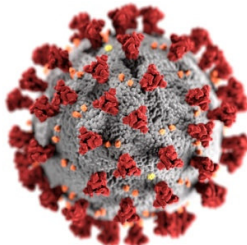




27.04.2020.

**Prva virtualna sjednica Hrvatskog društva kliničkih embriologa**  
- virusna pandemije COVID – 19 –



Sadržaj:

Tema:	Predavač:
1. Testovi za otkrivanje COVID-19	Ana Smolčić i Andrea Ćukušić Kalajžić
2. Čišćenje laboratorija: sredstva, UV lampe	Sonja Šogorić
3. Optimalna organizacija laboratorija: timovi i kretanje kliničkih embriologa	Marijana Baričević i Katarina Matković
4. Ejakulat, tkivo testisa i COVID-19: način obrade uzoraka	Mia Čerina i Sanja Zovkić
5. Folikularna tekućina, oocite i COVID-19	Marija Dundović
6. Metode oplodnje, kultivacija embrija i COVID-19: postupanje s oocitama i embrijima	Tamara Tramišak Milaković i Kristina Čavlović
7. Krioprezervacija i COVID-19	Davor Štimac
8. Postupnik s COVID-19 pozitivnim pacijentom	Nina Gelo
Moderatori ZOOM sjednice:	Sanja Vujisić, Patrik Stanić i Dejan Ljiljak
Termin:	27.04.2020. u 15. h

**Hrvatsko društvo kliničkih embriologa**

Predsjednik: dr.sc. Patrik Stanić, Potpredsjednik: dr.sc. Daria Hafner, Tajnik: mr.sc. Dejan Ljiljak  
Matični broj: 2647583 :: OIB: 88755446642 :: IBAN HR7023600001102173250 SWIFT ZABA HR2X  
E-mail: [info@hdke.hr](mailto:info@hdke.hr), Web: [www.hdke.hr](http://www.hdke.hr)

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porodništvo (za HDKE), KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska c. 29, 10000 Zagreb



## DIJAGNOSTIKA COVID-19 INFEKCIJE

### MOLEKULARNA

- Izolacija virusne RNA iz nazofaringealnog i/ili orofaringealnog brisa, amplifikacija RT-qPCR-om 4(2) virusna gena (nalaz pozitivan)
- Detektira prisutstvo virusa, koristi se u početnoj fazi infekcije
- Dugotrajna i skupa metoda
- Velik postotak lažno negativnih testova (loša kvaliteta uzorka, uzimanje uzorka prerano ili prekasno u tijeku bolesti, neadekvatna pohrana i transport uzorka, kvaliteta reagensa)
- Zlatni standard u dokazivanju COVID-19 infekcije

### SEROLOŠKA

- Detekcija IgG i IgM antitijela iz pune krvi
- Brza i jeftina metoda
- Detektira antitijela na virus koja se javljaju u kasnijoj fazi bolesti, a ne i prisutstvo virusa
- Nije moguće otkriti je li osoba zaražena pa će bolest tek nastupiti, je li preboljela bolest pa ima imunitet, niti je li rizična za okolinu
- Pojava lažno pozitivnih rezultata (niska specifičnost)



### Dezinfekcija i dezinficijensi

Kako bismo zaštitili pacijente, njihove spolne stanice i zametke i embriologe koji s njima rukuju, bitno je sljediti osnovne korake dezinfekcije i zaštite prije ulaska u laboratorij, u laboratoriju i nakon završetka rada, po izlasku iz laboratorija.

1. Pranje ruku prije oblačenja zaštitne opreme.
2. Dezinfekcija radnih površina prije rada.
3. Dezinfekcija radnih površina između svakog pacijenta.
4. Nakon radnog dana dezinfekcija radnih površina i radnih inkubatora .
5. Dezinfekcija svih predmeta koji se unose i iznose iz laboratorija.
6. Svi papiri koji su potrebni u laboratoriju, a u njega se unose i iznose iz njega trebaju biti u plastičnim košuljicama koje je lako dezinficirati.
7. Dezinfekcija bočica pristiglih medija (prije prvog stavljanja u hladnjak i nakon svake pripreme medija) i pakiranja potrošnih materijala prije unosa u laboratorij.
8. Redovita dezinfekcija inkubatora, kryo kantica, pinceta, pipetora, markera.

Dezinficijensi s dokazanom aktivnosti protiv virusa sa staničnom stjenkom trebaju se koristiti točno prema uputstvima upotrebe: kontaktno vrijeme, razrjeđenje i rok trajanja koncentrata i razrjeđenih otopina.

Usporedba genetičkih karakteristika SARS-CoV-2 i MERS-CoV sugerira da je SARS-CoV-2 podložan djelovanju dezinficijensa koji su dokazano aktivni protiv drugih virusa sa staničnom stijenkom (enveloped viruses).

Djelotvorni dezinficijensi su oni koji imaju neku od nabrojanih aktivnih tvari:

- natrij hipoklorit
- izbjeljivač 0,1%-1%
- etanol 62-71%
- hidrogen peroksid
- fenolni spojevi
- 5% klorirana sredstva
- kvarterni amonijevi spojevi (quarternary ammonium compounds) – OOSAFE

### DEZIFICIJENSI

Moguća je dezinfekcija zraka i prostora ultraljubičastom svjetlosti (UV-C spektar, oko 250 nm). Ultraljubičasto zračenje inaktivira nukleinsku kiselinu virusa (u ovom slučaju ssRNA koja je od svih oblika nukleinskih kiselina najpodložnija UV zračenju).

### Hrvatsko društvo kliničkih embriologa

Predsjednik: dr.sc. Patrik Stanić, Potpredsjednik: dr.sc. Daria Hafner, Tajnik: mr.sc. Dejan Ljiljak  
Matični broj: 2647583 :: OIB: 88755446642 :: IBAN HR7023600001102173250 SWIFT ZABA HR2X  
E-mail: [info@hdke.hr](mailto:info@hdke.hr), Web: [www.hdke.hr](http://www.hdke.hr)

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porodništvo (za HDKE), KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska c. 29, 10000 Zagreb



Potrebna energija za inaktivaciju virusne ssRNA je 1,32-3,20 mJ/cm<sup>2</sup> te je potrebna energija manja što je u prostoriji manja vlažnost zraka.

Ako se centar odluči za UV dezinfekciju prostora i zraka treba voditi računa o prethodnoj kemijskog dezinfekciji površina kao i o potrebnim mjerama opreza i dodatne edukacije zaposlenika.

Korištena literatura:

- WHO (2020) Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). Interim guidance
- Cun-Chieh Tseng and Chin-Shan Li (2007) Inactivation of viruses on surfaces by ultraviolet germicidal irradiation. Journal of occupational and environmental hygiene 4:400-405
- Lucia de Santis et al (2020) Covid-19: the perspective of Italian embryologist managing the IVF laboratory in pandemic emergency. Human reproduction
- Oosafe IVF laboratory use disinfectant, instruction of use
- <https://www.fertsterdialog.com/rooms/871-covid-19>

**Hrvatsko društvo kliničkih embriologa**

Predsjednik: dr.sc. Patrik Stanić, Potpredsjednik: dr.sc. Daria Hafner, Tajnik: mr.sc. Dejan Ljiljak  
Matični broj: 2647583 :: OIB: 88755446642 :: IBAN HR7023600001102173250 SWIFT ZABA HR2X  
E-mail: [info@hdke.hr](mailto:info@hdke.hr), Web: [www.hdke.hr](http://www.hdke.hr)

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porodništvo (za HDKE), KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska c. 29, 10000 Zagreb



3. Optimalna organizacija laboratorija: timovi i kretanje kliničkih embriologa	Marijana Baričević i Katarina Matković
--	--

Dva tjedna prije početka rada IVF-laboratorija potrebno je provesti trijažu svih djelatnika (Slika 1, Trijaža djelatnika) putem IVF-trijažnog upitnika (Prilog 1), a isti popunjavaju i pacijenti prilikom naručivanja putem telefona ili elektroničke pošte

Djelatnici IVF-laboratorija podijeljeni su u mini-timove (1 embriolog + 1 tehničar/2 tehničara u slučaju većeg opsega posla u androloškom dijelu laboratorija npr. kriopohrana sjemena) uz maksimalno poštivanje epidemiološki propisanog socijalnog distanciranja

Mini-timovi IVF-laboratorija se izmjenjuju svaka dva tjedna ili jutarnja i popodnevna smjena između koje je jedan sat razmaka. Prilikom rada obavezno se koristi sva propisana zaštitna odjeća (kirurške maske, jednokratne rukavice, jednokratni ogrtači). Obavezno čišćenje laboratorija između dvije smjene.

Pacijentima je omogućeno informiranje tijekom MPO-postupka putem telefona te elektroničkom poštom od strane djelatnika, kako bi se smanjio dolazak pacijenata i njihove pratnje te mogući kontakt s djelatnicima IVF-laboratorija sveo na minimum

Svi pacijenti moraju se prije dolaska naručiti kako bi se onemogućilo stvaranje gužve u čekaonicama te dolaziti u za njih predviđenom terminu, bez pratnje, ukoliko ista nije potrebna za naručenu pretragu

Osigurati uvjete socijalnog distanciranja između pacijenata i djelatnika mini-timova te propisanu dezinfekciju ruku naručenih pacijenata uz poštivanje svih epidemioloških preporuka

Ograničiti broj djelatnika u IVF-sali za transfer (embriolog, ginekolog, med.sestra, pacijentica)

### **OPTIMALNA ORGANIZACIJA RADA IVF-LABORATORIJA TIJEKOM IZRADE SPERMIOGRAMA PACIJENATA KOJI NISU U MPO-POSTUPKU (vanjski pacijenti)**

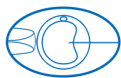
IVF laboratoriji koji u svom androloškom dijelu rade i spermiograme za vanjske pacijente uzorke za izradu istih primaju i obrađuju isključivo nakon primanja i obrade uzoraka sjemena MPO-pacijenata.

Vanjski pacijenti se MORAJU prethodno naručiti (telefonski ili elektroničkom poštom) i ispuniti IVF-trijažni upitnik (Prilog 1), kako bi se osigurao obavezan vremenski razmak između primanja pacijenata s epidemiološki povoljnim nalazom IVF-trijažnog upitnika

#### **Hrvatsko društvo kliničkih embriologa**

Predsjednik: dr.sc. Patrik Stanić, Potpredsjednik: dr.sc. Daria Hafner, Tajnik: mr.sc. Dejan Ljiljak  
Matični broj: 2647583 :: OIB: 88755446642 :: IBAN HR7023600001102173250 SWIFT ZABA HR2X  
E-mail: [info@hdke.hr](mailto:info@hdke.hr), Web: [www.hdke.hr](http://www.hdke.hr)

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porodništvo (za HDKE), KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska c. 29, 10000 Zagreb

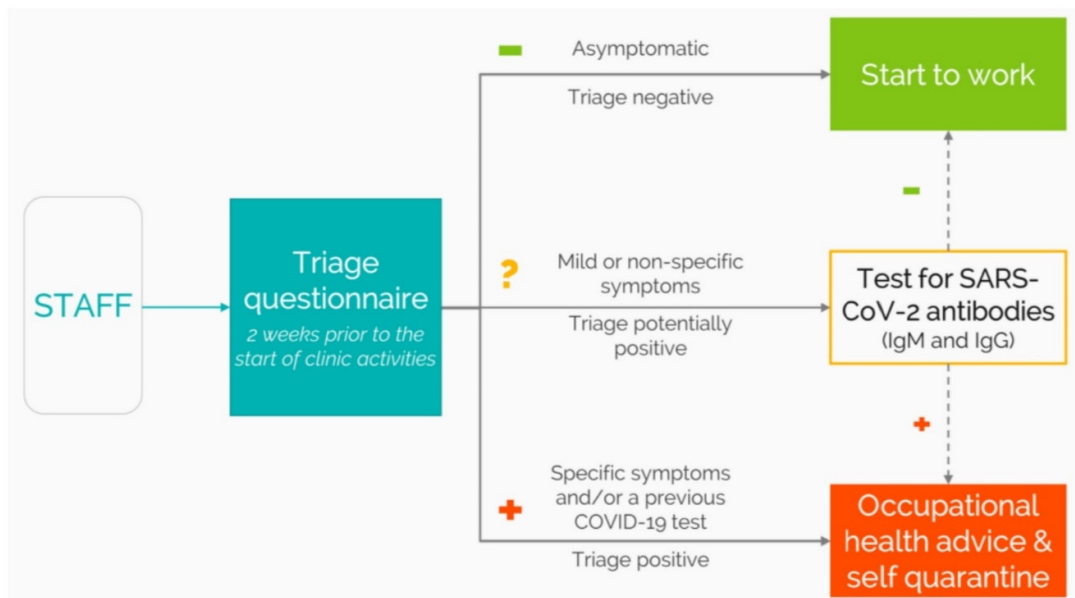


Razmak između 2 pacijenta je 1h (uz preporuku donošenja uzorka od kuće unutar 1-2h) unutar kojeg je potrebno provesti i dezinfekciju laboratorijskih površina prema propisanim preporukama (npr. od strane jedinice za nadzor bolničkih infekcija)

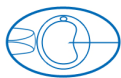
Pacijent uzorak, uz osobni dokument identifikacije, predaje tehničaru/embriologu potom popunjava GDPR-obrazac u čekaonici, a tehničari/embriolozi ostale podatke, prema propisanim SOP-ovima, u laboratoriju

Sljedeći pacijent dolazi prema vremenu naručivanja, uz uvjet da je prethodni napustio prostor čekaonice

Zamrzavanje sjemena onkoloških pacijenata ima isti postupak naručivanja, ali prilikom dolaska i predaje uzorka moraju osim negativnih nalaza na HIV, hepatitis i sifilis imati i negativan nalaz RT-PCR testa na COVID-19 napravljen minimalno 2 dana prije dolaska



Slika 1. Trijaža djelatnika (ESHRE guidance on recommending ART treatments, Document prepared by the ESHRE COVID-19 Working Group Published on the ESHRE website, Date of publication: 23/04/2020)



Prilog 1. IVF-trijažni upitnik:

1. Jeste li bili bolesni unazad 2 tjedna?
2. Imate li povišenu temperaturu (iznad 37,5 °C)
3. Kašljete li?
4. Osjećate li bol/peckanje u grlu?
5. Jeste li izgubili osjet mirisa i/ili okusa?
6. Jeste li bili u kontaktu s ikim tko ima bilo koji od gore navedenih simptoma?
7. Jeste li putovali u područja s visokim rizikom od infekcije COVID-19 virusom?
8. Jeste li zaposleni u nekoj zdravstvenoj ustanovi ili u domu za brigu o starima i nemoćnima?
9. Jeste li bili u kontaktu s osobom kojoj je potvrđena infekcija COVID-19 virusom?
10. Je li vama dijagnosticirana infekcija COVID-19 virusom?
11. Živate li u zajedničkom kućanstvu s osobom kojoj je dijagnosticirana infekcija COVID-19 virusom ili ima neke od simptoma infekcije COVID-19 virusa (temperatura, kašalj, gubitak osjeta mirisa i okusa)?
12. Ukoliko ste preboljeli infekciju COVID-19 virusom posjedujete li medicinsku potvrdu kojom dokazujete da ste zdravi?
13. Bolujete li od neke kronične bolesti kao što su: dijabetes, bolesti dišnog sustava, kronična bubrežna bolest, itd.?



4. Ejakulat, tkivo testisa i COVID-19: način obrade uzoraka	Mia Čerina i Sanja Zovkić
---	---------------------------

#### Prisutnost virusa u ejakulatu i tkivu testisa

Obzirom da SARS-CoV-2 ne uzrokuje samo respiratorne infekcije karakteristične za porodicu koronavirusa i ponajviše radi njegove strukturne sličnosti s prethodnim virusom SARS-CoV-1, javljaju se i opravdane sumnje da bi infekcija mogla zahvatiti i muški reproduktivni sustav.

SARS-CoV-1 se povezuje s oštećenjem spermatogeneze i upalom testisa, no nije do kraja razjašnjeno je li to posljedica direktne virusne infekcije ili imunološkog odgovora. Istraživanja su pokazala da se SARS-CoV-2, kao i njegov prethodnik, veže za receptor ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) koji je važan za ulazak virusa u stanicu. Objavljeno je nekoliko istraživanja ekspresije ACE2 u tkivu testisa. Fan i sur.(2020) pretraživanjem online baza podataka o ekspresiji RNA i proteina otkrivaju jaku ekspresiju ACE2 u tkivu testisa. Izraženu ekspresiju na razini mRNA potvrđuju i Wang i sur. (2020) i to u spermatogonijama i grupaciji Sertolijevih i Leydigovih stanica. Jako mala razina ekspresije utvrđena je u stanicama spermatogeneze od spermatocita do spermatida i u drugim somatskim stanicama. U navedenom istraživanju analizirana je i ekspresija enzima TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2) koji omogućuje aktivaciju S proteina na ovojnici SARS-CoV-2. Uočena je jača ekspresija u spermatogonijama i spermatidama. Dodatnim istraživanjima ACE2 pozitivnih spermatogonija pokazano je da postoji ekspresija većeg broja gena koji se povezuju s virusnom replikacijom i transmisijom, a manja gena vezanih za spermatogenezu u usporedbi sa ACE2 negativnim spermatogonijama. Navedena istraživanja pokazuju da teoretski postoji mogućnost vezanja i replikacije virusa u tkivu testisa što bi posljedično moglo uzrokovati oštećenja tkiva, smanjenje funkcije testisa i potencijalno prijenos virusa spolnim putem. Važno je napomenuti i da je u postupku objave studija s bitno drugačijim rezultatima od prethodno navedenih, a prema kojima je ekspresija ACE2 i TMPRSS2 u stanicama tkiva testisa jako mala, njihova ko-ekspresija jako rijetka te prema tome vezanje virusa i infekcija testisa malo vjerojatna. U prilog tome, testiranjem uzorka tkiva testisa pacijenta preminulog od posljedica infekcije SARS-CoV-2 nije potvrđena prisutnost virusa.

Prisutnost SARS-CoV-2 je potvrđena u uzorcima fecesa i u jako malom broju slučajeva i u krvi i urinu. Do sada objavljena istraživanja nisu dokazala njegovu prisutnost u ejakulatu, a testirano je ukupno 47 uzoraka pacijenata koji su uglavnom razvili blage do srednje teške simptome. U trenutku testiranja, 12 pacijenata bilo je u fazi oporavka (11 pacijenata s negativnim, 1 pacijent s još uvijek pozitivnim brisom), 34 pacijenta u prosjeku mjesec dana od pozitivnog brisa, 1 pacijent 8. dan nakon pozitivnog brisa.

#### Hrvatsko društvo kliničkih embriologa

Predsjednik: dr.sc. Patrik Stanić, Potpredsjednik: dr.sc. Daria Hafner, Tajnik: mr.sc. Dejan Ljiljak  
Matični broj: 2647583 :: OIB: 88755446642 :: IBAN HR7023600001102173250 SWIFT ZABA HR2X  
E-mail: [info@hdke.hr](mailto:info@hdke.hr), Web: [www.hdke.hr](http://www.hdke.hr)

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porodništvo (za HDKE), KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska c. 29, 10000 Zagreb





Do sada je proveden mali broj istraživanja na malom broju pacijenata. Istraživanja nisu obuhvatila pacijente u ranoj fazi infekcije kao ni pacijente s težim simptomima. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi razjasnila utjecaj virusa SARS-CoV-2 na muški reproduktivni sustav, a do tada se preporučuje pojačan oprez u rukovanju s uzorcima ejakulata i tkiva testisa.

### **Način obrade uzoraka**

Preporučuje se da pacijenti uzorke ejakulata donose od kuće unutar sat vremena od ejakulacije kako bi se skratilo vrijeme njihovog zadržavanja u MPO ustanovi. Ako pacijenti nisu u mogućnosti dati uzorak kod kuće ili donijeti unutar sat vremena, uzorak mogu dati u prostoriji za davanje uzoraka koja se nakon svakog pacijenta temeljito dezinficira. Potrebno je osigurati vremenski razmak između dolazaka pacijenata u ustanovu.

Sjeme koje će se koristiti za postupke medicinski pomognute oplodnje potrebno je obraditi na gradijentu gustoće uz dodatno isplivavanje. Dodatak medija za naslojavanje na dobiveni talog iz gradijenta predstavlja dodatan korak u pročišćavanju uzorka. Dokazano je da se ovakvim načinom obrade sjemena kod HIV pozitivnih pacijenata uklanja >99% virusnih čestica iz uzorka. U slučaju kad je u uzorku prisutan manji broj spermija zbog čega nije prikladan za pročišćavanje na gradijentu gustoće (teži oblik oligoasthenozoospermije, tkivo testisa), uzorke je moguće obraditi metodom ispiranja u mediju za obradu sjemena (eng. simple wash).

U literaturi nema zabilježenih slučajeva prijenosa virusa nakon korištenja obrađenog sjemena u MPO postupcima.

### **LITERATURA**

Xu J, Qi L, Chi X, Yang J, Wei X, Gong E *et al.* Orchitis: a complication of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Biology of reproduction* 2006;74:410-6.

Fan C, Li K, Ding Y, Lu W L. & Wang J. ACE2 Expression in Kidney and Testis May Cause Kidney and Testis Damage After 2019-nCoV Infection. *MedRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.20022418>

Wang Z, Xu X. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of ACE2 Receptor, a Target for SARS-CoV-2 Infection, in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. Available at: <https://www.preprints.org/manuscript/202002.0299/v1>

Pan F, Xiao X, Guo J, Song Y, Li H, Patel DP, Spivak AM, Alukal J,P, Zhang X, Xiong C, Li PS, Hotaling JM, No evidence of SARS-CoV-2 in semen of males recovering from COVID-19, *Fertility and Sterility* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.024>

Ci Song, Yan Wang, Weiqin Li, Yun Liu *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus in semen and testicular biopsy specimen of COVID-19 patients. *medRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.31.20042333>

### **Hrvatsko društvo kliničkih embriologa**

9

Predsjednik: dr.sc. Patrik Stanić, Potpredsjednik: dr.sc. Daria Hafner, Tajnik: mr.sc. Dejan Ljiljak  
Matični broj: 2647583 :: OIB: 88755446642 :: IBAN HR7023600001102173250 SWIFT ZABA HR2X  
E-mail: [info@hdke.hr](mailto:info@hdke.hr), Web: [www.hdke.hr](http://www.hdke.hr)

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porodništvo (za HDKE), KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska c. 29, 10000 Zagreb



- Paoli D, Pallotti F, Colangelo S, Basilico F, Mazzuti L, Turriziani O, Antonelli G, Lenzi A, Lombardo F. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab. *J Endocrinol Invest*. 2020 Apr 23. doi: 10.1007/s40618-020-01261-1
- Recommendations for reducing the risk of viral transmission during fertility treatment with the use of autologous gametes: a committee opinion. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril*. 2013;99(2):340-346.
- Jindal SK, Rawlins RG, Muller CH, Drobnis EZ. Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online*. 2016 Aug;33(2):121-30.
- Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. The effectiveness of modified sperm washes in severely oligoasthenozoospermic men infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5):1544-6.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization, 2010.



5. Folikularna tekućina, oocite i COVID-19: način pristupa	Marija Dundović
--	-----------------

Pretraživanjem literature utvrđena su rijetka istraživanja koja se bave tematikom iz koje je moguće deducirati zaključke relevantne za utjecaj pandemije Covid-19 na sigurnost djelatnika prilikom izvođenja izolacije jajnih stanica iz folikularnog aspirata te na koji način postupati s dobivenim jajnim stanicama. Prisutni su mnogi faktori unutar istraživanja, kao što su npr. premali broj uzoraka i pacijenata od kojih su pribavljeni uzorci, uzimanje uzoraka nakon što pacijenti više nisu bili zarazni, uzimanje uzoraka pacijenata čija dobna skupina nije relevantna za problematiku, a koji mogu utjecati na upotrebu rezultata provedenog istraživanja vezano za sigurnost izolacije oocita. Važno je napomenuti da se nigdje u literaturi ne spominje prisutnost Cov-2 u folikularnom aspiratu, odnosno nije provedeno istraživanje na tu temu.

Obzirom na nepostojanje direktnog dokaza za prisutnost virusnih čestica u folikularnom aspiratu, provedena je analiza dostupne literature s posebnom pažnjom na puteve ulaska virusnih čestica u stanice te jesu li takvi receptori eksprimirani na tkivima ženskog reproduktivnog sustava.

Provedena je analiza deset uzoraka vaginalnih briseva kod postmenopauzalnih pacijentica koje su preboljele Covid-19 i svi nalazi su bili negativni te se pretpostavlja da prolazak transvaginalne sonde kroz rodnicu prilikom punkcije jajnika ne bi trebao predstavljati povećani rizik za kontaminaciju aspirata.

Istraživanja su utvrdila da su za uvođenje virusnih čestica u stanice važni ACE 2 (angiotensin-converting enzyme 2) receptor koji će olakšati ulaz virusa i TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) enzim čije će djelovanje omogućiti aktiviranje S proteina na ovojnici virusa. Prema tome, važno je bilo ustanoviti postoje li takvi receptori na tkivima ženskog reproduktivnog sustava. Utvrđeno je da ektocerviks, endometrij i tkivo jajnika eksprimiraju receptor za Cov-2 (ACE 2). Također, ACE2 ekspresija je potvrđena u cijeloj folikulogenezi na jajniku, od primordijalnih pa sve do antralnih folikula te je potaknuta stimulacijom gonadotropinima, a ACE2 je indirektno povezan sa sazrijevanjem jajnih stanica unutar folikula. TMPRSS2 je nešto manje izražen i ne igra veliku ulogu u ženskom reproduktivnom sustavu, za razliku od muškog gdje je važan faktor u nastanku karcinoma prostate. Unatoč postojanju receptora, nije potvrđena prisutnost čestica Cov-2 u ženskom reproduktivnom sustavu.

Obzirom na sličnost u strukturi dva virusa rađene su usporedbe SARS Cov-1 i SARS Cov-2. U istraživanju su uzorkovali reproduktivne organe žena (jajnici, jajovodi, maternica) koje su podlegle SARS Cov-1 bolesti te nisu pronađeni tragovi virusa u reproduktivnim organima.



Također je važno napomenuti da postoji prikaz slučaja pacijentice iz Wuhana koji upućuje transmisiju Cov-2 in utero na fetus.

Također, obzirom na ekspresiju ACE 2 receptora u krvožilnom sustavu, možemo zaključiti da je povećan rizik prilikom punkcije jajnika pogotovo nakon kontrolirane ovarijske hiperstimulacije gdje pacijentice razvijaju mnoštvo folikula koji su okruženi s povećanim brojem krvnih žila. Nesumnjivo je važna i ravnoteža u regulaciji ACE2 receptora te remećenjem te ravnoteže gonadotropinskom stimulacijom u kombinaciji s covid-19 bolesti, može doći do značajnih patofizioloških promjena na jajnicima te tada rizik za pacijenticu postaje višestruk – liječenjem neplodnosti plodnost postaje ugrožena.

Obzirom da su informacije nepotpune i ne možemo sa sigurnošću znati može li se dogoditi prijenos virusnih čestica putem postupka punkcije jajnika i aspiracije folikula te izolacije COC-eva na djelatnike (liječnike, sestre, biologe), potrebno je pristupiti postupku izolacije COC-eva opreznije i uz dodatno ispiranje materijala nakon izolacije.

ESHRE smjernice za laboratorijski dio dobivanja jajnih stanica preporučuju standardne protokole prilikom izolacije, a također i standardne mjere dezinfekcije površina i zaštitu osoblja, uz promptno uklanjanje aspirata nakon izolacije u posebne kontejnere i uklanjanje kontejnera iz prostorija laboratorija.

#### LITERATURA:

<https://www.rndsystems.com/resources/articles/ace-2-sars-receptor-identified>

[https://rega.kuleuven.be/ef/pdf\\_corona](https://rega.kuleuven.be/ef/pdf_corona)

<https://www.fertstertdialog.com/rooms/871-covid-19/conversations/15418>

Vaiarelli A, Bulletti C, Cimadomo D, Borini A, Argento C, Alviggi C, Ajossa S, Anserini P, Gennarelli G, Guido M, Levi-Setti PE, Palagiano A, Palermo R, Savasi V, Pellicer A, Gianaroli L, Rienzi P, Ubaldi FM, (2020). Are there specific patients candidate for oocyte collection during COVID-19 pandemic?, Fertility and sterility.

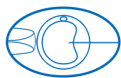
Qiu L, Liu X, Xiao M, Xie J, Cao W, Liu Z, Morse A, Xie Y, Li T, Zhu L, (2020). SARS-CoV-2 is not detectable in the vaginal fluid of women with severe COVID-19 infection, Oxford University Press.

ESHRE COVID-19 Working Group (2020). ESHRE guidance on recommencing ART treatments, ESHRE website.



Dong L, Tian J, He S, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. JAMA. Published online March 26, 2020. doi:10.1001/jama.2020.4621

Zhang, J.; Wu, Y.; Wang, R.; Lu, K.; Tu, M.; Guo, H.; Xie, W.; Qin, Z.; Li, S.; Zhu, P.; Wang, X. Bioinformatic Analysis Reveals That the Reproductive System is Potentially at Risk from SARS-CoV-2. Preprints 2020, 2020020307 (doi: 10.20944/preprints202002.0307.v1).



6. Metode oplodnje, kultivacija embrija i COVID-19: postupanje s oocitama i embrijima

Tamara Tramišak Milaković i Kristina Čavlović

### Način fertilizacije

Kod oplodnje oocita potencijalno infektivnih pacijentica preporuka je raditi ICSI oplodnju (1). Naime, virusne čestice mogle bi se nalaziti u granuloza ili kumulus stanicama oko oocite u tzv. Cummulus-oocyte kompleksu. Kod pripreme za ICSI oplodnju se enzimatski i mehanički uklanjaju granuloza i kumulus stanice čime se te stanice uklanjaju iz stanične kulture i stoga se smanjuju šanse za eventualnu infekciju. Devauxa i sur. (1) istraživali su oocite pacijentica kod kojih je HCV nađen u folikularnoj tekućini nakon aspiracije folikula. Pokazali su da uklanjanje granuloza i kumulus stanica te ispiranje jajnih stanica prije ICSI oplodnje značajno smanjuje virusni titar te su virusne čestice bile nedektabilne.

Jajne stanice potrebno je nekoliko puta isprati i nakon ICSI oplodnje te svaku oocitu kultivirati u zasebnoj kapljici pod uljem (2). Radni prostor t.j. postolje invertnog mikroskopa i nastavke za mikroinjekciju potrebno je dezinficirati odgovarajućim dezinficijensom (npr. Oosafe) nakon svakog ICSI postupka.

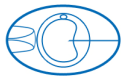
### Stanična kultura

Kod stanične kulture potrebno je koristiti sljedeće mjere predostrožnosti:

- Koristiti sterilne nastavke s filterom, za mikropipetu
- Neposredno prije rada propuhati besprašnu komoru 10-tak minuta
- Očistiti radnu plohu odgovarajućim dezinficijensom (npr. Oosafe) i sterilnom vodom
- Nekoliko puta isprati embrije prije prebacivanja u svježi medij (3)
- Prebacivati u svježi medij po principu korištenja sekvencijalnog medija (2x u 5 dana)
- Raditi što polakše da se smanji stvaranje aerosola pri manipulaciji
- Očistiti i dezinficirati radnu plohu besprašne komore nakon svakog pacijenta
- Dezinficirati mikropipete i stripere izvana odgovarajućim dezinficijensom (Oosafe)
- Propuhati besprašnu komoru nekoliko minuta nakon svakog pacijenta (4)

### LITERATURA

1. Jindal SK, Rawlins RG, Muller CH, Drobnis EZ (2016) Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 33(2):121-30.
2. Devaux A, Soula V, Sifer C, Branger M, Naouri M, Porcher R, Poncelet C, Neuraz A, Alvarez S, Benifla JL, Madelenat P, Brun-Vezinet F, Feldmann G (2003) Hepatitis C virus detection in



- follicular fluid and culture media from HCV+ women, and viral risk during IVF procedures. Hum Reprod. 18(11):2342-9.
3. The revised guideline for good practice in IVF laboratory (2015) ESHRE
  4. De Santis L, Anastasi A, Cimadomo D, Klinger FG, Licata E, Pisaturo V, Sosa Fernandez L, Scarica C (2020) COVID-19: the perspective of Italian embryologists managing the IVF laboratory in pandemic emergency. Hum Reprod. Apr 8. pii: deaa074. doi: 10.1093/humrep/deaa074.



### Kriopohrana biološkog materijala i SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je RNA virus koji ima sposobnost preživljavanja na niskim temperaturama i reaktivacije nakon ponovnog postizanja stabilnih uvjeta u staničnoj kulturi. Zbog moguće kontaminacije uzorka česticama virusa, prilikom procesa zamrzavanja i odmrzavanja biološkog materijala (sjeme, tkivo testisa, jajne stanice, zameci), potrebno je biti iznimno oprezan. Kako jajne stanice i zameci nemaju receptore za SARS-CoV-2, neće doći do integracije virusa u genom domaćina, ali je moguća transmisija virusa putem stanične kulture ili tekućeg dušika na pacijente i ostalo medicinsko osoblje.

Da bismo smanjili rizik od transmisije virusa putem kontaminirane stanične kulture, potrebno je prije postupka zamrzavanja više puta ispirati uzorak (jajne stanice, zameci) kroz čiste kapi kultivacijskog medija. S obzirom na mogućnost kontaminacije tekućeg dušika virusom SARS-CoV-2 te time i kontaminacije biološkog materijala preporuča se, prilikom zamrzavanja, izbjeći kontakt biološkog materijala i tekućeg dušika (zamrzavanje slow freezing metodom ili vitifikacija u zatvorenom sustavu). U slučaju zamrzavanja sjemena i tkiva testisa potrebno je pridržavati se propisanog protokola za zamrzavanje, uz dodatne mjere opreza prilikom rukovanja (nema direktnog kontakta uzorka s tekućim dušikom budući da se uzorak nalazi u hermetički zatvorenim kriotubicama ili krioslamčicama).

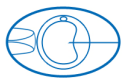
Preporuke za rad s biološkim materijalom u procesu zamrzavanja/odmrzavanja tijekom pandemije SARS-CoV-2 virusa su:

- prethodno sterilizirati svu aparaturu koja se može sterilizirati (pincete, metalne kadice za tekući dušik, metalni nosači)
- više puta ispirati biološki materijal prije postupka zamrzavanja i nakon postupka odmrzavanja (jajne stanice i zameci)
- koristiti posebni spremnik s tekućim dušikom za skladištenje bioloških uzoraka koji s kriopohranjuju na tzv otvoreni sustav za kriopohranu. Ukoliko se koristi zatvoreni sustav za kriopohranu, skladištenje uzoraka je prema uobičajenom protokolu.

#### LITERATURA:

1. Parmegiani L, Maggiulli R, Menegazzo M, Ebner T: Efficiency and safety of human reproductive cell/tissue vitrification. *Reprod Stem Cell Biotechnol* 3(1):22-40, 2012
2. Bright Yakass M, Woodward B: COVID-19: should we continue to cryopreserve sperm during pandemic? *Reproductive Biomedicine Online* 2020





3. Molina I, Mari M, Martinez JV, Novella-Maestre E, Pellicer N, Peman J: Bacterial and fungal contamination risk in human oocyte and embryo cryopreservation: open versus closed vitrification systems. *Fertility and Sterility*, Vol.106, No.1, July 2016
4. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M: Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* (2011)23,505-512



Obzirom da još uvijek ne postoje znanstveni dokazi o svim načinima prijenosa virusa kao ni o utjecaju navedenog virusa na ljudske gamete i zametke dužni smo osigurati provođenje mjera za sprečavanje i suzbijanje širenja infekcije među našim pacijentima kao i među zdravstvenim osobljem koje sudjeluje u procesima medicinski pomognute oplodnje. Ukoliko IVF centar ne udovoljava tehničkim standardima za sigurno epidemiološko postupanje propisano u liječenju Covid-19 pozitivnih pacijenata (što uključuje zasebnu salu za aspiracije s pripadajućim IVF laboratorijem samo za Covid-19 pozitivne pacijente) predlažemo sljedeće:

- 1) Ukoliko u ranijoj fazi postupka (prije aspiracije ili odmrzavanja) dođe do pojave simptoma i/ili imamo pozitivan test: odustaje se od daljnjeg postupka.
- 2) Ukoliko do pojave simptoma dođe nakon aspiracije, a tijekom kultivacije zametaka te zarazu potvrdimo testom: kriopohranjuju se svi zametci, pri čemu se posebna pažnja posvećuje sigurnom načinu kriopohrane.
- 3) Ukoliko se pojave simptomi I imamo pozitivan test prije aspiracije ali kod pacijentica kod kojih postoji visoki rizik (životno ugrožavajući) za hiperstimulaciju (OHSS) te kod onkofertilitetnih pacijentica:

U iznimnim slučajevima napraviti će se aspiracija jajnih stanica u posebno opremljenoj I izdvojenoj aspiracijskoj sali koja je namijenjena za rad sa Covid-19 pozitivnim pacijentima gdje se poštuju sve epidemiološke mjere za suzbijanje širenja zaraze (poseban postupak oblačenja I svlačenja radno zaštitne odjeće (zaštitni kombinezon, kirurška kapa, zaštitna maska, naočale, vizir , dva para nitrilnih rukavica); zaseban ulaz I izlaz; prostor za provjetranje prije svlačenja; šator za skidanje opreme).

Nakon postupka aspiracije potrebna su još dodatna tri sata u tom prostoru kako bi se jajne stanice pohranile ali samo u slučaju da se neposredno uz aspiracijsku salu nalazi I pripadajući IVF laboratorij samo za Covid-19 pozitivne pacijente (bezprašna komora sa lupom I grijanom podlogom, CO2 inkubator sa bocom mješavine plinova, prienosni kontejner za tekući dušik, kadica za kriopohranu).

**Nažalost niti jedan laboratorij u RH ne udovoljava tehničkim standardima propisanim u liječenju Covid-19 pozitivnih pacijenata te u takvih pacijentica ne bismo mogli dovršiti postupak.**

Postupak iz točke 3. zahtijeva značajnu financijsku investiciju ali je jedini način za sigurno postupanje u navedenim uvjetima I kvalitetnu pohranu biooškog materijala koji je izuzetno osjetljiv na vanjske uvjete (temperatura, CO2, O2, pH).



**LITERATURA:**

- Cocolini et al. (2020) Surgery in COVID-19 patients: operational directives. World Journal of Emergency Surgery.15:25
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Information for Healthcare Professionals about Coronavirus (COVID-19). Available from URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/index.html>
- American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Patient Management and Clinical Recommendations During the Coronavirus (COVID-19) Pandemic. Available from URL: <https://www.asrm.org/globalassets/asrm/asrm-content/news-and-publications/covid-19/covidtaskforceupdate3.pdf>



## ZAKLJUČCI

1. Trijaža osoblja i pacijenata prema upitniku, te testiranje na COVID-19 na osnovi trijaže.
2. Metoda za određivanje virusa jest amplifikacija RT-qPCR.
3. Oba partnera koji ulaze u IVF/ICSI postupak testirati na COVID-19 36 sati prije punkcije folikula (na dan davanja hCG-a).
4. Partnera u AIH postupku testirati dva dana prije postupka.
5. Pacijenticu u postupku FET testirati dva dana prije postupka.
6. Pozitivnim pacijenticama na COVID-19 prekida se ciklus.
7. U slučaju hiperstimulacije, a dokazane COVID-19 infekcije, punkcija folikula se vrši **isključivo radi očuvanja zdravlja** pacijentice a ne radi *in vitro* postupka, te se folikularni aspirat NE PREDAJE u laboratorij nego se propisno zbrinjava i baca.
8. Obzirom da se još uvijek ne znaju sigurni načini prenošenja infekcije, te lažno negativnih rezultata zbog neprimjerenog postupanjima s uzorcima briseva, primjenjuju se sve epidemiološke preporuke i preporuke u dokumentu HDKE - *Preporuke Hrvatskog društva kliničkih embriologa za zdravstveno-epidemiološki okvir potreban za provođenje metoda medicinski pomognute oplodnje na siguran način za pacijente i zdravstveno osoblje tijekom virusne pandemije COVID -19.*
9. Ako pacijentica izrazi simptome COVID-19 do dana transfera, embriji se zamrzavaju u zatvorenom tipu nosača prema standardnoj proceduri ili skladište u posebnom spremniku.
10. Embriolozi rade u režimu dva tima, koji su organizirani za rad rotacije svaka dva tjedna, ili u jutarnjoj/popodnevnoj smjeni. Između dnevne rotacije smjena potreban je razmak od sat vremena u kojem se laboratorij čisti.