavanja na površje (angl. swim-up) toliko semenčic, da je v 1 mL gojišča z jajčno celico 50 000 do 100 000 gibljivih semenčic (postopek inseminacije jajčne celice). Jajčne celice z dodanimi semenčicami inkubiramo preko noči pri 37 °C in v inkubatorju z atmosfero 5-odstotne koncentracije CO₂ v zraku.

Pri parih s težjimi oblikami moške neplodnosti se odločimo za mikromanipulacijo (postopek ICSI), pri kateri pod posebnim, invertnim mikroskopom posamezno semenčico vnesemo neposredno v citoplazmo jajčne celice s pomočjo mikromanipulatorja. Mikromanipulacijo uporabljamo tudi, kadar semenčice pridobimo s punkcijo ali biopsijo nadmodka ali mod.

Naslednji dan, 24 ur po inseminaciji, pregledamo, ali so jajčne celice oplojene. Pravilno oplojene in neoplojene jajčne celice prenesemo v sveže gojišče v posodicah oz. epruvetkah in jih shranimo v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂ v zraku). Pomemben podatek o uspehu postopka zunajtelesne oploditve je stopnja oploditve, ki pove, kolikšen delež celic se je oplodil na postopek (Virant-Klun in sod., 2002). Delež oplojenih jajčnih celic se po podatkih Egbase in sod. (Egbase in sod., 1996) giblje med 60 in 70 % za klasični postopek zunajtelesne oploditve s kvalitetnim semenom in podobno stopnjo dosega v postopku ICSI, ki se izvaja pri zdravljenju moške neplodnosti (seme slabše kakovosti).

Drugi dan gojenja so zarodki običajno 2- do 4-celični (lahko tudi 5- do 6-celični). Na tej stopnji razvoja jih je že mogoče prenesti v maternico, vendar se vedno bolj uveljavlja podaljšano gojenje zarodkov do razvojne stopnje blastociste (5-dnevno gojenje). Pomembno pri tem je, da se zarodke vsak dan prenese v sveže gojišče. Do razvojne stopnje blastociste se razvije približno 50 % vseh zarodkov.

Zarodke vnesemo v maternico s pomočjo plastičnega katetra in kanile. Zarodke z manjšim volumnom gojišča aspiriramo v konico katetra in jih izbrizgamo v maternico (postopek ET). V Sloveniji se pri mladih pacientkah (< 35 let) v 1. ali 2. postopku elektivno prenaša po en sam zarodek, da bi se izognili dvoplodni nosečnosti. Le-ta je namreč povezana z več zapleti med nosečnostjo in pri porodu (npr. prezgodnji porod). Nadštevilne zarodke dobre kakovosti z manj kot 30 % fragmentacije in na razvojni stopnji blastociste lahko zamrznemo v tekočem dušiku. Odmrznemo jih in prenesemo v maternico, če pacientka ne zanosti s svežimi zarodki (Virant-Klun in sod., 2002).

2.1.1 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA IZID POSTOPKA KLASIČNE IN VITRO FERTILIZACIJE (IVF) in ICSI

Na izid postopka zunajtelesne oploditve vpliva več različnih dejavnikov.

Prvi in najpomembnejši dejavnik za uspešnost postopka zunajtelesne oploditve je starost pacientke. Dejstvo je, da imajo pacientke, stare 38 let ali več, predvsem pa po štiridesetem letu manjšo možnost za zanositev kot mlajše pacientke. Z višanjem starosti, se znižuje dovzetnost za umetno spodbujanje jajčnikov, hkrati pa se niža tudi število kvalitetnih dozorelih jajčnih celic (Sher in sod., 2005).

S starostjo pacientke narašča delež celic z genetskimi nepravilnostmi (Gianaroli in sod., 2003).

Uspešnost postopka je med drugim odvisna tudi od kvalitete semena, izbire metode zunajtelesne oploditve, stanja maternice, števila in kvalitete prenesenih zarodkov (Sher in sod., 2005) ter izbire metode za stimulacijo jajčnikov (Steyaert in sod., 2000).

Med izrazito negativne faktorje pa uvrščamo mikrobne kontaminacije in infekcije (Coccia in sod., 2004).

2.2 INFEKCIJE IN MIKROBNE KONTAMINACIJE V POSTOPKIH IVF/ICSI

Paciente se pred izvedbo zunajtelesne oploditve testira na prisotnost virusov (hepatitis B virus, hepatitis C virus, virus HIV, citomeglovirus (CMV) in virus rdečk) in na prisotnost klamidij ter povzročiteljic sifilisa (Coccia in sod., 2004). V primeru prisotnosti katerega koli od naštetih patogenov pri vsaj enem od obeh partnerjev v postopku zunajtelesne oploditve, se odgovorni srečujejo s številnimi medicinskimi in etičnimi pomisleki.

Med infekcije, povezane s postopki umetne oploditve, sodijo tudi okužbe, ki so povzročene med samim postopkom, ob vnosu mikroorganizmov z aspiracijsko iglo v sicer sterilne

predele ženskega genitalnega trakta, kar se lahko odraža kot pooperativno pelvično vnetje (Steyaert in sod., 2000). Okužbo, in s tem povezano znižano možnost za uspešno vgnezditev zarodka, lahko sprožimo tudi ob prenosu zarodkov, ko z normalno nožnično floro koloniziranim katetrom mikroorganizme zanesemo v maternico in sprožimo imunski odziv. V študiji, ki so jo izvedli Egbase in sod. (Egbase in sod., 1996) se je stopnja zanositve pri pacientkah, kjer je bila dokazana kolonizacija katetra ob prenosu zarodka, znižala iz 57,1 % (negativna kontrola) na 29,6 %.

2.1.2 KONTAMINACIJE

Niti nožnica, niti semenska tekočina nista sterilni okolji, zato je potrebna izjemna previdnost, da ob izvajanju postopkov zunajtelesne oploditve, ob zbiranju spolnih celic, hkrati ne prenašamo tudi mikroorganizmov. Večina gojišč, ki jih uporabljajo v laboratorijih za oploditev z biomedicinsko pomočjo (OBMP), vsebuje protimikrobna sredstva, da omejijo mikrobno rast, vendar pa kljub temu prihaja do občasnih mikrobnih kolonizacij gojišč z jajčnimi celicami in zarodki. Med razloge sodijo vse večja odpornost proti uporabljenima antibiotikoma, podaljšano gojenje zarodkov in/ali zgolj naključje (Kastrop in sod., 2007).

Natančne pogostosti takšnih kontaminacij in infekcij ne poznamo. Podatki o pojavnosti (incidenci) kontaminacij gojišč se gibljejo med 0,35 % (Cottell in sod., 1996) in 0,69 % (Ben-Chetrit in sod., 1996). Podobno navajajo podatek o pojavnosti kontaminacij gojišč tudi Kastrop in sod. (Kastrop in sod., 2007), ki so izračunali 0,68 % pojavnost v skupno 13977 opravljenih postopkih IVF in ICSI, vendar pa se je odstotek kontaminacij v postopkih IVF ob upoštevanju, da nobeno od gojišč v postopkih ICSI ni bilo kontaminirano, povečal na 0,86 %.

2.1.2.1 VIRI KONTAMINACIJ

Cottel in sod. (Cottel in sod., 1996) navajajo tri možne vire mikrobnih kontaminacij spolnih celic in zarodkov med postopkom zunajtelesne oploditve. Kot prvega naštejejo semensko tekočino in iz nje pripravljen vzorec za inseminacijo. Naslednji možni vir naj bi bil postopek pridobivanja jajčnih celic. V normalnih okoliščinah je folikularna tekočina sterilna, do kontaminacije pa lahko pride, ko z aspiracijsko iglo vnesemo mikroorganizme iz nožnice v folikle. Tretji način je kontaminacija preko okolja izvajanja postopka zunajtelesne oploditve, instrumentov, steklovine, posodic z gojišči, gojišč, inkubatorjev ali osebjem.

2.2.1.1.1 Jajčne celice kot vir kontaminacij

Za zbiranje jajčnih celic v postopku zunajtelesne oploditve se trenutno uporablja vaginalno, ultrazvočno usmerjeno izsrkanje (transvaginalna aspiracija) iz jajčnikovih foliklov (Saltes in sod., 1995).

Pri tem obstaja velika verjetnost, da mikroorganizmi iz nožnice kontaminirajo iglo za izsrkanje ob njenem prodiranju do jajčnika. Čeprav se jajčno celico takoj prenese v gojišče za izpiranje, ki vsebuje penicilin in streptomycin, lahko nekateri mikroorganizmi preživijo postopek in so vir kontaminacij gojišč za razvoj zarodkov. Cottell in sod. (Cottell in sod., 1996) so kot tovrstno posledico kontaminacije osamili bakterije vrste *Mycoplasma hominis* in nehemolitične streptokoke iz dveh (7 %) gojišč. Med skupinama s pozitivno in negativno izolirano kulturo ni bilo statistično značilnih razlik v deležu oplojenih jajčnih celic, stopnji delitve zarodkov in stopnji zanositve.

2.2.1.1.1.1 Naravna flora nožnice

V splošnem velja, da je edini kolonizirani del ženskega genitalnega trakta nožnica. Pestrost mikrobne populacije se močno spreminja pod vplivom hormonskih faktorjev. Ob rojstvu so v nožnici laktobacili in ko po šestih mesecih nivo estrogena pade, se flora zamenja z vključitvijo stafilokokov, streptokokov in enterobakterij. V obdobju pubertete, ko se začne proizvajanje estrogena, ponovno prevladajo laktobacili. Poleg njih pa so sedaj lahko prisotne tudi bakterije iz rodov *Staphylococcus* (v večji meri koagulaza negativni stafilokoki; vrsta *S. aureus* je prisotna manj pogosto), *Streptococcus* (vključno s stafilokoki skupine B), *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* in bakterije družine *Enterobacteriaceae* ter številne anaerobne bakterije. Med glivami najdemo vrste iz rodu *Candida* (Murray in sod., 2005).

Corbishley (Corbishley, 1977) je v svoji raziskavi mikrobne flore nožnice in materničnega vratu med populacijo spolno aktivnih žensk našla med najpogosteje zastopanimi bakterijami laktobacile, koagulaza negativne streptokoke, anaerobne streptokoke, po Gramu pozitivne koke (najverjetneje alfa-hemolitične streptokoke), difterioide in mikroorganizme fekalnega izvora (fekalne streptokoke, *Clostridium welchii*, bakterioide, koliformne bakterije in druge enterobakterije).

V podobni raziskavi so Masfari in sod. (Masfari in sod., 1986) med najpogosteje zastopanimi aerobnimi bakterijami našli laktobacile, korineformne bakterije in koagulaza negativne stafilokoke, med najpogosteje zastopanimi anaerobnimi bakterijami pa so bile vrste iz rodu *Bacteroides* (zlasti *B. bivius*) in anaerobni koki.

2.2.1.1.2 Semenska tekočina in priprava semena

Semenčice vseh placentnih sesalcev so ob ejakulaciji v zaščitnem, nelabilnem stanju in so kot takšne nesposobne oplojevanja, čeprav bi bile izpostavljene direktnemu stiku z jajčno celico. Proces dozorevanja, kapacitacije, skozi katerega morajo iti, da pridobijo sposobnost interakcije s kompleksom jajčna celica-kumulus, preprečujejo dekapacitacijski faktorji v semenski plazmi. Posledično semenčice niso sposobne oplojevanja, dokler so znotraj semenske tekočine.

Za postopek zunajtelesne oploditve morajo biti tako semenčice v čim krajšem času po ejakulaciji izločene iz semenske tekočine. Ob pripravi semenčic je poleg ohranjanja gibljivosti le-teh, potrebno paziti tudi na to, da odstranimo kakršne koli morebitno prisotne mikroorganizme.

Obstajajo štirje osnovni pristopi priprave semena: enostavno redčenje in spiranje, migracija semena, postopki selektivnega spiranja ob uporabi gostotnih gradientov ter vezalne metode, s katerimi odstranimo razpadle in mrtve semenčice (Mortimer, 2000).

Združitev mehanske obdelave in dodanih protimikrobnih sredstev v gojišča za pripravo semena se je izkazala za zelo učinkovito v zmanjševanju števila prisotnih mikrobov (Wong in sod., 1986; Huyser in sod., 1991; Cottell in sod., 1996; Cottell in sod., 1997; Krissi in sod., 2004), razen v redkih primerih množične mikrobne rasti, prisotnosti patogenov in/ali proti penicilinu in/ali streptomycinu odpornih mikroorganizmov, ko te metode postanejo neučinkovite, kar ima možne posledice na izide postopkov zunajtelesne oploditve (Cottell in sod., 1996).

V gojišča za pripravo semena sta dodana penicilin in streptomycin, čeprav njuna možna negativna vpliva na semenčice še nista natančno določena in njuno protimikrobno delovanje ne vključuje vseh možnih prisotnih patogenov v semenski tekočini (Sun in sod., 1987; Cottell in sod., 1997; Kastrop in sod., 2007).

2.2.1.1.2.1 Prisotnost bakterij v semenski tekočini

Pri pacientih v postopkih zunajtelesne oploditve je večina semena kontaminiranega (Wong in sod., 1986; Huyser in sod., 1991; Cottell in sod., 1997, Krissi in sod., 2004). Prisotnost bakterij v semenski plazmi lahko odraža trenutno infekcijo moškega genitalnega trakta ali pa je posledica kontaminacije ob zbiranju vzorca; v tem primeru gre največkrat za kontaminacijo z bakterijami naravne kožne flore (Hewitt in sod., 1985). Cottell in sod. (Cottell in sod., 1997) so pokazali, da je bakteriospermija v večji meri posledica kontaminacije, saj povezave med pozitivnimi vzorci in povišano koncentracijo levkocitov (pokazatelj vnetja) v njih ni bilo.

V svoji raziskavi je Wong s sodelavci (Wong in sod., 1986) med obravnavanimi vzorci semenske tekočine osamil bakterije iz vseh izmed petnajstih vzorcev in med skupno 40 izolati so bili najpogosteje zastopane bakterije iz rodu *Lactobacillus* (26%). Sledile so vrste *Staphylococcus epidermidis* (20%), *Gardnerella vaginalis* (10%) in *Ureaplasma urealyticum* (10%). Huyser (Huyser in sod., 1991) je med najpogosteje zastopanimi mikroorganizmi našel bakterije vrste *Staphylococcus epidermidis* (49,0%), nehemolitične streptokoke (23,0%) in alfa-hemolitične streptokoke (16,9%). Po enotedenski antibiotični terapiji se je stopnja kontaminacije semena znižala iz 92,3 % na 76,0% ($P < 0,0001$). Med najpogostejšimi so se sedaj ponovno pojavile bakterije vrste *Staphylococcus epidermidis* (50,3%), medtem ko se je prisotnost nehemolitičnih streptokokov in alfa-hemolitičnih streptokokov znižala. Med na novo pojavljenimi oportunisti so osamili plesni in bakterije vrste *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, beta-hemolitične streptokoke, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Torulopsis*

glabrata, *Citrobacter freundii* in *Serratia mercenscens*. Med najpogosteje prisotnimi so Cottell in sod. (Cottell in sod., 1997) prav tako našli nehemolitične streptokoke in bakterije vrste *Staphylococcus epidermidis*.

2.2.1.1.2.2 Vpliv prisotnih bakterij v semenski tekočini

Bakterije v semenski tekočini v primeru naravnega spočetja in zanositve ne razumemo kot glavne prepreke za zanositev, čeprav so lahko povezane z nekaterimi oblikami moške neplodnosti (Megory in sod., 1987). V primeru zunajtelesne oploditve pa je lahko drugače (Hewitt in sod., 1985). Za razliko od mikroorganizmov, ki pri normalnem spolnem odnosu sicer vstopijo v nožnico, a jim je vstop v višje predele ženskega genitalnega trakta preprečen zaradi naravnih ovir, imajo mikroorganizmi iz semena v postopku zunajtelesne oploditve možnost, da pridejo v direkten stik z jajčno celico (Cottell in sod., 1997).

Vnos bakterij v gojišče za inseminacijo ima lahko negativen vpliv na oploditev in *in vitro* rast zarodkov (Hewitt in sod., 1985). Po podatkih, ki jih navajajo Kastrop in sod. (Kastrop in sod., 2007), naj bi kar tretjino kontaminacij gojišč povzročali mikroorganizmi iz semenske tekočine. Infekcije gojišč, v katerem so bile jajčne celice, s patogeni *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* in *Candida albicans* so se odražale v degeneraciji jajčnih celic (Huyser in sod., 1991). Nasprotno je pokazala študija, ki so jo izvedli Stovall in sod., (Stovall in sod., 1993) v kateri bakteriospermija ni imela vpliva na oploditev ali na stopnjo zanositve. Z rezultati se strinjajo tudi Krissi in sod. (Krissi in sod., 2004), ki niso našli povezave med bakteriospermijo in stopnjo oploditve ter kvaliteto zarodkov v postopkih zunajtelesne oploditve.

2.2.1.1.2.3 Semenčice, kot prenašalni vektor bakterij

Sluznica materničnega vratu je vedno veljala za učinkovito mehansko in imunološko prepreko pri prehodu bakterijske nožnične flore do višjih delov genitalnega trakta. Toth in sod. (Toth in sod., 1982) pa so pokazali, da bakterije to prepreko lahko ob prisotnosti gibljivih semenčic enostavno obidejo. Izkazalo se je, da lahko aerobne in anaerobne bakterije iz semenskega vzorca, ki se pritrdijo na površino semenčic, enostavno prodirajo skupaj z njimi. Potovanje s semenčicami so potrdili tudi pri po Gramu negativnih aerobnih bakterijah, ki so jih dodali v sterilni vzorec semenske tekočine, medtem ko migracije bakterij v odsotnosti gibljivih semenčic ni bilo. Preden so se bakterije začele premikati skupaj s semenčicami, je bila potrebna eno do tri urna inkubacija bakterij v semenski tekočini.

2.2.1.1.3 Drugi viri kontaminacij

2.2.1.1.3.1 Zrak v prostorih izvajanja OBMP

Karkoli se nahaja v zraku znotraj in v okolici laboratorijev za izvajanje OBMP je močno prisotno tudi znotraj inkubatorjev in gojitvenih kultur. Obstajajo dokazi, da lahko nemikrobne kontaminacije oz. kemično onesnaženje zavre katero koli stopnjo v postopku umetne oploditve. Navsezadnje v inkubatorje vstopa 94-95 % zraka iz laboratorija in 5 % zraka s 5 % CO₂ iz plinskih steklenic (Cohen in sod., 1997).

Študija na mišjih zarodkih je pokazala, da imajo nekatere hlapne organske spojine (akrolein) škodljiv vpliv na molekularne mehanizme celične delitve, kar potrjuje opazovano znižanje stopnje zanositve ob izpostavitvi človeških zarodkov aldehidom (Hall in sod., 1998).

Po gradnji in obnovi operacijske sobe in sobe za nujno medicinsko pomoč v bližini laboratorija za OBMP so Boone in sod. (Boone in sod., 1999) zabeležili znižanje stopnje zanositve iz 35 % na 16 %. Ob prepričanju, da ima kvaliteta zraka vpliv na razvoj zarodkov, so zgradili posebno čisto sobo (angl. cleanroom), kar se je v treh letih odrazilo v dvigu stopnje zanositve na 59 %.

Kastrop in sod. (Kastrop in sod., 2007) izpostavljajo potrebo po študiji, ki bi opredelila tudi pomen mikrobnih kontaminacij zraka za umetno oploditev. Takšni podatki bi bili pomembni tudi pri opredelitvi zahtev, ki jih predpisujeta evropski direktivi (EU Directive 2004/23 in EU Directive 2006/86), vključno z obema aneksoma, kjer je zahtevano redno določanje števila delcev in števila mikrobnih kolonij v zraku prostorov, kjer so tkiva in celice, vključno s spolnimi celicami in zarodki. Evropske direktive so povzete v slovenskem zakonu o tkivih in celicah ter pravilnikih, vezanih na ta zakon.

2.2.1.1.3.2 Voda v inkubatorjih

Svalander (Svalander, 1991) je iz navlaževalnega sistema v inkubatorju za gojenje zarodkov osamil plesen, vrste *Aspergillus niger*, čeprav je bil inkubator dosledno čiščen s 70 % etanolom, kot to predpisujejo zahteve. Za izolat je značilno, da sprošča v okolje visoko toksične metabolite (malformin C). Po uvedbi tehnološko izboljšanega inkubatorja in redni kemični dekontaminaciji se je stopnja zanositve izboljšala (iz 20 % na 30 %). Avtor je izpeljal tudi pilotno študijo, v kateri je mišje zarodke v zgodnji razvojni fazi izpostavil toksinoma plesni *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus flavus*, kar je zavrlo normalen razvoj zarodkov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ODVZEM VZORCEV

Odvzem brisov na snažnost delovnih površin, rok osebja in vzorcev vode za vlaženje zraka iz inkubatorja ter sedimentacijskih plošč za vzorčenje mikroorganizmov v zraku se je vršil med letoma 2001 in 2006 na naslednjih odvzemnih mestih:

Preglednica 1: Pregled odvzemnih mest, ki so bila vključena v raziskavo.

DELOVNE POVRŠINE	ZRAK	ROKE OSEBJA	VODA IZ INKUBATORJA
voziček za instrumente v operacijski dvorani (aspiracija jajčnih celic, prenos zarodkov)	operacijska dvorana	zdravnik v operacijski dvorani	inkubator 1
laminarij 1	laboratorij 1	medicinska sestra	inkubator 2
laminarij 2	laboratorij 2	diplomirana medicinska sestra	inkubator 3
inkubator 1 (polica)	laminarij 1	biolog ob delu z jajčnimi celicami	inkubator 4
inkubator 2 (polica)	laminarij 2	biolog ob pripravi semena	
inkubator 3 (polica)	Inkubator 1		
inkubator 4 (polica)	prostor za mikromanipulacijo		
mikroskop za pripravo semena (delovna mizica)			
mikroskop za mikromanipulacijo (delovna mizica)			
centrifuga za pripravo semena			

Opomba: a – brezprašna komora za delo s spolnimi celicami in zarodki, b – naprava, v kateri gojimo spolne celice in zarodke pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku

Vzorčenje je potekalo vsaj dvakrat letno in sicer na naslednje datume (vendar ne vedno po vseh zgoraj naštetih odvzemnih mestih):

Preglednica 2: Datumi odvzemov brisov delovnih površin, rok osebja, vzorcev zraka in vode iz inkubatorjev.

DATUMI ODVZEMOV

04.07.2001

25.10.2001

30.01.2002

29.05.2002

19.11.2002

21.05.2003

27.11.2003

16.03.2004

14.06.2004

22.09.2004

15.12.2004

15.03.2005

20.06.2005

28.09.2005

13.12.2005

08.03.2006

05.06.2006

19.09.2006

10.10.2006

25.10.2006

07.11.2006

22.11.2006

06.12.2006

Potrební material je bil po predhodnem naročilu pripravljén in dostavljen iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vzorčenje je bilo namenjeno iskanju in identifikaciji bakterij ter gliv, ki so bile prisotne na posameznih odvzemnih mestih znotraj prostorov izvajanja klasičnega postopka zunajtelesne oploditve in postopka mikromanipulacije na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Prisotnost ostalih mikroorganizmov in virusov ni bila testirana.

3.1.1 KONTROLA SNAŽNOSTI POVRŠIN Z BRISI

S sterilnimi brisi v epruветah s 5 mL fiziološke raztopine so odvzeli brise površin naslednjih odvzemnih mest: voziček za inštrumente v operacijski dvorani, laminarij (brezprašna komora) 1, laminarij 2, polica v inkubatorjih 1-4 za gojenje spolnih celic in zarodkov, mizica mikroskopa za pripravo semena, mizica mikroskopa za mikromanipulacijo in rotor centrifuge za pripravo semena. Na vsakem odvzemnem mestu je bil odvzet po en vzorec brez uporabe sterilne šablone. Vsi brisi so bili odvzeti v jutranjem času pred ali med delom osebja. Ob izpolnjenem sprejemnem listu so bile nato epruветe z brisi napotene na analizo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

3.1.2 NADZOR ZRAKA S SEDIMENTACIJSKIMI PLOŠČICAMI

Petrijeve plošče s krvnim agarjem, premera 10 cm, so bile izpostavljene zraku za čas 1-3 ure. V vsakega od izbranih prostorov (operacijska dvorana, laboratorij 1, laboratorij 2, laminarij 1, laminarij 2, inkubator 1 (zunajtelesna oploditev) in prostor, v katerem se izvaja mikromanipulacija) je bila še pred začetkom dela laboratorijskega osebja postavljena po ena plošča. Mesto odlaganja plošče je bilo izbrano tako, da plošče niso ovirale sočasnega dela v prostoru (visoko na omari, na inkubatorju, v kotu laminarijev,...). Po preteklem času

so plošče pokrili in zalepili ter s sprejemnim listom napotili na analizo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

3.1.3 ODVZEM BRISOV ROK OSEBJA

Z enakim sterilnim brisom kot v primeru kontrole snažnosti površin so bili odvzeti brisi rok zdravnika v operacijski dvorani pred zbiranjem jajčnih celic, medicinske sestre, ki ima neposredni stik z aspiracijsko iglo in epruveto za prenos jajčnih celic v folikularni tekočini, diplomirane medicinske sestre, ki je prav tako prisotna v operacijski dvorani, biologa, ki sprejme in pripravi jajčne celice za postopek ter biologa, ki pripravlja seme in izvaja samo inseminacijo. Z brisom so v jutranjem času (pred delom) obrisali površino (le ene) dlani, konic prstov in zlasti predelov okrog nohtov ter morebitno prisotnega prstana. Bris je bil v epruveti s 5 mL fiziološke raztopine in izpolnjenim sprejemnim listom oddan v analizo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo.

3.1.4 ODVZEM VZORCA VODE IZ INKUBATORJA

Vzorec vode za vlaženje zraka v inkubatorju je bil odvzet ob sodelovanju dveh oseb. Prva je odprla in pridržala vrata inkubatorja, medtem ko je druga s sterilno brizgo posrkala po 20 mL vode z dna inkubatorjev 1, 2, 3 in 4. Vzorec, opremljen s podatki o odvzemu, je bil oddan v analizo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo.

3.2 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

3.2.1 OBDELAVA BRISOV DELOVNIH POVRŠIN IN ROK OSEBJA

Po sprejemu brisov v mikrobiološki laboratorij je sledila obdelava vzorcev. Iz vsake prispele epruvete so po pretresanju prenesli po 0,1 mL vsebovane fiziološke raztopine na ploščo s krvnim agarjem in jih inkubirali 24 ur pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter po potrebi inkubacijo pri istih pogojih podaljšali še za dodatnih 24 ur. Po 0,5 mL fiziološke raztopine iz prispelih brisov so po pretresanju prenesli v tekoče obogatitveno gojišče TIO (tioglikolat) ter inkubirali 7 dni pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. V primeru, da je gojišče postalo motno, so vzorec precepili na krvni agar. Tretje gojišče, ki je bilo uporabljeno v prvem koraku, je gojišče LAP (gojišče z laktozo), v katerem so pustili bris tri dni pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gojišču je dodan pH indikator, ki se ob prisotnosti mikroorganizmov, ki fermentirajo laktozo, obarva rdeče. Ob spremembi barve so vzorec prav tako precepili na krvni agar.

3.2.2 OBDELAVA VZORCEV VODE IZ INKUBATORJA

Vzorci vode iz inkubatorjev so se obravnavali kot izpirki, kar pomeni, da je bilo po 0,1 mL vzorca prenesenega na ploščo s krvnim agarjem, ki so jo pustili inkubirati 24 ur pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po potrebi so inkubacijo podaljšali še za dodatnih 24 ur pri istih pogojih. Po 0,5 mL vzorca vode so prenesli v tekoče obogatitveno gojišče TIO. Po 7 dnevni inkubaciji pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ so v primeru nastale motnosti vzorec prenesli na krvni agar. V gojišče z dodano laktozo in pH indikatorjem (LAP) so prenesli po 0,3 mL vzorca vode iz inkubatorja, pustili inkubirati 3 dni pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in v primeru spremembe barve pH indikatorja z vzorcem obarvanega gojišča inokulirali ploščo s krvnim agarjem.

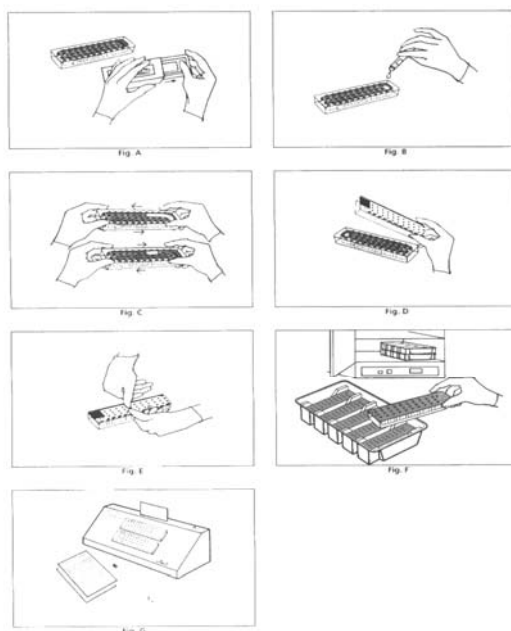
3.2.3 OBDELAVA PRISPELIH SEDIMENTACIJSKIH PLOŠČ

Prispele plošče s krvnim agarjem so inkubirali pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 NADALJNA OBDELAVA VZORCEV

Kolonije mikroorganizmov, ki so zrasle na ploščah s krvnim agarjem, so prešteli in jih nadalje analizirali glede na fenotipske lastnosti. Kolonije plesni so identificirali v mikološkem laboratoriju glede na mikroskopske lastnosti. Tam so prav tako določali identifikacijo kolonij kvasovk in sicer z uporabo API Candida identifikacijskega kita, ki deluje na osnovi biokemičnih, presnovnih lastnosti kvasovk.

Identifikacijo bakterijskih kolonij so določali z uporabo sistema Crystal. Pri slednjem ločimo dva sistema identifikacije, in sicer za po Gramu pozitivne bakterije ločeno od za po Gramu negativnih bakterij. V osnovi gre pri obeh sistemih za identifikacijo, ki temelji na 30-ih biokemičnih lastnostih in reakcijah.



Slika 1: Prikaz postopka identifikacije bakterij s sistemom Crystal (priloga ob identifikacijskem kitu).

3.2.5 REZULTATI ANALIZE

Število in vrsto kolonij mikroorganizmov so iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo posredovali na Oddelek za reprodukcijo, Ginekološke klinike v Ljubljani, kjer so se izvidi shranjevali v papirnati obliki.

3.3 OBDELAVA PODATKOV

V začetni fazi je bilo potrebno vse rezultate mikrobioloških analiz pretvoriti v primerno računalniško obliko za začetno obdelavo v programu Excel. Predpostavili smo, da so se identificirani mikroorganizmi na odvzemnih mestih, s katerih so bili osamljeni, tam nahajali vsaj pet dni pred in pet dni po dnevu odvzema vzorca. Tako smo podatke o izolatih na posamezni datum povezali s podatki pacientk v postopkih zunajtelesne oploditve, ki so znotraj tega intervala (datum odvzema vzorca ± 5 dni) sodelovale v aspiraciji jajčnih celic. Od rezultatov mikrobioloških analiz smo uporabili podatke o skupnem številu izoliranih kolonij ter številu kolonij in identifikaciji posameznih osamljenih mikroorganizmov. Od podatkov pacientk nas je zanimala starost pacientke, število pridobljenih jajčnih celic, število oplojenih jajčnih celic, število in razvojna stopnja zarodkov (zlasti število zarodkov na razvojni stopnji blastociste), metoda (IVF ali ICSI) in uspešnost zanositve.

3.3.1 STATISTIČNA OBDELAVA

S pomočjo statističnega testa hi-kvadrat smo določali statistično značilno ($p < 0,05$) povezavo med deležem oplojenih jajčnih celic (to skupino podatkov smo zaradi lažje analize poimenovali in obdelovali pod imenom »oploditev«), ki so bile izpostavljene (pozitivna kultura) prisotnosti mikroorganizmov na določenem odvzemnem mestu in tistimi, ki niso bile izpostavljene (negativna kultura). Prav tako smo s testom hi-kvadrat določali statistično značilen ($p < 0,05$) vpliv prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na posameznem odvzemnem mestu tudi na delež zarodkov, razvitih do stopnje blastociste (to skupino podatkov smo zaradi lažje analize obdelovali pod skupino »zarodki«). Kot tretje, smo za vsako odvzemno mesto določili tudi statistično značilen ($p < 0,05$) vpliv prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na število pacientk, ki so in tistimi, ki niso zanosile (skupina »nosečnost«).

Najprej smo določili statistično značilen ($p < 0,05$) vpliv prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na zgoraj našteje izide zunajtelesne oploditve (oploditev, zarodki in nosečnost) v celotnem obsegu podatkov za vsako posamezno odvzemno mesto, ne glede na starost pacientke ali pripadajoče uporabljene metode (IVF ali ICSI). Nato smo izračune ponovili znotraj istega nabora postopkov, le da smo tokrat upoštevali izbrano metodo (ločeno računanje za IVF in ICSI), ne pa tudi starosti pacientke. V naslednjem koraku smo upoštevali le starost pacientk (pod 38 let ali vsaj 38 let) ne glede na metodo. Kot zadnje pa smo izračunali vpliv prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na posameznem odvzemnem mestu na izide zunajtelesne oploditve ob upoštevanju starosti pacientk in uporabljene metode.

V nadaljevanju smo pregledali vplive prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na oploditev, zarodke in nosečnost ter za posamezna odvzemna mesta, na katerih se je pokazal statistično značilen vpliv ($p < 0,05$) prisotnosti mikroorganizmov na izide, z uporabo statističnega paketa SPSS in izračuna Pearsonovega in Spearmanovega koeficienta natančneje določili vpliv izoliranih mikroorganizmov na te parametre.

4 REZULTATI

Brisi na snažnost delovnih površin, rok osebja, vzorci vode iz inkubatorjev in vzorci mikroorganizmov iz zraka so bili odvzeti po 23-ih dnevih med letoma 2001 in 2006. Iz populacije postopkov zunajtelesne oploditve (IVF ali ICSI), ki so bili opravljeni v tem obdobju, smo v vzorec zajeli 624 postopkov, ki so ustrezali kriteriju in so bili opravljeni znotraj intervala petih dni pred in po datumu odvzema vzorcev.

4.1 VPLIV PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV NA IZID POSTOPKOV ZUNAJTELESNE OPLODITVE

4.1.1 IZOLIRANI MIKROORGANIZMI GLEDE NA ODVZEMNO MESTO

Znotraj vseh 23-ih intervalov so skupno osamili 36 skupin bakterij in gliv. Od 271 odvzetih vzorcev je bilo 193 pozitivnih (71,2 %) in 78 negativnih (28,8 %). Podatki so zbrani v preglednicah 3- 6, kjer so izolati izpisani ločeno v treh skupinah (bakterije, glive in neznano) in sicer tako, da so z vodoravno črto dodatno ločene bakterijske vrste, ki so in tiste, ki niso del naravne flore ženskega genitalnega trakta (podatki povzeti po Masfari in sod., 1986). Vrednosti v preglednicah predstavljajo največje število izoliranih kolonij posameznega mikroorganizma na posameznem odvzemnem mestu, ne glede na datum odvzema vzorca. Za mesta, kjer ni bilo navedenega števila kolonij, ampak le potrjena prisotnost, je v tabelah označeno z besedo »prisotna«. Ime izolata smo povzeli po rezultatih mikrobioloških analiz, ki identifikacije niso podale vedno do vrste izolata. Tako najverjetneje niso posamezne vrste izoliranih mikroorganizmov vedno le v eni kategoriji oz. vrstici (v skupini KNS-koagulaza negativni streptokoki so verjetno vključene tudi vrste streptokokov, ki so našteje kot samostojna kategorija).

Za preglednice 3-6 glej opombo pod preglednico 6.

Preglednica 3: Seznam mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin v prostorih OBMP.

vrsta mikroorganizma	delovne površine									
	voziček	lam 1	lam 2	ink 1	ink 2	ink 3	ink 4	mikroskop	mikr.ICSI	centrifuga
	1+, 5-	16+, 7-	11+, 9-	15+, 2-	8+, 1-	9+, 11-	6+, 2-	11+, 8-	2+, 4-	3+, 3-
BAKTERIJE										
DEL NORMALNE FLORE										
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		200	250	12000	1000	prisotna	50000	50		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		50	50	5000	50		22000	50	300	50
<i>Staphylococcus warneri</i>		50		2000	1500	∞		50		50
<i>Staphylococcus hominis</i>	50	50	50		1500	50		300		
<i>Staphylococcus cohnii</i>		50				∞				
<i>Staphylococcus capitis</i>								50		
KNS			50	50			50			
<i>Corynebacterium sp.</i>				1000						
α hemolitični streptokoki		800	50					50		
NISO DEL NORMALNE FLORE										
<i>Staphylococcus aureus</i>				100						
<i>Pantoea agglomerans</i>										
<i>Bacillus spp.</i>		50								
<i>Bacillus cereus</i>										
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>										50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									50	
<i>Micrococcus spp.</i>										50
<i>Micrococcus luteus</i>										
mešana bakterijska flora										
<i>Flavobacterium odoratum</i>										
<i>Ravobacterium odoratum</i>										
<i>Bulkolderia cepacia</i>										
<i>Brevundimonas vesicularis</i>										
GLIVE										
<i>Penicillium sp.</i>		50		50	50	50	50			
<i>Pseudallescheria sp.</i>				50						
glive kvasovke							50			
<i>Candida parapsilosis</i>				prisotna						
<i>Aspergillus sp.</i>							100			
<i>Aspergillus versicolor</i>				prisotna						
<i>Aspergillus flavus</i>										
<i>Aspergillus fumigatus</i>										
<i>Aspergillus niger</i>										
<i>Cladosporium sp.</i>										
<i>Alternaria sp.</i>										
<i>Aurebasidium pullulans</i>										
plesni				50		prisotna				
NEZNANO										

Glej opombo pod preglednico 6.

Preglednica 4: Seznam mikroorganizmov, izoliranih z rok osebja, ki sodeluje pri zunajtelesni oploditvi.

vrsta mikroorganizma	osebje				
	biol.(sper.)	zdravnik v oper.dvor.	med.sestra	cel. biolog	dipl.med.sestra
	3+, 5-	9+, 0-	6+, 4-	17+, 2-	1+, 0-
BAKTERIJE					
DEL NORMALNE FLORE					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	2500	150	13000	2000
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		300		1000	
<i>Staphylococcus warneri</i>				300	100
<i>Staphylococcus hominis</i>		2000	50	10000	
<i>Staphylococcus cohnii</i>					
<i>Staphylococcus capitis</i>					
KNS			1800		
<i>Corynebacterium sp.</i>				2200	
α hemolitični streptokoki		50	50	50	
NISO DEL NORMALNE FLORE					
<i>Staphylococcus aureus</i>				100	
<i>Pantoea agglomerans</i>		50			
<i>Bacillus spp.</i>		50		50	
<i>Bacillus cereus</i>		50	50		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50			
<i>Micrococcus spp.</i>					
<i>Micrococcus luteus</i>					
mešana bakterijska flora					
<i>Flavobacterium odoratum</i>					
<i>Ravobacterium odoratum</i>					
<i>Bulkolderia cepacia</i>					
<i>Brevundimonas vesicularis</i>					
GLIVE					
<i>Penicillium sp.</i>					
<i>Pseudallescheria sp.</i>					
glive kvasovke					
<i>Candida parapsilosis</i>					
<i>Aspergillus sp.</i>					
<i>Aspergillus versicolor</i>					
<i>Aspergillus flavus</i>					
<i>Aspergillus fumigatus</i>					
<i>Aspergillus niger</i>					
<i>Cladosporium sp.</i>					
<i>Alternaria sp.</i>					
<i>Aurebasidium pullulans</i>					
plesni					
NEZNANO					

Glej opombo pod preglednico 6.

Preglednica 5: Seznam izoliranih mikroorganizmov iz sedimentacijskih plošč (zrak v prostorih OBMP).

vrsta mikroorganizma	zrak						
	OPERACIJSKA	LAB 1	LAB 2	LAM 1	LAM 2	INK 1	p ICSI
	20+, 3-	14+, 4-	20+, 0-	2+, 0-	1+, 1-	3+, 0-	1+, 0-
BAKTERIJE							
DEL NORMALNE FLORE							
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30	20	120	3	3	8	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	110	120	15	4	1	2	
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	4	20	2		1	
<i>Staphylococcus hominis</i>	46	100	20				
<i>Staphylococcus cohnii</i>			3				
<i>Staphylococcus capitis</i>	9	20					
KNS			2				
<i>Corynebacterium sp.</i>							
α hememolitični streptokoki	10	40	60				
NISO DEL NORMALNE FLORE							
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1					
<i>Pantoea agglomerans</i>		6					
<i>Bacillus spp.</i>							
<i>Bacillus cereus</i>							
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
<i>Micrococcus spp.</i>		1	6				
<i>Micrococcus luteus</i>	6						
mešana bakterijska flora							
<i>Flavobacterium odoratum</i>							
<i>Ravobacterium odoratum</i>							
<i>Bulkolderia cepacia</i>							
<i>Brevundimonas vesicularis</i>							
GLIVE							
<i>Penicillium sp.</i>	5						15
<i>Pseudallescheria sp.</i>							
glive kvasovke							
<i>Candida parapsilosis</i>							
<i>Aspergillus sp.</i>	5						
<i>Aspergillus versicolor</i>							
<i>Aspergillus flavus</i>	24	1	prisotna				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	3	prisotna				3
<i>Aspergillus niger</i>			prisotna				
<i>Cladosporium sp.</i>	15						16
<i>Alternaria sp.</i>	3						2
<i>Aurebasidium pullulans</i>	1						
plesni							
NEZNANO	3	2	4				

Glej opombo pod preglednico 6.

Preglednica 6: Seznam izoliranih mikroorganizmov iz vode iz inkubatorjev v prostorih OBMP.

vrsta mikroorganizma	voda iz inkubatorja			
	INKUBATOR 1	INKUBATOR 2	INKUBATOR 3	INKUBATOR 4
	1+, 0-	4+, 3-	2+, 5-	3+, 3-
BAKTERIJE				
DEL NORMALNE FLORE				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				50
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>				
<i>Staphylococcus warneri</i>				
<i>Staphylococcus hominis</i>				
<i>Staphylococcus cohnii</i>				
<i>Staphylococcus capitis</i>				
KNS				
<i>Corynebacterium sp.</i>				
α hememolitični streptokoki				
NISO DEL NORMALNE FLORE				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Pantoea agglomerans</i>				
<i>Bacillus spp.</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			10	
<i>Micrococcus spp.</i>				
<i>Micrococcus luteus</i>				
mešana bakterijska flora				
<i>Flavobacterium odoratum</i>		prisotna		
<i>Ravobacterium odoratum</i>	prisotna			
<i>Bulkolderia cepacia</i>				1000
<i>Brevundimonas vesicularis</i>			10	
GLIVE				
<i>Penicillium sp.</i>				
<i>Pseudallescheria sp.</i>				
glive kvasovke				
<i>Candida parapsilosis</i>				
<i>Aspergillus sp.</i>		10		20
<i>Aspergillus versicolor</i>				
<i>Aspergillus flavus</i>				
<i>Aspergillus fumigatus</i>		10		
<i>Aspergillus niger</i>				
<i>Cladosporium sp.</i>				
<i>Alternaria sp.</i>				
<i>Aurebasidium pullulans</i>				
plesni				
NEZNANO				

Opomba: Pod odvzemnimi mesti je označeno število odvzetih vzorcev (s + je označeno število pozitivnih brisov in z – število negativnih brisov). Za posamezne izolate so navedene le najvišje vrednosti števila kolonij, ki so jih izolirali na posameznem mestu, ne glede na datum odvzema vzorca.

Iz preglednic 3-6 je razvidno, da so iz odvzemnih mestih delovnih površin in rok osebja, največkrat izolirali bakterijske predstavnike naravne flore. Največje število različnih vrst so izolirali iz zraka, kjer zlasti izstopa zrak v operacijski sobi. Z rok osebja niso izolirali nobenega predstavnika gliv. Največje skupno število kolonij in največje število kolonij posameznih vrst so izolirali z delovnih površin.

4.1.2 VPLIV PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV NA POSAMEZNEM ODVZEMNEM MESTU

Zaradi premajhnega števila odvzetih vzorcev na določenih odvzemnih mestih ali pa zaradi dejstva, da nekaterih od odvzemnih mest ni mogoče zagotavljati sterilnih, smo iz nadaljne obdelave podatkov morali izključiti podatke za 9 odvzemnih mest (površina operacijske mize, zrak v laboratorijih 1 in 2, zrak v laminariju 1, zrak v inkubatorju 1, zrak v prostoru za mikromanipulacijo, roke zdravnika v operacijski dvorani in diplomirane medicinske sestre ter voda iz inkubatorja 1), čeprav smo s tem tvegali izgubo pomembnih podatkov o obstoju povezave med prisotnimi mikroorganizmi in izidi zunajtelesne oploditve. Zaradi tega razloga smo v večji meri izgubili vpogled v pomen prisotnosti mikroorganizmov v zraku, pa tudi na rokah osebja (zlasti zdravnika v operacijski dvorani ob aspiraciji jajčnih celic).

Za ugotavljanje obstoja statistično značilne ($p < 0,05$) zveze med prisotnostjo mikroorganizmov na posameznih odvzemnih mestih in vsakim od parametrov: oploditev, zarodki in nosečnost smo uporabili neparametrični test hi-kvadrat. V prilogah A1, A2 in A3 so z besedo »vpliva« označena vsa mesta, na katerih smo uspeli dokazati statistično

značilno povezavo pri $p < 0,05$ (ostale povezave niso bile statistično značilne in so v preglednicah neoznačene-prazne celice).

Pri nadaljni obdelavi smo upoštevali le tista odvzemna mesta, pri katerih se je povezava (v prilogah A1, A2 in A3 označeno z »vpliva«) pokazala smiselno ponovljeno glede na starost pacientk in metodo. Tako smo upoštevali le tista odvzemna mesta, kjer smo s testom hi-kvadrat statistično značilno povezavo izračunali tako pri postopkih, ločenih le glede na metodo in ne glede na starost pacientke ter hkrati v eni od skupin postopkov zunajtelesne oploditve, ločenih glede na izbrano metodo in hkrati tudi starost pacientke.

Tem kriterijem so znotraj skupine »oploditev« (priloga A1) zadostila odvzemna mesta laminarij 1 (delovna površina), laminarij 2 (delovna površina), inkubator 1 (delovna površina), mikroskop za pripravo semena (delovna površina), biolog pri pripravi semena in ob inseminaciji (osebje), biolog pri oskrbi jajčnih celic (osebje) in medicinska sestra (osebje). V skupini »zarodki« (priloga A2) smo upoštevali inkubator 4 (delovana površina), mikroskop za pripravo semena (delovna površina), mikroskop za mikromanipulacijo (delovna površina), laminarij 2 (zrak), biologa pri oskrbi jajčnih celic (osebje) in vodo iz inkubatorja 4. Na stopnjo zanositve (priloga A3) so po izračunih testa hi-kvadrat statistično značilno ($p < 0,05$) vplivali zrak v operacijski dvorani, biolog pri pripravi semena, delovna površina na mikroskopu za mikromanipulacijo in medicinska sestra.

V preglednici 7 so poleg označene statistično značilne ($p < 0,05$) povezave zapisane še lastnosti skupine za katero ta povezava velja.

Preglednica 7: Odvzemna mesta, za katera se je pokazala statistično značilna povezava med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov in izidom zunajtelesne oploditve ($p < 0,05$).

odvzemno mesto	vpliv na oploditev	vpliv na razvoj zarodkov	vpliv na nosečnost
OSEBJE			
medicinska sestra	+ (pod 38 let/IVF)	-	+ (pod 38 let/IVF)
biolog pri pripravi semena	+ (pod 38 let/IVF)	-	+ (pod 38 let/ICSI)
biolog ob oskrbi jajč. celic	+ (nad 38 let ali več/IVF)	+ (pod 38 let/ICSI)	-
DELOVNE POVRŠINE			
laminarij 1	+ (vse/vse)	-	-
laminarij 2	+ (pod 38 let/ICSI)	-	-
inkubator 1	+ (pod 38 let/IVF)	-	-
mikroskop	+ (pod 38 let/IVF)	+ (vse/vse)	-
mikroskop ICSI	-	+ (pod 38 let/ICSI)	-
inkubator 4	-	+ (pod 38 let/ICSI)	-
ZRAK			
laminarij 2	-	-	+ (vse/IVF)
operacijska dvorana	-	-	+ (pod 38 let/IVF)
VODA IZ INKUBATORJA			
inkubator 4	-	+ (pod 38 let/ICSI)	-

Opomba: S + so označene izračunane statistično značilne povezave in z – povezave, ki niso statistično značilne. V oklepajih je na prvem mestu navedena starostna skupina pacientk, na drugem mestu pa izbrana metoda zunajtelesne oploditve, za katero se je pokazala statistično značilna povezava.

Pokazalo se je (preglednica 7), da sta procesa oploditve in zanositve bolj občutljiva na prisotnost mikroorganizmov v klasičnem postopku zunajtelesne oploditve, predvsem pri mlajših pacientkah (pod 38 let). Obratno pa je bil razvoj zarodkov občutljivejši na prisotnost mikroorganizmov v postopku ICSI, predvsem pri pacientkah, mlajših od 38 let.

4.1.3 REZULTATI ZUNAJTELESNE OPLODITVE GLEDE NA PRISOTNOST MIKROORGANIZMOV

Lastnosti skupine opravljenih postopkov zunajtelesne oploditve ob prisotnosti mikroorganizmov so primerljive s tistimi ob odsotnosti mikroorganizmov (priloga B1).

Iz posameznih izračunov (priloga B1) je očitno, da prisotnost mikroorganizmov na specifičnem odvzemnem mestu ni vplivala vedno negativno na izide postopkov zunajtelesne oploditve. Prav tako prisotnost mikroorganizmov na določenem mestu ni imela enakosmerne vpliva na vse tri odstotke; razen v primerih prisotnosti mikroorganizmov z rok medicinske sestre in biologa pri delu s semenom, kjer se je prisotnost bakterij kazala izrazito negativno za vse izide ter v primeru mikroorganizmov v zraku laminarija 2, kjer se je njihova prisotnost odražala kot dobrodošla za izide zunajtelesne oploditve.

Največja statistično značilna razlika med deležema oplojenih celic glede na prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov (priloga B1) je bila opazna pri medicinski sestri in znaša 7,7 % (54 % vs. 61,7 %) v korist odsotnosti mikroorganizmov. Največja razlika med deležema blastocist glede na prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov, ki je bila potrjena kot statistično značilna, je bila izračunana za odvzemno mesto površina v inkubatorju 4 in znaša 18,2 % (32,8 % vs. 51,0 %) v korist prisotnosti mikroorganizmov. Med deležema nosečnosti ali stopnjama zanositve je največja statistično značilna razlika znašala 14,4 % (odvzemno mesto: biolog, ki pripravlja seme in izvaja inseminacijo) in sicer v korist prisotnosti mikroorganizmov (18,6 % vs. 33,0 %).

V prilogi B2, so za vsako odvzemno mesto, kjer se je pokazala statistično značilna povezava med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov in vsaj enim od izidov zunajtelesne oploditve, naštetih osamljeni mikroorganizmi.

Najvišje vrednosti izoliranih vrst (priloga B2) so bile v zraku operacijske dvorane, kjer se izvajata aspiracija jajčnih celic in prenos zarodkov.

4.1.4 SMER VPLIVA PRISOTNOSTI MIKROORGANIZMOV

Ko smo izračunane deleže izidov postopkov zunajtelesne oploditve iz priloge B1, združili s podatki iz priloge B2, se je pokazala smer povezave med prisotnostjo mikroorganizmov na specifičnem odvzemnem mestu in izidom zunajtelesne oploditve. Pozitiven ali negativen vpliv prisotnosti na izid je razviden iz preglednice 8.

Preglednica 8: Prikaz smeri vpliva prisotnosti mikroorganizmov na delež oplojenih jajčnih celic, razvoj zarodkov do stopnje blastociste in stopnjo zanositve.

odvzemno mesto	vpliv na oploditev	vpliv na razvoj zarodkov	vpliv na nosečnost
OSEBJE			
medicinska sestra	- (54 % vs. 62 %)	/	- (21 % vs. 34 %)
biolog pri pripravi semena	- (56,8 % vs. 58,4 %)	/	- (19 % vs. 33 %)
biolog ob oskrbi jajč.celic	+ (56 % vs. 49 %)	- (45 % vs. 54 %)	/
DELOVNE POVRŠINE			
laminarij 1	+ (57 % vs. 51 %)	/	/
laminarij 2	+ (58 % vs. 55 %)	/	/
inkubator 1	- (53 % vs. 59 %)	/	/
mikroskop	- (53 % vs. 58 %)	+ (52 % vs. 37 %)	/
mikroskop ICSI	/	+ (38 % vs. 30 %)	/
inkubator 4	/	- (33 % vs. 51 %)	/
ZRAK			
laminarij 2	/	/	+ (15 % vs. 6 %)
operacijska dvorana	/	/	+ (23 % vs. 9 %)
VODA IZ INKUBATORJA			
inkubator 4	/	+ (37 % vs. 30 %)	/

Opomba: S + je označen pozitiven vpliv, z – negativen vpliv in s / statistično neznačilen vpliv. V oklepaju je na prvem mestu navedena vrednost ustreznega izida zunajtelesne oploditve v primeru prisotnosti mikroorganizmov, na drugem pa vrednost ob njihovi odsotnosti.

Najizrazitejše razlike v vrednostih izidov (preglednica 8) med skupinama postopkov ob prisotnosti in odsotnosti mikroorganizmov so se pokazale pri vplivu na nosečnost in razvoj zarodkov.

Prisotnost mikroorganizmov na dlaneh medicinske sestre je imela negativen vpliv (preglednica 8) na delež oplojenih celic. Če so bili na dlaneh medicinske sestre

mikroorganizmi prisotni, je bil delež oplojenih jajčnih celic statistično značilno manjši, kot v primeru odsotnosti mikroorganizmov (54 % vs. 62 %, $p < 0,05$). Pri analizi s testom hi-kvadrat (preglednica 7) smo potrdili statistično pomemben vpliv pri mlajši skupini žensk (pod 38 let) v postopku IVF. Prav tako negativno je prisotnost mikroorganizmov na dlaneh medicinske sestre vplivala tudi na stopnjo zanositve v postopkih zunajtelesne oploditve (preglednica 8). Če so na dlaneh medicinske sestre bili mikroorganizmi prisotni, je bila stopnja zanositve 21 % na postopek, v primeru njihove odsotnosti, pa je bila stopnja zanositve statistično značilno višja in je znašala 34 % ($p < 0,05$). Rezultati testa hi-kvadrat so potrdili statistično značilen vpliv prisotnosti mikroorganizmov na dlaneh medicinske sestre na zanositev pri mlajši skupini pacientk v postopkih ICSI (preglednica 7).

Ravno tako, kot mikroorganizmi na dlaneh medicinske sestre, so imeli negativen vpliv na oploditev in zanositev tudi mikroorganizmi, ki so bili prisotni na dlaneh biologa v laboratoriju, ki je pripravljajl seme in izvedel samo osemenitev (inseminacijo) jajčnih celic (preglednica 8). Prisotnost mikroorganizmov na njegovih dlaneh se je odražala v statistično značilno manjšem deležu oplojenih celic, kot v primeru, da na njegovih rokah ni bilo prisotnih mikroorganizmov (56,8 % vs. 58,4 %, $p < 0,05$). Test hi-kvadrat (preglednica 7) je povezavo potrdil pri skupini mlajših žensk v postopku IVF. Prav tako je bila v prisotnosti mikroorganizmov statistično značilno nižja tudi stopnja zanositve (19 % vs. 33 %, $p < 0,05$) (preglednica 8). S testom hi-kvadrat smo potrdili statistično značilno povezavo pri skupini mlajših pacientk v postopkih ICSI (preglednica 7).

Prisotnost mikroorganizmov na dlaneh biologa, ki je v laboratoriju oskrbel jajčne celice, je imela pozitiven vpliv na delež oplojenih celic (preglednica 8). Če so na njegovih dlaneh mikroorganizmi bili prisotni, je bil delež oploditve statistično značilno višji, kot če mikroorganizmi niso bili prisotni (56 % vs. 49 %, $p < 0,05$). S testom hi-kvadrat smo potrdili statistično značilno povezavo za skupino pacientk, starejših od 38 let, v postopku IVF (preglednica 7). Nasproten vpliv pa je imela prisotnost mikroorganizmov na njegovih dlaneh na razvoj zarodkov (preglednica 8), kjer se je prisotnost mikroorganizmov v primerjavi z odsotnostjo odražala v statistično značilnem manjšem deležu zarodkov,

razvitih do stopnje blastociste (45 % vs. 54 %, $p < 0,05$). Glede na rezultate testa hi-kvadrat ta povezava statistično značilno drži za skupino mlajših pacientk v postopku ICSI (preglednica 7).

Prisotnost mikroorganizmov na odvzemnih mestih laminarij 1 in laminarij 2 je imela pozitiven vpliv na oploditev (preglednica 8). V primeru laminarija 1 je bil delež oplojenih celic v prisotnosti mikroorganizmov statistično značilno višji za 6 % (57 % vs. 51 %, $p < 0,05$), v primeru laminarija 2 pa za 3 % (58 % vs. 55 %, $p < 0,05$). S testom hi-kvadrat se je pokazala statistično značilna povezava med prisotnostjo mikroorganizmov na odvzemnem mestu laminarij 1 in oploditvijo pri vseh pacientkah, ne glede na starost in metodo (preglednica 7). Povezava med prisotnostjo mikroorganizmov na odvzemnem mestu laminarij 2 in oploditvijo, glede na rezultate testa hi-kvadrat, statistično značilno obstaja v skupini mlajših pacientk v postopkih ICSI.

Če so bili mikroorganizmi prisotni v inkubatorju 1 (preglednica 8), je bil delež oplojenih jajčnih celic statistično značilno manjši, kot v primeru, da mikroorganizmi niso bili prisotni (53 % vs. 59 %, $p < 0,05$). Test hi-kvadrat je to potrdil za skupino mlajših pacientk v postopku IVF (preglednica 7).

Rezultati so pokazali, da če so bili mikroorganizmi prisotni na mikroskopu za pripravo semena (preglednica 8), je to imelo negativen vpliv na oploditev in hkrati pozitiven vpliv na razvoj zarodkov. Ob prisotnosti mikroorganizmov je bil delež oplojenih jajčnih celic statistično značilno manjši, kot v primeru njihove odsotnosti (53 % vs. 58 %, $p < 0,05$). Test hi-kvadrat je to potrdil za skupino mlajših pacientk v postopkih IVF (preglednica 7). Nasprotno je bil statistično značilno večji delež blastocist (preglednica 8), če so mikroorganizmi bili prisotni, v primerjavi z deležem ob njihovi odsotnosti (52 % vs. 37 %, $p < 0,05$). S pomočjo testa hi-kvadrat se je statistično značilna povezava pokazala pri vseh pacientkah, ne glede na starost in metodo (preglednica 7).

Prisotnost mikroorganizmov na mikroskopu za mikromanipulacijo (mikroskop ICSI) je imela pozitiven vpliv na razvoj zarodkov (preglednica 8). V primeru, da so bili mikroorganizmi prisotni, je delež blastocist znašal 38 %, v primeru njihove odsotnosti pa 30 % ($p < 0,05$). Test hi-kvadrat je to potrdil za skupino mlajših pacientk v postopkih ICSI (preglednica 7).

Mikroorganizmi, ki so bili osamljeni z odvzemnega mesta inkubator 4, so imeli negativen vpliv na razvoj zarodkov (preglednica 8). Delež blastocist je bil ob njihovi prisotnosti statistično značilno manjši, kot ob njihovi odsotnosti (33 % vs. 51 %, $p < 0,05$). Test hi-kvadrat je to potrdil za skupino mlajših pacientk v postopku ICSI (preglednica 7).

Prisotnost mikroorganizmov v zraku laminarija 2 je imela pozitiven vpliv na nosečnost (preglednica 8). Ko so mikroorganizmi bili prisotni, je bila stopnja nosečnosti statistično značilno višja od stopnje v primeru njihove odsotnosti (15 % vs. 6 %, $p < 0,05$). S testom hi-kvadrat se je statistično značilna povezava izkazala za skupino pacientk v postopkih IVF, ne glede na metodo zunajtelesne oploditve (preglednica 7).

Prav tako pozitiven vpliv na nosečnost (preglednica 8) je imela tudi prisotnost mikroorganizmov v operacijski dvorani, kjer je stopnja nosečnosti ob njihovi prisotnosti znašala 23 % v primerjavi s statistično značilno nižjimi 8 % ob njihovi odsotnosti ($p < 0,05$). Ta statistično značilna povezava drži, glede na test hi-kvadrat, za skupino mlajših žensk v postopkih IVF (preglednica 7).

Prisotnost mikroorganizmov v vodi iz inkubatorja 4 je imela pozitiven vpliv na razvoj zarodkov (preglednica 8). V primeru prisotnosti mikroorganizmov je bil delež blastocist statistično značilno manjši kot v primeru njihove odsotnosti (37 % vs. 30 %, $p < 0,05$). Test hi-kvadrat je to potrdil za skupino mlajših pacientk v postopkih ICSI (preglednica 7).

4.2 VPLIV PRISOTNOSTI POSAMEZNIH VRST MIKROORGANIZMOV NA IZID POSTOPKOV ZUNAJTELESNE OPLODITVE

Za izbrana odzemna mesta (med delovnimi površinami: laminarija 1 in 2, inkubatorja 1 in 4, mikroskop ter mikroskop ICSI; med osebjem: medicinska sestra ter oba biologa; zrak v operacijski dvorani in laminariju 2 ter voda iz inkubatorja 4) smo za izide, na katere se je pokazal statistično značilen vpliv prisotnosti mikroorganizmov, v programu SPSS izračunali korelacijo (Pearsonov in Spearmanov koeficient korelacije) vpliva posameznih mikroorganizmov nanje.

V preglednici 9 so zbrane le korelacije, ki so se pokazale za statistično značilne ($p < 0,05$).

Preglednica 9: Vpliv prisotnosti posameznih izolatov na določenem odvzemnem mestu na izbrane postopke zunajtelesne oploditve.

odvzemno mesto	vpliv na oploditev	vpliv na razvoj zarodkov	vpliv na nosečnost
OSEBJE			
medicinska sestra	- <i>Staphylococcus. epidermidis</i>	/	
biolog pri pripravi semena		/	- <i>S. epidermidis</i>
biolog ob oskrbi jajč.celic	+ α hemolitični streptokoki - <i>S. hominis</i>	+ <i>S.aureus</i>	/
DELOVNE POVRŠINE			
laminarij 1	+ <i>S. epidermidis</i>	/	/
laminarij 2	+ <i>S. epidermidis</i> + <i>S. hominis</i>	/	/
inkubator 1		/	/
mikroskop		+ <i>S. epidermidis</i> + <i>S. haemolyticus</i> + <i>S. capitis</i>	/
mikroskop ICSI	/	+ <i>S. haemolyticus</i>	/
inkubator 4	/	- <i>Penicillium sp.</i> + <i>Aspergillus sp.</i>	/
ZRAK			
laminarij 2	/	/	
operacijska dvorana	/	/	+ α hem.strep. + <i>S. hominis</i> + <i>Aspergillus sp.</i>
VODA IZ INKUBATORJA			
inkubator 4	/	+ <i>Aspergillus sp.</i>	/

Opomba: S + je označen pozitiven vpliv, z – negativen vpliv in s / statistično neznačilen vpliv pripisanega izolata.

Izmed izoliranih mikroorganizmov z rok medicinske sestre (preglednica 9) je imela bakterija *S. epidermidis* statistično značilen negativen vpliv na oploditev ($p < 0,05$). Ista vrsta, izolirana z rok biologa pri pripravi semena, je prav tako imela statistično značilen ($p < 0,05$) negativen vpliv na nosečnost. Bakterije, izolirane z rok biologa ob oskrbi jajčnih celic, so pokazale statistično značilen ($p < 0,05$) pozitiven vpliv. Bakterije iz skupine alfa hemolitičnih streptokokov so pozitivno vplivale na oploditev in bakterije vrste *S. aureus* so vplivale pozitivno na razvoj zarodkov. Edina bakterijska vrsta, izolirana z dlani celičnega biologa, ki je imela statistično značilen ($p < 0,05$) negativen vpliv na oploditev, je *S. hominis*.

S. epidermidis, izoliran s površine laminarijev 1 in 2, je imel statistično značilno ($p < 0,05$) pozitiven vpliv na razvoj zarodkov (preglednica 9). Prav tako je pozitiven vpliv na razvoj zarodkov imel tudi *S. hominis*, izoliran iz površine laminarija 2. Med izolati iz površine inkubatorja 1 ni bilo nobenega, za katerega bi se pokazal statistično značilen ($p < 0,05$) vpliv. Bakterijske vrste *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* in *S. capitis*, izolirane s površine mikroskopa, so pokazale statistično značilno ($p < 0,05$) pozitiven vpliv na razvoj zarodkov. Tudi vrsta *S. haemolyticus*, izolirana iz površine mikroskopa za mikromanipulacijo, je imela statistično značilno ($p < 0,05$) pozitiven vpliv na razvoj zarodkov. S površine v inkubatorju 4 sta se za statistično značilna ($p < 0,05$) pokazala negativen vpliv plesni *Penicillium sp.* in pozitiven vpliv plesni *Aspergillus sp.* na razvoj zarodkov.

Med izolati iz zraka laminarija 2 ni bilo nobenega, ki bi statistično značilno ($p < 0,05$) vplival na nosečnost (preglednica 9). Statistično značilno ($p < 0,05$) pozitiven vpliv na nosečnost pa so pokazali izolati iz zraka v operacijski dvorani (alfa hemolitični streptokoki, *S. hominis* in *Aspergillus sp.*).

Plesen *Aspergillus sp.* v vodi inkubatorja 4 je imela statistično značilno ($p < 0,05$) pozitiven vpliv na razvoj zarodkov (preglednica 9).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V tridesetih letih, od kar se je 25. julija leta 1978 rodil prvi otrok, spočet po metodi klasične zunajtelesne oploditve, je bilo zaradi te metode po svetu tako rojenih še okoli 4 milijone otrok (Nature, 2008), vendar stopnja zanositve na postopek še vedno večinoma ne presega 30 % (Virant-Klun in sod., 2002). Razlogov za to je več in med najpomembnejše prištevamo starost pacientk, izbiro uporabljenega protokola in metode ter infekcije in kontaminacije. (Coccia in sod., 2004)

Da bi določili natančen vpliv slednjih, so bile opravljene številne študije. Izkazalo se je, da je delež kontaminiranih gojišč, v katerih so bile gojene spolne celice in/ali zarodki, med 0,35 % (Cottell in sod., 1996) in 0,86 % (Kastrop in sod., 2007), kar glede na veliko število postopkov, ki se letno izvedejo po svetu, ne predstavlja zanemarljivega vpliva.

Med glavna vira kontaminacij se prištevajo mikroorganizmi, ki predstavljajo normalno floro ženskega genitalnega trakta in mikroorganizmi iz semena. Jajčne celice nosijo tveganje, da okužijo gojišče, ker lahko ob njihovem zbiranju z aspiracijsko iglo, predstavnike naravne flore iz nožnice prenesemo v folikularno tekočino, od koder se skupaj z jajčecem prenesejo najprej v gojišče za spiranje in nato v gojišče za zarodke. (Cottell in sod., 1996) Mikroorganizmi iz semenske tekočine po ocenah predstavljajo vir tretjine kontaminacij gojišč. (Kastrop in sod., 2007)

V gojišča, ki se uporabljajo v laboratorijih OBMP, sta dodana antibiotika penicilin in streptomycin, vendar se zaradi vse številčnejšega pojavljanja odpornosti, njuna učinkovitost zmanjšuje in se priporoča nadomestilo z drugimi antibiotiki, npr. z gentamicinom. (Kastrop

in sod., 2007) Poleg vedno ožjega spektra delovanja, se pri njuni uporabi pojavljajo tudi številni škodljivi stranski učinki, ki se lahko odražajo v znižani uspešnosti postopkov IVF. (Lemeire in sod., 2007)

Obstaja verjetnost, da se mikroorganizmi zaradi odpornosti proti dodanima antibiotikoma lahko prenesejo z jajčno celico v gojišča za zarodke. Prav tako se lahko prenesejo tudi mikroorganizmi iz semenske tekočine zaradi istega razloga, ali pa dejstva, da so bakterije sposobne pritrjevanja in potovanja s semenčicami (Toth in sod., 1981). S svojo prisotnostjo lahko torej tam vplivajo na izide postopkov zunajtelesne oploditve (delež oploditve, razvoj zarodkov, stopnja zanositve, ...).

Da bi ugotovili pomembnost vpliva še enega možnega vira mikrobnih kontaminacij, ki se v literaturi navaja zgolj kot možen, ni pa vključen v nobeno dosedanjo nam znano študijo, smo v tem diplomskem delu preučevali vpliv prisotnosti mikroorganizmov, ki so bili izolirani z delovnih površin, iz zraka, z rok osebja in iz vode v inkubatorjih, na oploditev, razvoj zarodkov in stopnjo zanositve. Vzorci brisov delovnih površin, rok osebja, vode iz inkubatorjev in sedimentacijske plošče so bili v skladu z zahtevami odvzeti vsaj dvakrat letno. Podatke o prisotnosti mikroorganizmov in opravljenih postopkih zunajtelesne oploditve (IVF in ICSI) med letoma 2001 in 2006 smo obdelovali v retrospektivni študiji.

Glede na dejstvo, da smo lahko razpolagali le z rezultati korakov, na katere sami nismo imeli vpliva (npr. vzorčenje po odvzemnih mestih), smo zaradi pomanjkanja nekaterih podatkov med delom izgubili verjetno pomemben vpogled v obstoje statistično značilnih povezav med prisotnostjo mikroorganizmov na določenih odvzemnih mestih in izide zunajtelesne oploditve. Zaradi neustreznega ali pa nezadostnega vzorčenja, smo tako morali rezultate interpretirati v precej bolj okleščinem obsegu, kot bi jih lahko. Tako je potrebno poudariti, da je bila ob vzorčenju zraka v prostorih na vsako odzemno mesto, ne glede na njegovo površino, zraku izpostavljena le po ena plošča z gojiščem. Za vzorčenje zraka je sicer veliko primernejša metoda presesavanja zraka, ki pa ji je ob zadostnem

število izpostavljenih plošč na prostor lahko primerljiva tudi metoda sedimentacijskih plošč. Drugi problem, ki je bil opazen v primeru vzorcev zraka, je ta, da v nekaterih prostorih, v trenutnih pogojih, ni mogoče vzdrževati sterilnega stanja. Naslednja stvar so brisi rok osebja, kjer se je bolj kot dejstvo, da so bili odvzeti zgolj z ene dlani, pokazal problem zaradi pomanjkanja negativne kontrole. Tako smo iz obravnave izgubili pomen mikroorganizmov na dlaneh zdravnika v operacijski dvorani.

Rezultati, do katerih smo prišli, so zaradi mnogih dejavnikov, v močno zmanjšanem obsegu, a smo svojemu začetnemu cilju z njimi vseeno zadostili.

Pokazali smo, da ima prisotnost ali odsotnost mikroorganizmov na večini mest statistično značilen vpliv le na skupino pacientk, mlajših od 38 let, in ne glede na metodo zunajtelesne oploditve (preglednica 7). To se sklada z dejstvom, da s staranjem pacientk pada kvaliteta jajčnih celic (Menezo, 2006) in da imajo jajčne celice starejših žensk več genetskih nepravilnosti kot jajčne celice mlajših žensk (Gianaroli in sod., 2003). S staranjem tako pada tudi možnost za uspešno oploditev; prisotnost mikroorganizmov ima na izide postopkov pri starejših pacientkah torej lahko le manjši vpliv. Prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov je pokazala statistično značilno povezavo z oploditvijo večkrat za skupino mlajših žensk v postopku IVF in prav tako statistično značilna povezava za isto skupino pacientk se je večkrat pokazala med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov in zanositvijo (preglednica 7). Statistično značilna povezava med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov in razvojem zarodkov se je pokazala za skupino mlajših pacientk v postopku ICSI (preglednica 7).

Določili smo tudi vpliv posameznih mikroorganizmov na posameznih mestih na specifični izid (preglednica 9). Statistično značilni vpliv so pokazali le nekateri od izoliranih mikroorganizmov na posameznih mestih; ponekod celo noben od prisotnih mikroorganizmov. To si razlagamo tako, da skupen vpliv na izid postopka zunajtelesne oploditve ni posledica delovanja le enega mikroorganizma, ampak soodvisnosti delovanja

celotne mikrobne združbe. Prav tako verjetno niso vsi mikroorganizmi, ki so jih zaznali z mikrobiološko analizo, prišli v stik z gojiščem, kjer bi lahko vplivali na oploditev in nadaljni razvoj zarodka.

Za statistično značilno negativen vpliv (preglednica 8) prisotnosti mikroorganizmov na dlaneh medicinske sestre na oploditev se je pokazala prisotnost bakterijske vrste *Staphylococcus epidermidis* (preglednica 9). Čeprav je ta bakterija del normalne kožne flore in hkrati del normalne flore v nožnici ter na kožo in sluznice nima patogenega vpliva, pa ima lahko na spolne celice škodljiv učinek. (Sun in sod., 1987). Mehanizem delovanja ni poznan. Enak vpliv iste bakterijske vrste, le da tokrat na nosečnost, se je pokazal tudi med ostalimi statistično neznačilnimi vplivi posameznih mikroorganizmov, izoliranih z dlani biologa ob pripravi semena. Negativen vpliv prisotnosti stafilokokov v nožnici pacientk v postopku zunajtelesne oploditve na zanositev so v svoji študiji opazili tudi Selman in sod. (Selman in sod., 2007)

Zanimivo je, da med mikroorganizmi z dlani biologa ob oskrbi jajčnih celic, ki skupno kažejo statistično značilno pozitiven vpliv na oploditev (preglednica 8), ta vpliv potrjujejo le bakterije iz skupine alfa hemolitičnih streptokokov, medtem ko istočasno bakterije, vrste *Staphylococcus. hominis*, izkazujejo statistično značilno negativen vpliv (preglednica 9). Bakterije, vrste *Staphylococcus aureus*, prav tako izolirane z dlani biologa ob oskrbi jajčnih celic, kažejo statistično značilno pozitiven vpliv na razvoj zarodkov, čeprav so to bakterijo redkeje izolirali iz naravne flore nožnice (Corbishley, 1977) in jo poznamo kot oportunističnega patogena. Med mikroorganizmi, izoliranimi iz laminarija 1 je statistično značilno pozitiven vpliv na oploditev pokazala vrsta *Staphylococcus epidermidis*. Laminarij 1 je namenjen oskrbi jajčnih celic in prisotnost bakterij na njegovi površini ter na dlaneh biologa, ki v tem laminariju oskrbi pridobljene gamete statistično značilno pozitivno vpliva na oploditev. Prav tako statistično značilno pozitiven vpliv na oploditev sta izkazali tudi bakterijski vrsti *Staphylococcus epidermidis* in *Staphylococcus hominis*, izolirani iz laminarija 2, kjer se pripravlja seme. Med bakterijami s površine mikroskopa za pripravo semena so statistično značilno pozitiven vpliv na razvoj zarodkov do stopnje blastocist

pokazale vrste *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* in *Staphylococcus capitis*. Vse tri vrste so predstavnice skupine koagulaza negativnih stafilokokov, ki so del normalne flore ženskega genitalnega trakta (Corbishley, 1977), kar najverjetneje pojasnjuje njihov pozitiven vpliv na razvoj zarodkov. Glede na to, da niti nožnica, niti semenska tekočina nista sterilni (Kastrop in sod., 2007), popolna sterilnost ob oploditvi torej ni naravna. Statistično značilno pozitiven vpliv na razvoj zarodkov ima tudi *Staphylococcus haemolyticus*, izoliran s površine mizice mikroskopa za mikromanipulacijo. Med mikroorganizmi s površine poličke znotraj inkubatorja 4, kjer se goji semenčice za zunajtelesno oploditev, na razvoj zarodkov statistično značilno negativno vpliva plesen *Penicillium sp.* in statistično značilno pozitivno vpliva plesen *Aspergillus sp.* Prav tako statistično značilno pozitiven vpliv na razvoj zarodkov je imela slednja, izolirana iz vode tega istega inkubatorja. Med mikroorganizmi, izoliranimi iz zraka v operacijski dvorani, so statistično značilno pozitiven vpliv na nosečnost pokazali alfa hemolitični streptokoki, bakterije, vrste *Staphylococcus hominis*, in plesni *Aspergillus sp.*

Ob združitvi podatkov lahko rečemo, da glede na rezultate v tem diplomskem delu, predstavniki skupine koagulaza negativnih streptokokov (KNS) na dlaneh osebja statistično značilno negativno vplivajo na oploditev in nosečnost (preglednica 9). Ravno nasproten vpliv imajo alfa hemolitični streptokoki in koagulaza pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus*.

Na vseh drugih odvzemnih mestih se je prisotnost bakterij iz skupine KNS pokazala kot dobrodošla za izide zunajtelesne oploditve (preglednica 9). V splošnem se je pokazalo, da je prisotnost mikroorganizmov na vseh do konca diplomskega dela obravnavanih odvzemnih mestih, z izjemo rok nekaterih osebja in nekaterih površin, dobrodošla.

Čeprav smo s statističnimi orodji pokazali, da imata bakteriji *Staphylococcus epidermidis* in *Staphylococcus hominis* enkrat pozitiven in drugič negativen vpliv na izid postopka zunajtelesne oploditve (preglednica 9), bi bilo za razlago le-tega potrebno hkrati z analizo

briso v opravi tudi mikrobiološko analizo gojišč za spolne celice in zarodke. Kot že omenjeno, ni nujno, da so vsi mikroorganizmi, izolirani iz odvzemnih mest, prišli v stik z gojišči, kjer bi neposredno vplivali na oploditev in nadaljni razvoj zarodkov.

Prisotnost plesni *Aspergillus sp.*, izolirane s površine in vode znotraj inkubatorja 4 ter iz zraka v operacijski dvorani (ki je najverjetneje vir plesni v inkubatorju), statistično značilno pozitivno vpliva na razvoj zarodkov do blastociste in na nosečnost (preglednica 9). Ti rezultati so v nasprotju s podatki o višji stopnji zanositve v odsotnosti plesni v inkubatorju, ki jo je objavil Svalander (Svalander, 1991). Da kontaminacija z glivami ne ogroža uspešnosti zunajtelesne oploditve, so v svojem članku objavili Ben-Chetrit in sod. (Ben-Chetrit in sod., 1996) Objavili so, da so se v vseh petih primerih prenosi zarodkov iz gojišč, ki so bila kontaminirana s kvasovkami, odražali v pozitivni nosečnosti. V primeru, da plesni v okolje ne sproščajo toksinov in jih ob prenosu zarodkov ne zanesemo v maternico, lahko le-te očitno podobno pripomorejo k razvoju zarodkov. Ravno nasproten učinek pa se je pokazal v primeru s površine znotraj inkubatorja 4 izolirane plesni *Penicillium sp.*, ki je pokazala statistično značilno negativen vpliv na razvoj zarodkov. Možna razlaga negativnega vpliva plesni *Penicillium sp.* je v najverjetnejšem izločanju toksinov. Škodljivi učinki toksinov so prevladali nad pozitivnim učinkom glive v gojišču; gliva naj bi porabljala kisik, s tem pa bi se manjšala koncentracija reaktivnih kisikovih zvrsti.

To diplomsko delo je prva študija s področja vpliva mikrobnih kontaminacij okolja izvajanja postopkov zunajtelesne oploditve na izid postopka zunajtelesne oploditve in predstavlja šele začetek raziskav na tem področju. Iz rezultatov, ki smo jih dobili, tako ne moremo potegniti še nobenih kliničnih zaključkov.

5.2 SKLEPI

- Od 271 odvzetih vzorcev je bilo 193 vzorcev pozitivnih (71,2 %) in 78 vzorcev negativnih (28,8 %).
- Med mikroorganizmi, izoliranimi z delovnih površin, iz zraka, brisov rok osebja in iz vode iz inkubatorjev, so bili tako prestavniki normalne flore (kože in ženskega genitalnega trakta) kot tudi drugi mikroorganizmi.
- Prisotnost mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin, iz zraka, brisov rok osebja in iz vode iz inkubatorjev, vpliva na izide postopkov zunajtelesne oploditve.
- Prisotnost mikroorganizmov na nekem odvzemnem mestu ne vpliva na vse tri opazovane izide (delež oplojenih celic, delež zarodkov, razvitih do stopnje blastociste, in stopnja zanositve) enako.
- Vplivom prisotnosti mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin, iz zraka, brisov rok osebja in iz vode iz inkubatorjev, so bolj izpostavljene pacientke, mlajše od 38 let.
- V klasičnem postopku zunajtelesne oploditve (IVF) sta na prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov bolj občutljiva procesa oploditve in zanositve, predvsem pri mlajših pacientkah (pod 38 let).
- V postopku ICSI je na prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov bolj občutljiv proces zanositve, predvsem pri mlajših pacientkah (pod 38 let).

- Prisotnost mikroorganizmov po posameznih odvzemnih mestih v polovici primerov deluje statistično značilno pozitivno na izide zunajtelesne oploditve in v drugi polovici primerov deluje statistično značilno negativno.
- Posamezni mikroorganizmi iste vrste, izolirani iz različnih odvzemnih mest, imajo na izide zunajtelesne oploditve lahko enak ali nasproten vpliv.
- Za statistično značilen pozitiven ali negativen vpliv prisotnosti mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin, iz zraka, brisov rok osebja in iz vode iz inkubatorjev ni vedno odgovorna samo ena vrsta (prevladujočih) mikroorganizmov, ampak večkrat delujejo v soodvisnosti.

6 POVZETEK

Niti nožnica, niti semenska tekočina nista sterilni (Kastrop in sod., 2007). Do kontaminacije jajčnih celic lahko pride ob ultrazvočni transvaginalni aspiraciji (Moore in sod., 2000), ki je kljub možnemu tveganju za prenos mikroorganizmov še vedno metoda izbire pridobivanja jajčnih celic v postopku klasične zunajtelesne oploditve, IVF (angl. *in vitro* fertilization) (Saltes in sod., 1995). Do okužbe jajčnih celic ali razvijajočih zarodkov lahko pride tudi kasneje, med samim laboratorijskim delom postopka IVF, ob stiku s kontaminirano semensko tekočino (Moore in sod., 2000). Znano je, da je večina (94,2%) semenskih tekočin v postopku zunajtelesne oploditve koloniziranih z mikroorganizmi (Krissi in sod., 2004) in čeprav se pred dodatkom v gojišče k jajčni celici semenčice ustrezno pripravi (npr. swim-up metoda) in sta v gojišče dodana penicilin in streptomycin, kar zmanjša število okuženih vzorcev v 95% primerov (Cottel in sod., 1997), še vedno zaznavamo kontaminacije gojišča z gametami in/ali zarodki, kar pa vpliva na uspešnost postopka zunajtelesne oploditve.

Izkazalo se je, da je delež kontaminiranih gojišč, v katerih so bile gojene spolne celice in/ali zarodki, med 0,35 % (Cottell in sod., 1996) in 0,86 % (Kastrop in sod., 2007), kar glede na veliko število postopkov, ki se letno izvedejo po svetu, ne predstavlja zanemarljivega vpliva.

V okviru te diplomske naloge smo proučevali pomembnost vpliva še enega možnega vira mikrobnih kontaminacij, ki se v literaturi navaja zgolj kot možen, ni pa vključen v nobeno dosedanjo nam znano študijo. Poleg že poznanih virov kontaminacij z mikroorganizmi, prenesenimi na aspiracijski igli skupaj z jajčno celico, in mikroorganizmi iz semenske tekočine smo tako v tem diplomskem delu preučevali vpliv prisotnosti mikroorganizmov, ki so bili izolirani z delovnih površin, iz zraka, z rok osebja in iz vode v inkubatorjih, na oploditev, razvoj zarodkov in stopnjo zanositve. Vzorci brisov, vode iz inkubatorjev in sedimentacijske plošče (zrak) so bili v skladu z zahtevami odvzeti vsaj dvakrat letno in

poslani na analizo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani. Podatke o prisotnosti mikroorganizmov in opravljenih ciklusih postopkov zunajtelesne oploditve (IVF in ICSI) med letoma 2001 in 2006 smo obdelovali v retrospektivni študiji s statističnimi testi hi-kvadrat in računanjem Pearsonovega in Spearmanovega koeficienta korelacije.

Rezultati, ki smo jih dobili, so pokazali, da prisotnost mikroorganizmov, izoliranih z delovnih površin, iz zraka, brisov rok osebja in iz vode iz inkubatorjev, vpliva na izide postopkov zunajtelesne oploditve. V največji meri obstaja statistično značilna povezava med vplivom prisotnosti mikroorganizmov, izoliranih iz obravnavanih odvzemnih mest in pacientkami v postopkih zunajtelesne oploditve, ki so mlajše od 38 let. Vpliv prisotnosti oz. odsotnosti mikroorganizmov na posamezne izide zunajtelesne oploditve je pozitiven v polovici primerov odvzemnih mest in negativen za drugo polovico. V klasičnem postopku zunajtelesne oploditve (IVF) sta na prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov bolj občutljiva procesa oploditve in zanositve, predvsem pri mlajših pacientkah (pod 38 let). V postopku ICSI pa je na prisotnost oz. odsotnost mikroorganizmov bolj občutljiva uspešnost zanositve.

Ob določanju statistično značilnih vplivov posameznih mikroorganizmov se je pokazalo, da posamezna vrsta nima vedno enakosmerne vpliva na izide postopkov zunajtelesne oploditve. Prav tako se je pokazalo, da za statistično značilen pozitiven ali negativen vpliv, ni vedno odgovorna samo ena vrsta (prevladujočih) mikroorganizmov, ampak večkrat delujejo v soodvisnosti.

7 VIRI

Ben-Chetrit A., Shen O., Haran E., Brooks B., Eldar G.T., Margalioth J.E. 1996. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. *Fertility and Sterility*, 66, 2: 335-337

Boone R.W., Johnson J.E., Locke A.J., Crane M.M., Price M.T. 1999. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertility and Sterility*, 71, 1: 150-154

Coccia M.E., Cammilli F., Ginocchioni L., Rizzello F. 2004. Role of infection in *in vitro* fertilization treatment. *Annals of the New York Academy of science*, 1034: 219-235

Cohen J., Gilligan A., Esposito W., Schimmel T., Dale B. 1997. Ambient air and its potential effects on conception. *Human Reproduction*, 12, 8: 1742-1749

Corbishley M.C. 1977. Microbial flora of the vagina and cervix. *Journal of Clinical Pathology*, 30, 8: 745-748

Cottel E., Lennon B., McMorro J., Barry-Kinsela C., Harrison R.F. 1997. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 67, 1: 98-103

Cottel E., McMorro J., Lennon B., Fawasy M., Cafferkey M., Harrison R.F. 1996. Microbial contamination in an *in vitro* fertilization-embryo transfer system. *Fertility and Sterility*, 66, 5: 776-80

Egbase P.E., Al-Sharhan M., Al-Othman S., Al-Mutawa M., Udo E.E., Grudzinskas J.G. 1996. Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction*, 11, 8: 1687-1689

Elder K., Baker D., Ribes J. 2005. Infections, infertility and assisted reproduction. Cambridge, UK: Cambridge University Press: 410 str.

Forman R., Rosso F.G., Fari A., Volante M., Frydman R., Testart J. 1987. Importance of semen preparation in avoidance of reduced *in vitro* fertilization results attributable to bacteria. *Fertility and Sterility*, 47, 3: 527-530

Gianaroli L., Magli M.C., Fiorentino F., Baldi M., Ferrareti A.P. 2003. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta*, 24, Suppl. B, S77-S83

Hall J., Gilligan A., Schimmel T., Cecchi M., Cohen J. 1998. The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Human Reproduction*, 13, 4: 146-155

Hewitt J., Cohen J., Fehilly C.B., Rowland G., Steptoe P., Webster J., Edwards R.G., Fishel S.B. 1985. Seminal bacterial pathogens and *in vitro* fertilization. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 2, 2: 105-107

Huyser C., Fourie FLeR., Oosthuizen M., Neethling A. 1991. Microbial flora in semen during *in vitro* fertilization. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 8, 5: 260-264

Kastrop P.M.M., de Graaf-Miltenburg L.A.M., Gutknecht D.R., Weima S.M. 2007. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Human Reproduction*, 22, 8: 2243-2248

Krissi H., Orvieto R., Ashkenazi J., Gilboa Y., Shalev J., Moscovitch I., Bar-Hava I. 2004. Effect of contaminated preprocessed semen on fertilization rate and embryo quality in assisted reproductive techniques. *Gynecological Endocrinology*, 18: 63-67

Lemeire K., van Merris V., Cortvrindt R. 2007. The antibiotic streptomycin assessed in a battery of *in vitro* tests for reproductive toxicology. *Toxicology in vitro*, 21, 7: 1348-1353

Masfari A.N., Duerden B.I., Kinghorn G.R. 1986. Quantitative studies of vaginal bacteria. *Genitourinary Medicine*, 62, 4: 256-263

Megory E., Zuckerman H., Shoham S.Z., Lunenfeld B. 1987. Infections and male fertility. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 42, 5: 283-290

Menezo Y.J. 2006. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. *Reproductive Medicine Online*, 12, 5: 616-621 (15. sept. 2008)

<http://www.ingentaconnect.com/content/repro/rebi/2006/00000012/00000005/art00014?to ken=005b1fda801a30a9fe28ac967232d45237b607a316a4d5749662876763568293c62207d673f582f6b9c45a0c344>

Moore D.E., Soules M.R., Klein N.A., Fujimoto V.Y., Agnew K.J., Eschenbach D.A., 2000. bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 74, 6: 1118-1124

Mortimer D. 2000. Sperm preparation methods. *Journal of Andrology*, 21, 3: 357-366

Murray R.P., Rosenthal S.K., Pfaller A.M. 2005. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier: 963 str.

Saltes B., Molo M.W., Binor Z., Radwanska E. 1995. Bacterial contamination after transvaginal aspiration (TVA) of oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12, 9: 657-658

Life after superbabe. 2008. *Nature*, 454, 7202; 253-253

Selman H., Mariani M., Barnocchi N., Mencacci A., Bistoni F., Arena S., Pizzasegale S., Brusco G.F., Angelini A. 2007. Examination of bacterial contamination at the time of embryo transfer, and its impact on the IVF/pregnancy outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24, 9: 395-399

Sher G., Davis M.V., Stoess J. 2005. *The in vitro* fertilization: the A.R.T. of making babies. 3rd ed. New York, Checkmark Books: 312 str.

Steyaert S.R., Leroux- Roels G.G., Dhont M. 2000. Infections in IVF: review and guidelines. *Human Reproduction*, 6, 5: 432-441

Stovall D.W., Bailey L.E., Talbert L.M. 1993. The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing *in vitro* fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 59, 1: 197-201

Sun L.S., Gastaldi C., Peterson E.M., de la Maza L.M., Stone S.C. 1987. Comparison of techniques for the selection of bacteria-free sperm preparation. *Fertility and Sterility*, 48, 4: 659-663

Svalander C.P. 1991. Myco-contamination of incubators used for human pre-embryo culture. *Fertility and Sterility*, 56, 6: 1207-1208

Toth A., O'Leary W.M., Ledger W. 1982. Evidence for microbial transfer by spermatozoa. *Obstetrics and Gynecology*, 59, 5: 556-559

Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T. 2002. Od nastanka gamet do rojstva. Radovljica, Didakta: 255 str.

Wong P.C., Balmaceda J.P., Blanco J.D., Gibbs R.S., Asch R.H. 1986. Sperm washing and swim-up technique using antibiotics removes microbes from human semen. *Fertility and Sterility*, 45, 1: 97-100

Zarutskie P.W., Dixon L.L., Hiller S.L. 1992. Identifying sources of bacterial endotoxin contamination in an *in vitro* fertilization (IVF) culture environment. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, 9, 1: 77-78

ZAHVALA

Tega diplomskega dela ne bi bilo brez moje zlate (so)mentorice doc.dr. Irme Virant Klun, ki me je vodila, mi stala ob strani in mi dala več kot bi mi kot študentki pri delanju diplomske naloge pripadalo. Poleg znanja ob izdelavi naloge sem se od nje naučila tudi »osnovnih pravil rokovanja« z vsemi ljudmi, potrebnimi pri takšni študiji. Iz vsega srca se ji najlepše zahvaljujem za čas, ki si ga je odtrgala od svojih obveznosti in nadčloveško potrpežljivost ter razumevanje ob številnih mojih nenapovedanih obiskih na kliniki. Ob nazivu znanstvenice leta, bi si zaslužila tudi naziv (so)mentorica leta.

Moja iskrena zahvala gre tudi moji uradni mentorici prof.dr. Ines Mandić Mulec, ki je brez težav sprejela mentorstvo, mi pomagala pri formalnostih in nikoli odklonila kakršne koli potrebne pomoči.

Posebna zahvala recenzentki prof. dr. Edi Vrtačnih Bokal za izjemno hitro recenzijo.

Hvala lepa tudi dekletom iz laboratorija za oploditev z biomedicinsko pomočjo na Ginekološki kliniki v Ljubljani, ki so bile vedno pripravljene pomagati. Hvala lepa za vso prijaznost. Še posebej hvala lepa gospe Lili Bačar Kermavner, ki mi je predstavila svoje delo, me s tem navdušila, me predstavila (potem bodoči (so))mentorici in sploh bila moja Lili. Lili, hvala za vsako besedo in vsak kakav!

Hvala lepa vsem, ki so kakorkoli drugače pomagali pri nastanku tega dela. Hvala sestri Smerajc in prof.dr. Nataši Švent Kučina ter gospe Klementi. Hvala tudi gospodu Ivanu, zaradi katerega bom za vedno obvladala računanje hi-kvadrat statistike in Pearsonovega ter Spearmanovega koeficienta korelacije. Hvala lepa Ivetu za pomoč, ko sem mu ob 23h tarnala, da ne znam pravilno številčiti strani. Hvala lepa Anji, ki mi je s svojim super sistemom skrajšala računanje statistike iz nekaj deset let na dostojno število dni.

Nenazadnje pa največja zahvala moji družini. Imam najboljšo družino na svetu in nikoli mi ni bilo potrebno misliti drugače. Hvala vsakemu posebej za to kar ste, kar ste mi dali in kar ste naredili iz mene!

Hvala lepa mojemu dragemu Petru, ki je z jeklenimi živci prenašal vse moje monologe in kreativni nered na kuhinjski mizi, mi pomagal kjer koli in kadar koli se je dalo ter bil moja največja opora.

Hvala lepa moji/najini pikici, ki je potrpežljivo prenašala vsa drvenja s kolesom, vse moje stresne hormone in neudobnost ob brezkončnem sedenju za računalnikom ter mi bila največja motivacija za čimprejšnje dokončanje naloge. Ti si res najboljše detece na svetu (pravzaprav v trebuhu)!

PRILOGE

Priloga A1: Statistično značilne povezave med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov na posameznih mestih na oploditev ($p < 0,05$) znotraj različnih skupin.

	oploditev								
	skupno	METODA		STAROST ŽENSKE		METODA, STAROST ŽENSKE			
		IVF	ICSI	< 38 let	≥ 38 let	< 38 let, IVF	≥ 38 let, IVF	< 38 let, ICSI	≥ 38 let, ICSI
DEL. POVRŠINA									
voziček			vpliva						
laminarij 1	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	
laminarij 2	vpliva		vpliva					vpliva	
inkubator 1	vpliva	vpliva		vpliva		vpliva			
inkubator 2									
inkubator 3									
inkubator 4					vpliva		vpliva		
mikroskop	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva		vpliva			
mikr. ICSI									
centrifuga			vpliva						
ZRAK									
oper. dvorana							vpliva		
laminarij 2		vpliva							
OSEBJE									
biolog (sperm.)		vpliva				vpliva			
med. sestra	vpliva	vpliva		vpliva		vpliva			
celični biolog	vpliva	vpliva			vpliva		vpliva		vpliva
VODA IZ INK.									
inkubator 2, aq			vpliva						
inkubator 3, aq			vpliva						
inkubator 4, aq				vpliva		vpliva			vpliva

Priloga A2: Statistično značilne povezave med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov na posameznih mestih na razvoj zarodkov ($p < 0,05$) do razvojne stopnje blastociste znotraj različnih skupin.

	zarodki								
	skupno	METODA		STAROST ŽENSKE		METODA, STAROST ŽENSKE			
		IVF	ICSI	< 38 let	≥ 38 let	< 38 let, IVF	≥ 38 let, IVF	< 38 let, ICSI	≥ 38 let, ICSI
DEL. POVRŠINA									
voziček									
laminarij 1								vpliva	
laminarij 2									
inkubator 1									
inkubator 2									
inkubator 3					vpliva				vpliva
inkubator 4	vpliva		vpliva	vpliva	vpliva			vpliva	
mikroskop	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva	vpliva
mikr. ICSI	vpliva		vpliva	vpliva				vpliva	
centrifuga									
ZRAK									
oper. dvorana			vpliva					vpliva	
laminarij 2	vpliva	vpliva		vpliva	vpliva	vpliva			vpliva
OSEBJE									
biolog (sperm.)	vpliva								
med. sestra									
celični biolog	vpliva		vpliva					vpliva	
VODA IZ INK.									
inkubator 2, aq	vpliva	vpliva		vpliva	vpliva				
inkubator 3, aq									
inkubator 4, aq	vpliva		vpliva					vpliva	

Priloga A3: Statistično značilne povezave med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov na posameznih mestih na nosečnost ($p < 0,05$) znotraj različnih skupin.

	nosečnost								
	skupno	METODA		STAROST ŽENSKE		METODA, STAROST ŽENSKE			
		IVF	ICSI	< 38 let	≥ 38 let	< 38 let, IVF	≥ 38 let, IVF	< 38 let, ICSI	≥ 38 let, ICSI
DEL. POVRŠINA									
voziček									
laminarij 1									
laminarij 2									
inkubator 1									
inkubator 2									
inkubator 3				vpliva					
inkubator 4									
mikroskop									
mikr. ICSI	vpliva			vpliva				vpliva	
centrifuga									
ZRAK									
oper. dvorana	vpliva	vpliva				vpliva			
laminarij 2									
OSEBJE									
biolog (sperm.)	vpliva			vpliva				vpliva	
med. sestra	vpliva			vpliva				vpliva	
celični biolog									
VODA IZ INK.									
inkubator 2, aq									
inkubator 3, aq		vpliva							
inkubator 4, aq	vpliva	vpliva		vpliva					

Priloga B1: Izračunane vrednosti deležev oplojenih jajčnih celic, zarodkov, razvitih do stopnje blastociste in stopenj nosečnosti za izbrana odvzemna mesta, glede na prisotnost mikroorganizmov.

POVRŠINE: LAMINARIJ 1	prisotnost MO	odsotnost MO	POVRŠINE: LAMINARIJ 2	prisotnost MO	odsotnost MO
povprečna starost ženske	34,2	34,4	povprečna starost ženske	33,96	36,13
število vseh postopkov	391	231	število vseh postopkov	248	263
število postopkov ICSI (%)	162 (41)	108 (47)	število postopkov ICSI	119 (48)	108 (41)
število pridobljenih celic	2957	1571	število pridobljenih celic	2007	1820
odstotek oplojenih celic*	57,3	51,2	odstotek oplojenih celic*	57,9	54,7
odstotek blastocist	45,4	45,9	odstotek blastocist	45,2	45,4
odstotek nosečnosti	23	22	odstotek nosečnosti	23,8	20,7

POVRŠINE: INKUB. 1	prisotnost MO	odsotnost MO	POVRŠINE: INKUB. 4	prisotnost MO	odsotnost MO
povprečna starost ženske	34,37	33,88	povprečna starost ženske	34,26	34,80
število vseh postopkov	381	69	število vseh postopkov	158	44
število postopkov ICSI	159 (42)	30 (43)	število postopkov ICSI	77 (49)	16 (36)
število pridobljenih celic	2653	487	število pridobljenih celic	1298	274
odstotek oplojenih celic*	52,8	59,3	odstotek oplojenih celic	57,8	53,6
odstotek blastocist	51,8	50,2	odstotek blastocist*	32,8	51
odstotek nosečnosti	21	18,8	odstotek nosečnosti	26,6	18,2

POVRŠINE: MIKROSKOP	prisotnost MO	odsotnost MO	POVRŠINE: MIKR. ICSI	prisotnost MO	odsotnost MO
povprečna starost ženske	34,34	34,27	povprečna starost ženske	34,64	34,14
število vseh postopkov	312	230	število vseh postopkov	61	110
število postopkov ICSI	119 (38)	115 (50)	število postopkov ICSI	29 (48)	52 (47)
število pridobljenih celic	2265	1695	število pridobljenih celic	489	893
odstotek oplojenih celic*	53,3	57,6	odstotek oplojenih celic	60,7	56,8
odstotek blastocist*	51,7	37,4	odstotek blastocist*	37,7	30,2
odstotek nosečnosti	22	24	odstotek nosečnosti	39,3	20,9

se nadaljuje

Nadaljevanje: Izračunane vrednosti deležev oplojenih jajčnih celic, zarodkov, razvitih do stopnje blastociste in stopenj nosečnosti za izbrana odvzemna mesta, glede na prisotnost mikroorganizmov.

ZRAK: OPERACIJSKA	prisotnost MO	odsotnost MO	ZRAK: LAMINARIJ 2	prisotnost MO	odsotnost MO
povprečna starost ženske	34,22	35,11	povprečna starost ženske	34,22	35,88
število vseh postopkov	565	56	število vseh postopkov	41	17
število postopkov ICSI	251 (44)	19 (34)	število postopkov ICSI	18 (44)	7 (41)
število pridobljenih celic	4204	318	število pridobljenih celic	302	83
odstotek oplojenih celic	55,3	52,8	odstotek oplojenih celic	59,3	59
odstotek blastocist	45,1	52	odstotek blastocist	54,2	22,4
odstotek nosečnosti*	22,6	8,9	odstotek nosečnosti*	14,6	5,9
OSEBJE: BIOLOG (sperm.)	prisotnost MO	odsotnost MO	OSEBJE: CEL. BIOLOG	prisotnost MO	odsotnost MO
povprečna starost ženske	33,87	34,40	povprečna starost ženske	34,29	33,94
število vseh postopkov	70	124	število vseh postopkov	468	49
število postopkov ICSI	39 (56)	56 (45)	število postopkov ICSI	207 (44)	28 (57)
število pridobljenih celic	634	944	število pridobljenih celic	3435	395
odstotek oplojenih celic*	56,8	58,4	odstotek oplojenih celic*	56	49
odstotek blastocist	29	37	odstotek blastocist*	45	54
odstotek nosečnosti*	18,6	33	odstotek nosečnosti	23,6	18
OSEBJE: MED. SESTRA	prisotnost MO	odsotnost MO	VODA: INKUBATOR 4	prisotnost MO	odsotnost MO
povprečna starost ženske	34,02	34,68	povprečna starost ženske	34,70	34,01
število vseh postopkov	161	101	število vseh postopkov	76	95
število postopkov ICSI	74 (29)	43 (43)	število postopkov ICSI	34 (45)	47 (49)
število pridobljenih celic	1357	774	število pridobljenih celic	582	800
odstotek oplojenih celic*	54	61,7	odstotek oplojenih celic	61	56
odstotek blastocist	40	42	odstotek blastocist*	37	29,6
odstotek nosečnosti*	21	34	odstotek nosečnosti	38	19

Opomba: Z zvezdico (*) so označeni izidi zunajtelesne oploditve, za katere smo dokazali statistično značilno povezavo med prisotnostjo oz. odsotnostjo mikroorganizmov in izidom ($p < 0,05$). Zaradi potrebe po primerljivosti lastnosti skupin ciklusov ob prisotnosti mikroorganizmov in ob njihovi odsotnosti, so dodani še podatki o povprečni starosti pacientk, številu postopkov, številu in odstotku postopkov ICSI in številu pridobljenih jajčnih celic.

Priloga B2: Seznam osamljenih mikroorganizmov z odvzemnih mest, ki so zadostila kriterijem za nadaljno obravnavo.

med. sestra	biolog (sperm.)	celični biolog	lam. 1 (površ.)	lam. 2 (površ.)	ink. 1 (površ.)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
α hemolitični streptokoki		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Staphylococcus hominis</i>		α hemolitični streptokoki	α hemolitični streptokoki	α hemolitični streptokoki	<i>Staphylococcus warneri</i>
KNS		<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Bacillus cereus</i>		<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	KNS	KNS
		<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>S. cohnii</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Bacillus spp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>		<i>Penicillium sp.</i>
		<i>S. aureus</i>			<i>Pseudoallescheria sp.</i>
					plesni

mikroskop	mikr. ICSI	ink.4 (površ.)	lam. 2 (zrak)	op. dvor. (zrak)	ink. 4 (aq)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
α hemolitični streptokoki		KNS		α hemolitični streptokoki	<i>Bulkolderia cepacia</i>
<i>Staphylococcus hominis</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>Staphylococcus hominis</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>		<i>Aspergillus sp.</i>		<i>Staphylococcus warneri</i>	

se nadaljuje

Nadaljevanje: Seznam osamljenih mikroorganizmov z odvzemnih mest, ki so zadostila kriterijem za nadaljno obdelavo.

mikroskop	mikr. ICSI	ink.4 (površ.)	lam. 2 (zrak)	op. dvor. (zrak)	ink. 4 (aq)
<i>Staphylococcus capitis</i>				<i>Staphylococcus capitis</i>	
				<i>Staphylococcus aureus</i>	
				<i>Penicillium sp.</i>	
				<i>Aspergillus sp.</i>	
				<i>Aspergillus flavus</i>	
				<i>Aspergillus fumigatus</i>	
				<i>Cladosporium sp.</i>	
				<i>Alternaria sp.</i>	
				<i>Aurebasidium pullulans</i>	
				neznano	
			<i>Micrococcus luteus</i>		

Opomba: Predstavniki naravne flore ženskega genitalnega trakta so od ostalih mikroorganizmov ločeni s pikčasto črto.