

Laboratorní reprodukční imunologie – praktické zkušenosti v podmínkách rutinní imunologické laboratoře

Ivana Janatková, Karin Malíčková

Klinická imunologie a alergologie - laboratoř
ÚKBLD VFN a 1.LF UK v Praze

Neplodnost – neschopnost počít dítě po roce pravidelného nechráněného styku

- × postihuje podle WHO 15 až 20 % párů v reprodukčním věku
- × u 40 % takto postižených párů je příčina neplodnosti na straně mužů
- × ve 40 % je příčina na straně žen
- × ve 20 % je problém na obou stranách

- ✘ neplodných párů přibývá
- ✘ příčiny neplodnosti: gynekologické/andrologické, hormonální, infekční, genetické ...
... imunologické (zejména orgánové a systémové autoimunitní onemocnění, buněčné imunopatologie)
- ✘ velmi záleží na správné a včasné diagnostice

**Návrh doporučení pro
stanovení parametrů protilátkové a buněčné imunity
u žen a mužů s poruchami plodnosti**

Pracovní skupina: Marcela Drahošová, Jindřich Madar, Ivana Janatková

Konzultanti: Karin Malíčková, Marie Havranová

Revidovala: Prof. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.

<http://sli-csaki.wz.cz/data/plodnost.pdf>

Klinická imunologie a alergologie - laboratoř

ÚKBLD VFN a 1.LF UK v Praze

- vyšetření pro Centrum asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky VFN, jiné CAR (vč. mimopražských)
- vyšetření pro Ambulanci reprodukční imunologie ÚKBLD VFN, jiné ambulance reprodukční a/nebo klinické imunologie

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

1. protilátky proti fosfolipidům
2. protilátky proti spermiím
3. protilátky proti zona pellucida
4. protilátky proti ovariím
5. protilátky proti annexinu V
6. protilátky proti tkáňové transglutamináze
7. antinukleární protilátky
8. [protilátky proti thyreoperoxidáze]
9. počet cirkulujících NK (natural killers) buněk
10. intracelulární produkce cytokinů

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

protilátky proti *fosfolipidům*: kardiolipin, beta-2 GP1, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, kyselina fosfatidová

multivariantní analýza souboru 61 nemocných s APS: vysoká prediktivní hodnota kombinace

- *AB2GP1 + ACL + APS a AB2GP1 + ACL + APA pro cévní trombózu jako komplikaci APS*
- *AB2GP1 + ACL a AB2GP1 + APS pro habituální potrácení*

Branch W; Obstetric Task Force. Report of the Obstetric APS Task Force: 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, 13th April 2010. Lupus. 2011;20(2):158-64.

tj. testování protilátek proti širšímu spektru fosfolipidů zvyšuje senzitivitu laboratorních testů k potvrzení APS a uvedené kombinace autoproti látek mohou klinika upozornit na vyšší riziko konkrétní komplikace APS

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

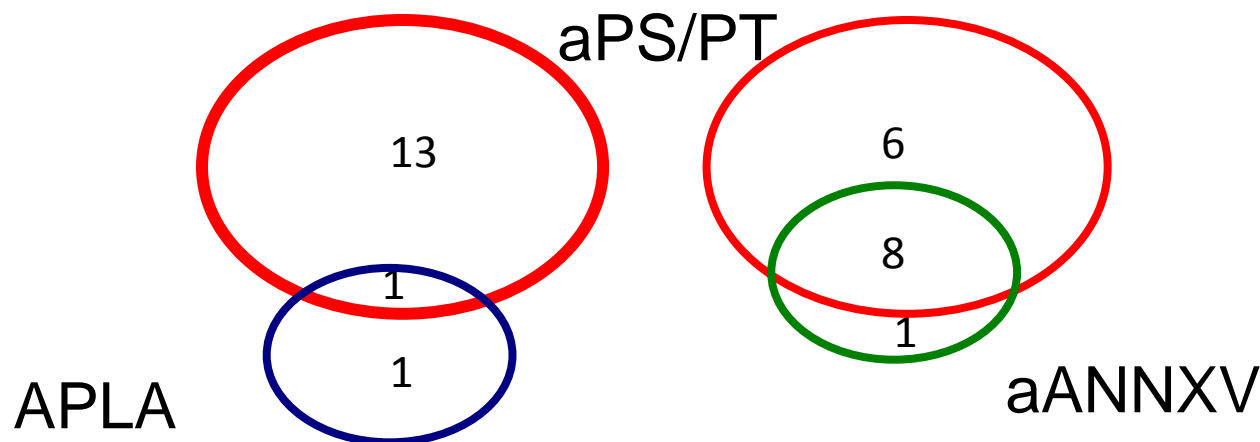
fosfatidylserin-dependentní anti-protrombinové protilátky **anti-PS/PT**

Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus*. 2010;19(4):436-9.

- opakované časné spontánní potraty
- výskyt aPS/PT nesouvisí s APLA
- ELISA

Pilotní studie KIA ÚKBLD: 30 pacientek

- 22 habituální potrácení (3-11x), 8 primární sterilita (0 gravidita)
- v souboru potrácejících výskyt aPS/PT 14/22 (64%)!!, v souboru sterilít 0/8



KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

protilátky proti spermiím – cílové antigeny

specifické proteiny spermií

- heat shock proteiny (HSP70, HSP70-2)
- disulfid izomeráza (ER60), kaspáza 3
- podjednotky proteasomu - komponenta C2 a zeta-řetězec

- metoda stanovení - ELISA

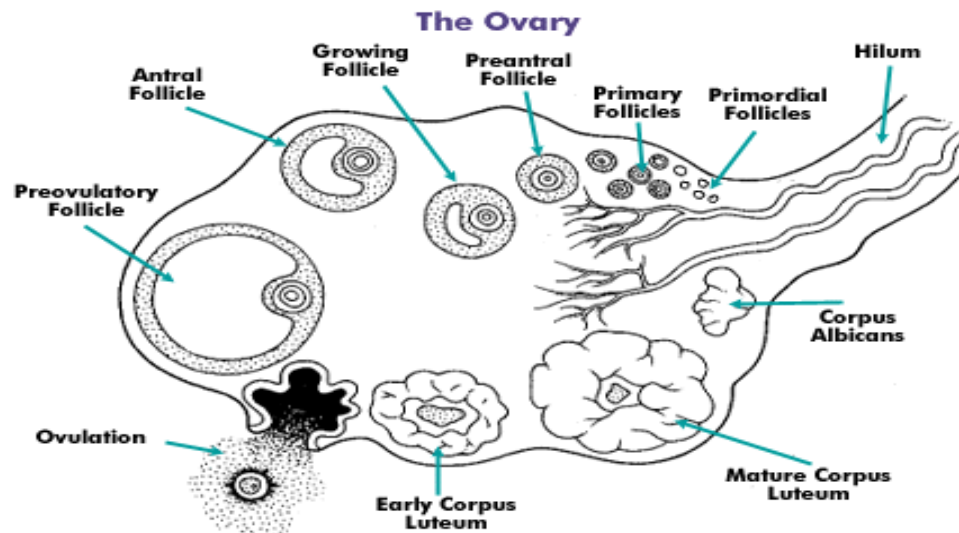


KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

protilátky proti ovariím

- vyskytují se až u 2/3 žen s diagnózou **predčasného ovariálního selhání**
- cílové antigeny: specifické ovariální proteiny derivované z ooplasmy oocyta, buněk theca granulosa a corpus luteum
- metody stanovení: nepřímá imunofluorescence (řezy opičích ovarií), ELISA (aktinin-4, heat shock 70 protein 5, cytoplazmatický aktin)

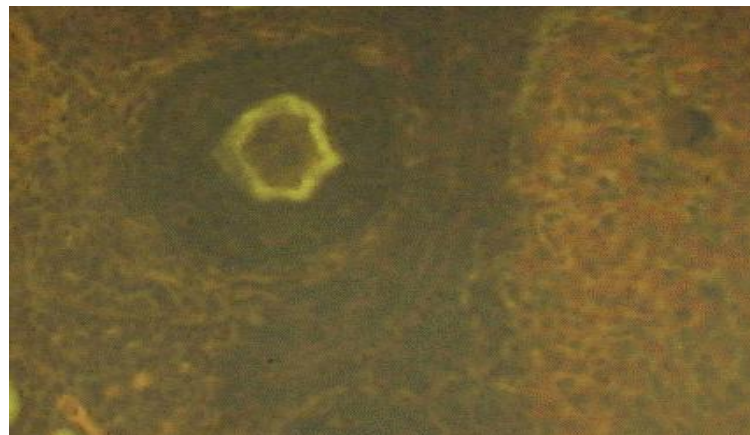


KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

protilátky proti zona pellucida

- cílový antigen: proteiny extracelulární matrix oocyty, které mají významnou úlohu při folikulogenezi a fertilizaci
- nemožnost průniku spermie do oocyty jak při pokusech o fyziologickou koncepci, tak i při technikách IVF bez ICSI
- Metody stanovení: nepřímá imunofluorescence, ELISA

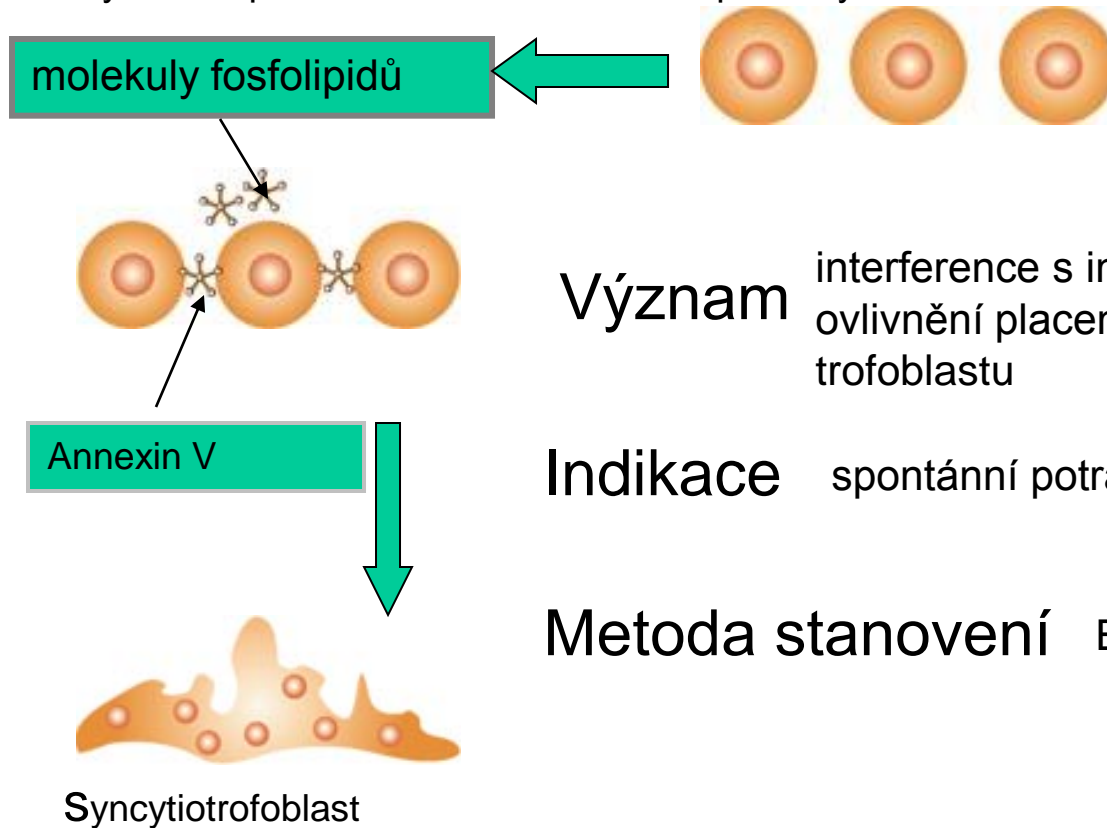


KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

protilátky proti annexinu V

ANNEXIN V - placentární antikoagulační faktor
vysoká exprese na buňkách tvořící se placenty



Význam interference s implantací embrya -
ovlivnění placentace v průběhu invaze
trofoblastu

Indikace spontánní potraty zejm. v 1. trimestru

Metoda stanovení ELISA

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

protilátky proti tkáňové transglutamináze

- celiakie – gluten-senzitivní enteropatie
- „silent“ forma bez GI příznaků
- **jediná a účinná terapie – bezlepková dieta**
- porucha plodnosti při celiakii – malabsorpce?
jiné mechanismy?

V našem souboru 67 % pozitivních pacientek při terapii dietou otěhotnělo a donosilo zdravé dítě.

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

antinukleární protilátky

(jaderné antigeny ANA, ENA)

- *autoimunitní ladění organismu*
- *autoimunitní onemocnění (Sjögrenův syndrom – CAVB III.stupně u plodu, SLE – riziko progresse nemoci v průběhu gravidity a po porodu)*

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

NK buňky

(natural killers, přirození zabíječi)

- NK buňky jsou významně zastoupeny v děložní sliznici, kde v průběhu implantace embrya plní řadu fyziologických funkcí.
- U žen s primární idiopatickou sterilitou a u habituálního potrácení bylo zjištěno zvýšené zastoupení NK buněk v periferní krvi

dysregulace NK aktivity s patologickým vlivem NK cytotoxicity na spermie a/nebo buňky trofoblastu

KIA ÚKBLD VFN a 1.LF UK

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

Intracelulární cytokiny

TNF-alfa, IL-2, IL-4, IFN-gama

Comparative parameters	Infertile women		Healthy non-pregnant women		p-value
	n = 185		n = 50		
	Median	IQR	Median	IQR	
Age (years)	34.2	30.5-36.4	33.5	29.0-37.0	0.1867*
TNF-α (%)	41.7	35.6-50.3	23.6	16.5-38.2	<0.0001
IFN-γ (%)	28.4	22.5-35.4	21.2	16.3-27.3	<0.0001
IL-2 (%)	36.0	30.2-42.2	25.5	18.6-36.9	<0.0001
IL-4 (%)	5.8	3.6-7.3	3.5	2.5-5.4	<0.0001

Kdy indikovat imunologické vyšetření neplodného páru:

- po 2 neúspěšných embryotransferech u žen < 35 let a po 1 neúspěšném embryotransferu u žen > 35 let
- 2 a více potratů (bez rozdílu věku)

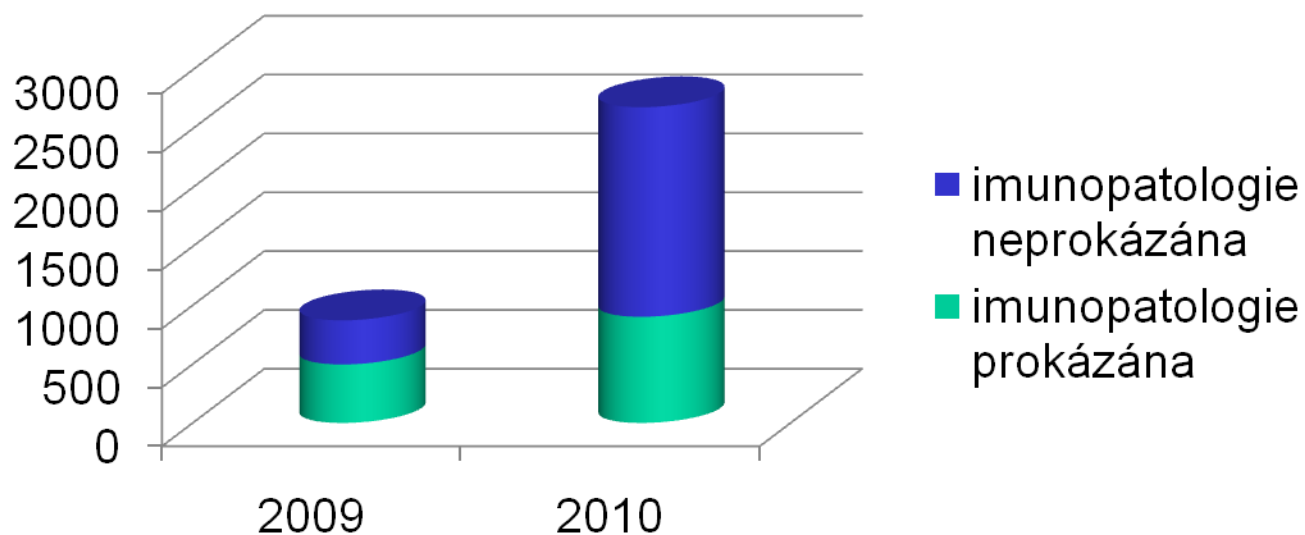
Screening autoprotiátok reprodukčního souboru by dle našich zkušeností měl patřit mezi vstupní laboratorní vyšetření v centrech asistované reprodukce

– záchyt imunopatologie ještě před zahájením technik asistované reprodukce

2009 - 2010

Z ambulancí VFN (CAR + ambulance reprodukční imunologie) bylo odesláno k vyšetření celkem **3555** pacientek.

Z toho u **872** pacientek byla alespoň 1x prokázána imunopatologie.



Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezy k dnešnímu dni?

53 x APLA +

APS (Sapporo, Sydney)

19 porodily

4 gravidní

14 potratily

13 neotěhotněly

2 chybí informace

44 %

Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezem k dnešnímu dni?

15 x anti-annexin V +

5 porodily

1 gravidní

3 potratily

6 neotěhotněly

40 %

Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezy k dnešnímu dni?

234 x ASA +

89 porodily | 50 gravidní

10 potratily

81 neotěhotněly

1 chybí informace

59 %

Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezem k dnešnímu dni?

42 x AOVA +

2 porodily

9 gravidní

2 potratily

27 neotěhotněly

1 chybí informace

26 %

Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezem k dnešnímu dni?

10 x AZP +

4 porodily

0 gravidní

0 potratily

0 neotěhotněly

6 chybí informace

40 %

Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezem
k dnešnímu dni (září 2011) ?

24 x ATTA +

15 porodily | 1 gravidní

3 potratily

2 neotěhotněly

3 chybí informace

67 %

Jaký je stav těchto pacientek s pozitivním nálezem/nálezem k dnešnímu dni?

194 pacientek s vysokou i.c. produkcí embryotoxického TNF-alfa

62 porodily | 13 gravidní

14 potratily

86 neotěhotněly

21 chybí informace

39 %

Kolik to všechno stojí...

ATTA	330,-
APLA screen	1380,-
ACLA	580,-
Anti-beta2GP1	690,-
AOVA	350,-
AZP	200,-
ASA	350,-
Anti-annexin V	350,-
i.c. cytokiny	1600,-
	Σ 5830,-



ALE

Stimulační protokol s rec FSH (včetně léčiva)	5 000,-
Ostatní léky	5 000 – 30 000,-
IVF cyklus bez transferu	11 660,-
IVF – kompletní cyklus s transferem embryí	22 500,-
ICSI – vpíchnutí spermií do max. 10 oocytů	6 000,-
ICSI – vpíchnutí spermií nad 10 oocytů	8 000,-
Poplatek za sperma při dárcovské inseminaci	550,-
Příjem darovaných oocytů	8 000,-
Příjem darovaných embryí	12 600,-
Kryoembryotransfer	3 000,-

ZÁVĚRY

- včasná indikace imunologického vyšetření
- správná indikace imunologického vyšetření
- adekvátní terapie

- ekonomické hledisko
- neinvazivní vyšetření
- možné snížení potřeby ART

Kazuistika č.1

- Paní N.C., * 1971, původem z neevropské země bývalého SSSR
- na území ČR od r. 1999 nelegálně
 - v r. 2001 udělen statut azylanta
 - od r. 2006 trvalý pobyt

Kazuistika č.1

- snaha o těhotenství se současným partnerem od roku 1998
- přirozené početí po cca 6 měsících snahy v roce 1999
- spontánní potrat v 1.trimestru těhotenství (CAVE složitá emigrace ze země původu)
- po potratu nebyla žena vyšetřena gynekologem (v ČR nelegálně)

Kazuistika č.1

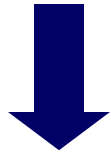
- po potratu se partneři snažili přirozenou cestou o další těhotenství **7 let**, neúspěšně
- po celou dobu **7 let nenavštívila žena gynekologa** ani jiného lékaře („syndrom zdravých migrantů“)
- pacientka uvádí **četné gynekologické infekce**, které léčila přírodními prostředky nebo nijak

Kazuistika č.1

- První gynekologické vyšetření a následně vyšetření v centru asistované reprodukce v místě tehdejšího bydliště až v roce 2006:
 - muž zdravý, SPG normální
 - žena chronická bakteriální vulvovaginitida
- Pacientka byla přeléčena lokálními antimikrobiálními přípravky
- Poté v letech 2006 a 2007 opakované neúspěšné AIH

Kazuistika č.1

- První vyšetření v CAR VFN a 1.LF UK v Praze v prosinci 2007



koncentrace protilátek proti spermiím v séru

149 U/ml

(N 0-60 U/ml)

Kazuistika č.1

8 let nechráněného styku v terénu chronických recidivujících A NELEČENÝCH vulvovaginitid



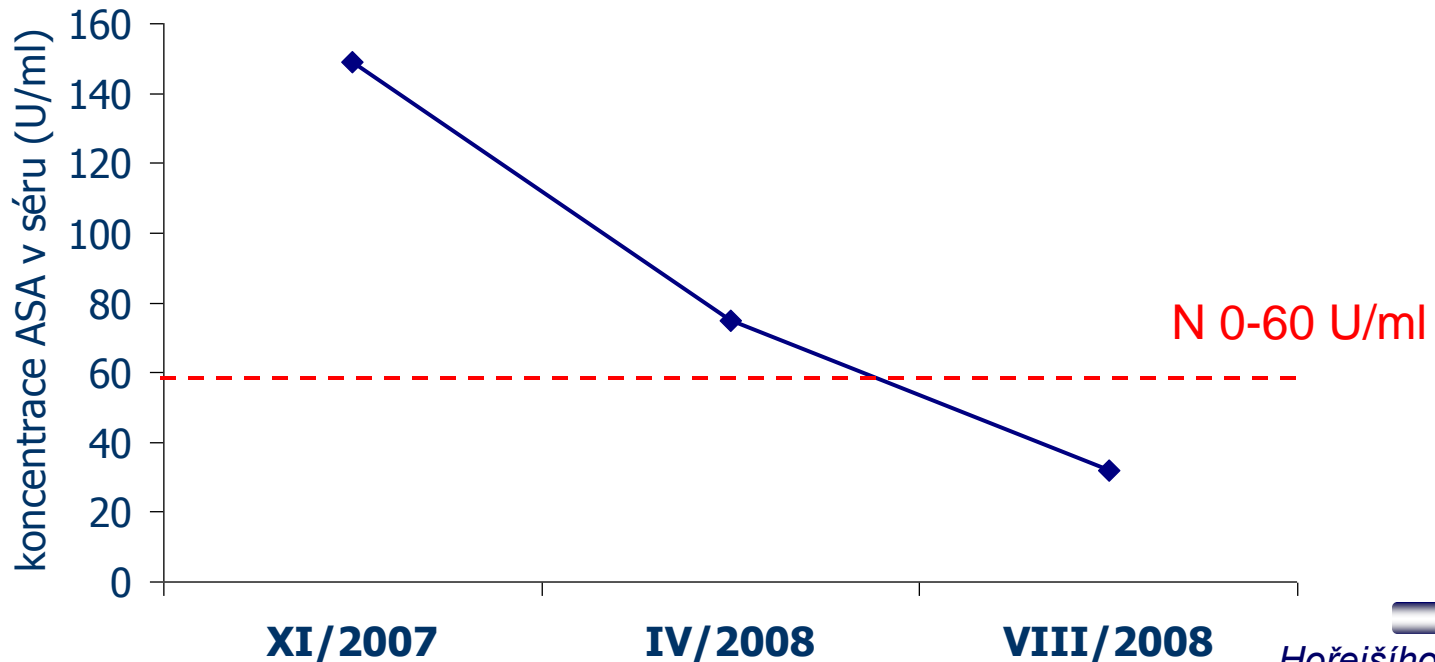
senzibilizace antigeny spermií se vznikem protispermatických alloprotilátek



neplodnost

Kazuistika č.1

- Důkladné zaléčení gynekologických infekcí celkovou antibiotickou léčbu dle citlivosti - 3 měsíce
- Prednison 5 mg/d p.o. - 5 měsíců



Kazuistika č.1

- V září 2008 první IVF cyklus
- úspěch
... ale zamklý potrat



- v roce 2009 další 5-měsíční cyklus
kortikoterapie v imunomodulační dávce
fyziologická koncepce

zdravá dcera

Kazuistika č.2

- dr. M.B., * 1973
- snaha o těhotenství od roku 1998, v r. 1999 1x přirozené početí se spontánním potratem v 1.trimestru
- od roku 2000 v péči CAR VFN a 1.LF UK
 - diagnóza: neplodnost s imunologickou příčinou
- antifosfolipidový syndrom

Kazuistika č.2

- V letech 2000 - 2005 absolvovala celkem **37** inseminací, otěhotněla 2x, a to v letech 2000 a 2001, vždy spontánní potrat do 8.tt
- Imunologické vyšetření poprvé v roce 2005:
 - pozitivní antifosfolipidové protilátky (anti-CL, anti-beta2GP1, anti-PS, anti-PI IgM)
 - pozitivní lupusové antikoagulans

Kazuistika č.2

- V letech 2006 a 2007 prodělala 4 cykly IVF ET, otěhotněla 2x, vždy spontánní potrat v 1.trimestru
- Ve druhé polovině roku 2007 pár adoptoval dítě v kojeneckém věku a na více než rok přerušil snahy o těhotenství - asistovanou reprodukci
- V létě 2008 **přirozené** početí, spontánní potrat v 7.tt.

Kazuistika č.2

- Celkem tedy **58** inseminací a **6** embryotransferů, spolu s přirozeným početím před 12 lety gravidní celkem 6x, vždy spontánní potrat do 8.tt.

Poslední 3 gravidity s řádnou terapií

Kazuistika č.2

- V červnu 2009 (věk 37 let, po 11 letech snažení)
59. inseminace - 7.gravidita

IVIG (300 mg/kg) v 6.tt. a poté Igamplia 320 mg á 1 týden do 36.tt.

Clexane 0,6 ml s.c./d

Prednison 10 mg/d

zdravý syn * II/2010

Kazuistika č. 3

- Pacientka O.C., * 1970
- snaha o graviditu od roku 1998
- primární idiopatická sterilita
- Od r. 2000 prodělala ve 2 IVF centrech celkem **7** IVF, vždy dostatečný počet vajíček i kvalitních embryí, nikdy neotěhotněla

Kazuistika č. 3

- CAR VFN jako třetí IVF pracoviště
- imuno vyšetření - rozšířený panel
- velmi vysoká i.c. produkce TNF-alfa opakovaně

Žad: 84613 Dg: D899 V L K1 K2 T E
Posl. ž.: 09.04.08 / 23.01.08 KIA provoz

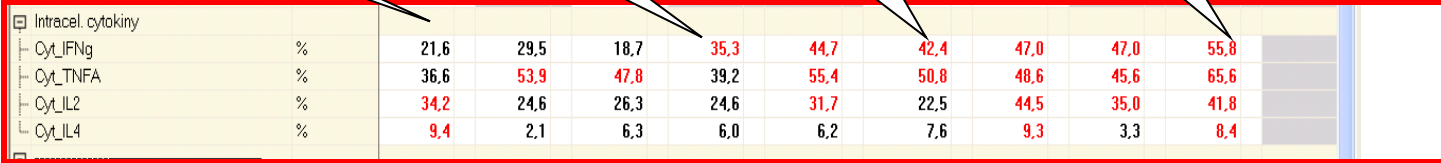
Zkratka	Jednotka	18.05.10 12:00	26.04.10 12:30	29.03.10 09:45	11.01.10 15:00	21.07.09 12:30	06.01.09 12:45	13.10.08 14:45	09.06.08 11:30	09.04.08 12:00	09.04.08 12:00
S_ANGAM	U/ml				3,04	10,90				
S_LAMG	U/ml										2,2
S_OVAg	U/ml				5,2	0,0	3,8	3,1	0,0		9,3
S_ZP	U/ml				0,0	5,0	0,0	2,7	2,6		0,1
S_SPEG	U/ml				34,8	49,4	35,6	60,0	0,0		55,4
ECP											
S_ECP	ng/ml	12,3	32,4								
Specifické IgE											
S_GP1	třída		3/10,90								
S_TP5	třída		2/2,26								
S_TP6	třída		4/19,50								
S_fx1	třída		0/0,12								
S_WP5	třída		0/0,27								
S_MP1	třída		0/<0,10								
Subpopulace LYMFO											
K_LYA	10 ⁹ /l	není KO	není KO	není KO	není KO	není KO	není KO	není KO	není KO	není KO	
Ly_CD3	%	68,8	71,3	67,3	69,8	68,9	70,5	64,3	65,7	65,4	
Ly_CD4	%	28,7	32,0	29,8	30,9	30,0	28,2	30,4	24,5	23,6	
Ly_CD8	%	31,6	32,9	31,8	33,1	33,0	37,5	31,3	34,5	36,5	
Ly_45RA	%										12,2
Ly_CD5	%	67,6		68,1			71,7	68,1			21,5
Ly_4+RA	%	10,0		9,2			13,5	10,7			0,6
Ly_5+19	%	1,9					1,2	1,9			
Intracel. cytokiny											
Cyt_IFNg	%	21,6	29,5	18,7	35,3	44,7	42,4	47,0	47,0	55,8	
Cyt_TNFA	%	36,6	53,9	47,8	39,2	55,4	50,8	48,6	45,6	65,6	
Cyt_IL2	%	34,2	24,6	26,3	24,6	31,7	22,5	44,5	35,0	41,8	
Cyt_IL4	%	9,4	2,1	6,3	6,0	6,2	7,6	9,3	3,3	8,4	
-_OS	-	40	38	31	/36	/9	mimo UKB	/36	/33	26	26
Nezařazené metody											
-_SEP1	-	1	1		1	1	1	1	1		1
q_AkrK	-										1
-_AkrK	-										ano

gravidní
12.tt.

po IVIG a
pentoxifylinu

po
kortikoidech

vstupní
hodnoty



Kazuistika č. 3

- Vysoký i.c. TNF-alfa - následek opakovaných IVF? Primární příčina sterility?
- Terapie vedla cca po roce k úpravě laboratorních nálezů
- Gravidní po 8. IVF, **zdravá dcera**



40-letá primigravida
náklady na **8** IVF cyklů
12 let trvajících stres...

DĚKUJI ZA POZORNOST.

