

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.

Účel: účelem tohoto doporučení je pomoci pracovníkům klinických laboratoří, případně lékařům, orientovat se v racionálním využití parametrů humorální a buněčné imunity v klinické praxi.

Situace: V současné době je ve vyspělých zemích řešena problematika poruch plodnosti u přibližně u 20-25 % párů ve fertilním věku. Jednou z příčin poruch fertility u obou pohlaví může být porucha imunitního systému. V současnosti je popisováno několik desítek imunopatologií, které mohou vyústit ve sterilitu, případně infertilitu. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem nabývá na významu zařazení metodik reprodukční imunologie do standardních postupů péče o neplodné páry.

Limitace: Toto doporučení nemá nahradit uvážlivé rozhodování ošetřujícího lékaře a nemůže také postihnout všechny možné situace, jež mohou nastat v klinické praxi. Lékař a laboratorní pracovník by měl však zodpovědně zajistit pacientovi v každém individuálním případě adekvátní péči. Doporučení bude průběžně revidováno v závislosti na vývoji nových poznatků a metodik v oblasti reprodukční imunologie

Věříme, že zdravotníkům umožní tato pomůcka dané metody cíleně indikovat a interpretovat jejich výsledky ve prospěch svých pacientů.

Přáli bychom všem pacientům, aby dále uvedená vyšetření byla uvážlivě používána v jejich prospěch, aby přispívala ke stanovení správné diagnózy, a případně pomohla v monitorování léčby.

Indikace imunologického vyšetření párů s poruchami plodnosti

1. Páry, kterým se nepodaří dosáhnout těhotenství po roce pravidelného nechráněného pohlavního styku
2. Ženy s opakovanými spontánními ztrátami plodu (*po 2 spontánních potratech bez rozdílu věku*)
3. Po neúspěšných metodách asistované reprodukce (*neotěhotnění, nedonošení životaschopného plodu*). Indikace po 2 neúspěšných IVF

Technické a personální požadavky:

Pracoviště by mělo disponovat příslušně kvalifikovaným personálem znalým problematiky.

- ☐ Laboratoř by měla být schopna zajistit výsledky pokud možno o stejné analytické nejistotě a vysoké reprodukovatelnosti.
- ☐ Frekvenci vyšetření řídí ošetřující lékař na základě svých zkušeností a s ohledem na klinický stav pacienta.
- ☐ Interpretace výsledků (*případně s návrhem léčebného postupu*) pro terénní gynekology náleží do rukou klinického imunologa, který se zabývá poruchami reprodukce.

- v možnostech těchto pracovišť by měla být **komplexní vyšetření, zahrnující 4 oblasti:**
 - vyšetření ejakulátu
 - vyšetření séra
 - vyšetření lymfocytů (*periferní krev*)
 - vyšetření ovulačního sekretu

Preamalytická fáze:

Ejakulát: Pacient musí být poučen o způsobu odběru a jeho event. transportu. Odběr do sterilní nádoby bez aditiv. Před vyšetřením je nutná konstantní doba několika dnů bez ejakulace, dle WHO manuálu 48 hodin až 7 dnů. Při jednotlivých vyšetřeních musí být tato doba stejná. Stabilizace parametrů spermiogramu nastává 5. den abstinence a tato doba se jeví jako optimální. Nejlepší je okamžité zpracování ejakulátu, pokud pacient není schopen, je možný odběr v domácím prostředí, pacient musí být poučen a vybaven odběrovou nádobou. Transport nesmí trvat déle jak 60 minut, musí proběhnout ve tmě a teplotě blízké teplotě těla. *Se vzorky ejakulátu je třeba zacházet jako s možným zdrojem infekce.*

Sérum: standardní zkumavky bez protisrážlivých prostředků nebo s použitím separačních gelů a akceleratorů. Po odběru je nutno zkumavku nechat stát při pokojové teplotě cca 1 - 2 hodiny a potom uložit zkumavku na max. 1 den do lednice (4 - 8°C) nebo předat do laboratoře. Sérum se získá sedimentací nebo centrifugací (*10 minut, 3000 rpm*).

Krev na fenotypizaci lymfocytů - zkumavky s protisrážlivým prostředkem (heparin, EDTA). Po odběru je třeba obsah zkumavky opatrně promíchat (*pomalým obracením nebo kýváním*), uchovat při pokojové teplotě a dopravit do laboratoře v den odběru (*optimálně do 4 hodin od odběru*).

Krev na funkční vyšetření lymfocytů: zkumavky s protisrážlivým prostředkem (*heparin*). Po odběru je třeba obsah zkumavky opatrně promíchat (*pomalým obracením nebo kýváním*), uchovat při pokojové teplotě a dopravit do laboratoře v den odběru (*nejdéle do 4 hodin od odběru*).

Skladování:

Sérum: Skladuje se při teplotě +4 - +8°C po dobu max. 1 týden, více než jeden týden při -20°C, více než 1 rok při -70°C, opakovaně nerozmrazovat.

Seminální plazma: skladuje se při teplotě +4 - +8°C po dobu max. 1 týden, více než jeden týden při -20°C, více než 1 rok při -70°C, opakovaně nerozmrazovat. Jiný biologický materiál nelze skladovat.

Nejčastěji používané metody:

- aglutinace (přímá, nepřímá), hemaglutinace
- EIA
- fluorescenční a světelná mikroskopie
- průtoková cytometrie

Navrhované metodické postupy, indikace vyšetření - přehled

MUŽ

metody I. volby	spermiogram kvalita ejakulátu protilátky proti spermiím v ejakulátu (v seminální tekutině, navázané na spermie)
metody II. volby	protilátky proti spermiím v séru funkční aktivita NK buněk, MIF screening syst. imunopatol. onemocnění (ANF, ATTG, anti-endomysium) dle potřeby provést další vyšetření

Nezbytnou podmínkou imunologického vyšetření ejakulátu je předchozí vyšetření **spermiogramu dle standardů WHO**. Toto vyšetření může být provedeno na různých pracovištích (urologie, gynekologie, genetika, biochemie, cytologie, sexuologie).

Doporučená metoda: standard WHO (*WHO Manual for Semen Analysis*, 1987, nové vydání 1999).
Spermiogram nemusí povinně vyšetřovat imunologická laboratoř (*spermiogram by měl zůstat doménou výše uvedených pracovišť*)

1. kvalita ejakulátu:

- počet spermií
- počet leukocytů (*CD45PE-DY647*)
- vitalita spermií (propidium jodid)
- integrita akrozomu spermií (*IAP/FITC*, myší MoAb, *Hs-14*)
- přítomnost intraakrozomálního proteinu
(*IAP/FITC*, myší MoAb, *Hs-14*, *Hs-8*, příp. *Hs-36*)

metoda: průtoková cytometrie (*SpermFlow Kit*, *Exbio*)
přítomnost vnitřního akrozomálního proteinu lze stanovit metodou přímé fluorescence, není-li k dispozici průtokový cytometr (*FITC Pisum sativum*)

mikrobiologické vyšetření ejakulátu

indikace: při zvýšeném množství leukocytů, ($>1 \times 10^6/\text{ml}$)
(počet leukocytů je vhodné stanovit pomocí průtokového cytometru)

2. stanovení přítomnosti autoprotilátek navázaných na spermie v ejakulátu (*IgG*, *IgA*)

indikace: poruchy motility, aglutinace spermií, inhibice akrozomální reakce, oligospermie, neuspokojivém oplození oocytů při IVF, idiopatické sterilitě, abn. postkoitálnímu testu, abn. Kremerově testu, abn. spermiogramu.
Vznikají zpravidla jako následek traumatu, infekce.

metoda: přímý MAR test (*Mixed Antiglobulin Reaction*)

3. stanovení autoprotilátek v seminální tekutině

indikace: zpravidla při zjištěné oligozoospermii, případně azoospermii, abn. postkoitálnímu testu, abn. Kremerově testu, abn. spermiogramu, mohou být přítomny i u normospermika

metoda: nepřímý MAR test (*Mixed Antiglobulin Reaction*), Immunobead test

4. stanovení autoprotilátek proti spermiím v séru

indikace: případě vysoké positivity MAR testu provést stanovení hladiny protilátek v séru

metoda: ELISA, Fribergův tray- aglutinační test, nepřímý MAR test

5. stanovení funkční aktivity NK buněk

indikace: oligozoospermia

stimulace vlastními spermiemi

metoda: průtoková cytometrie

6. test inhibice migrace leukocytů pod agarózou (MIF)

indikace: oligozoospermia

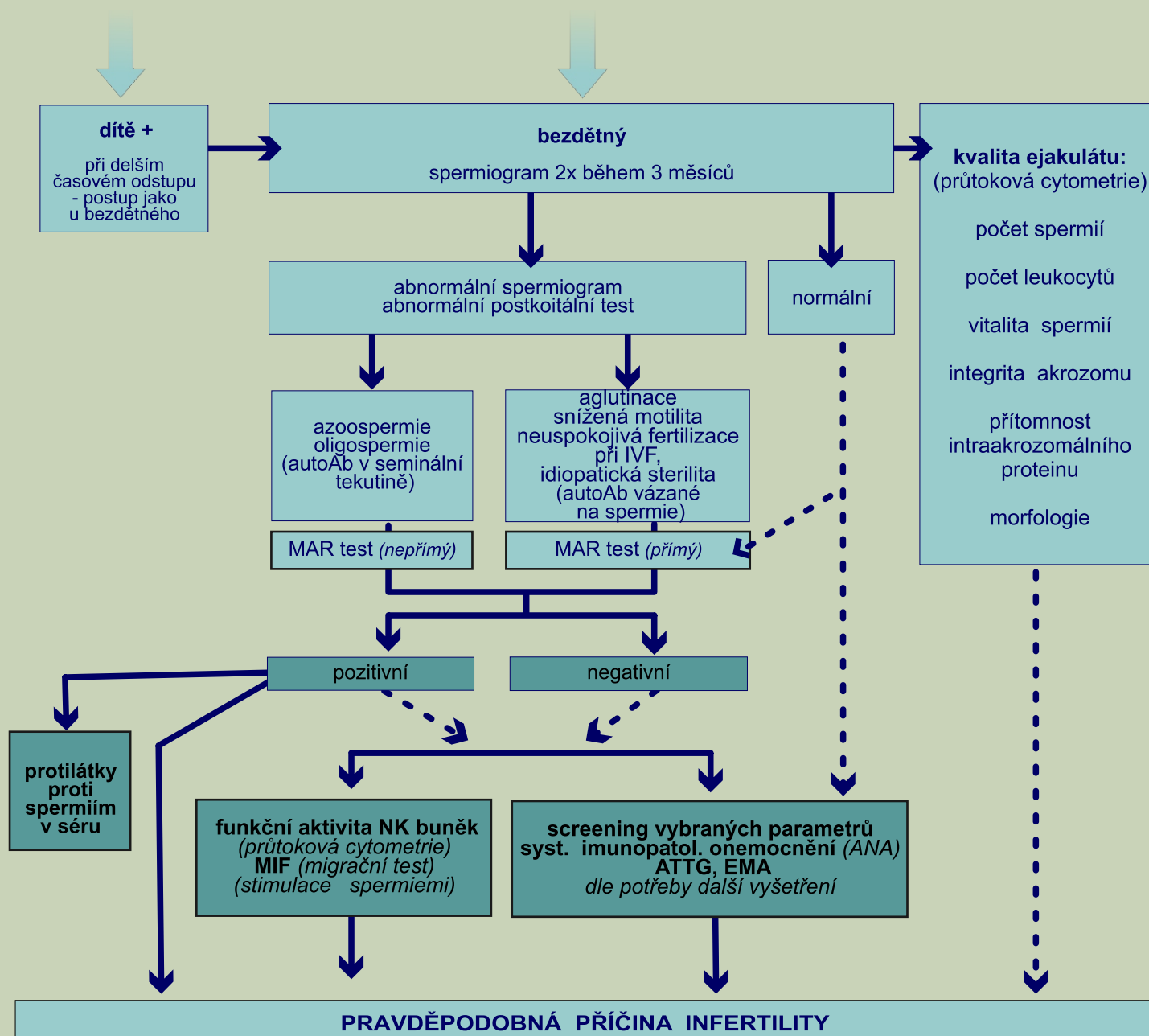
stimulace vlastními spermiemi

metoda: migrace leukocytů pod agarózou

7. screening parametrů systémového imunopatologického onemocnění

ANF

metoda: nepřímá fluorescence



ŽENA I

(primární sterilita)

metody I. volby

protilátky proti zona pellucida
protilátky proti spermiím v séru
ATG, ATPO, ATTG, endomysium
protilátky proti spermiím v cervik. hlenu

metody II. volby

funkční aktivita NK buněk
APLA, beta2GP1
ANF
protilátky proti ovariím

1. Protilátky proti zona pellucida (zařadit jako screening)

indikace: idiopatická sterilita, neuspokojivé oplození oocytů získaných po stimulaci ovarií, především po opakovaném IVF selhání

metoda: hemaglutinace, popř. ELISA

2. protilátky proti spermiím v séru

stanovení indikováno při idiopatické sterilitě, abn. postkoitálnímu testu, abn. Kremerově testu

metoda: ELISA, Fribergův tray- aglutinační test, nepřímý MAR test

3. Protilátky proti tyreoperoxidáze (ATPO), event, tyreoglobulinu (ATG)

4. Protilátky proti spermiím v cervikálním hlenu

indikace: idiopatická sterilita, abn. postkoitální test, abn. Kremerův test

metoda: nepřímý MAR test

5. Stanovení funkční aktivity NK buněk

indikace: spontánní potraty, opakované IVF neúspěchy, pozitivita APLA, endometrióza
- stimulace buňkami trofoblastu
- stimulace spermiemi

metoda: průtoková cytometrie, MIF

6. antiovariální protilátky

indikace: předčasné ovariální selhání, špatná odpověď na stimulaci gonadotropiny, idiopatická sterilita, polycystická ovária

metoda: NIF, použít speciál. FITC konjugát, vysycený antigeny opičích tkání, event. použít jako substrát krysí ovaria
hemaglutinace, ELISA

7. Screening parametrů systémového imunopatologického onemocnění

A) ANF

metoda: nepřímá fluorescence

B) protilátky proti endomysiu a tkáňové transglutamináze (ATTG)

metoda: nepřímá fluorescence, ELISA

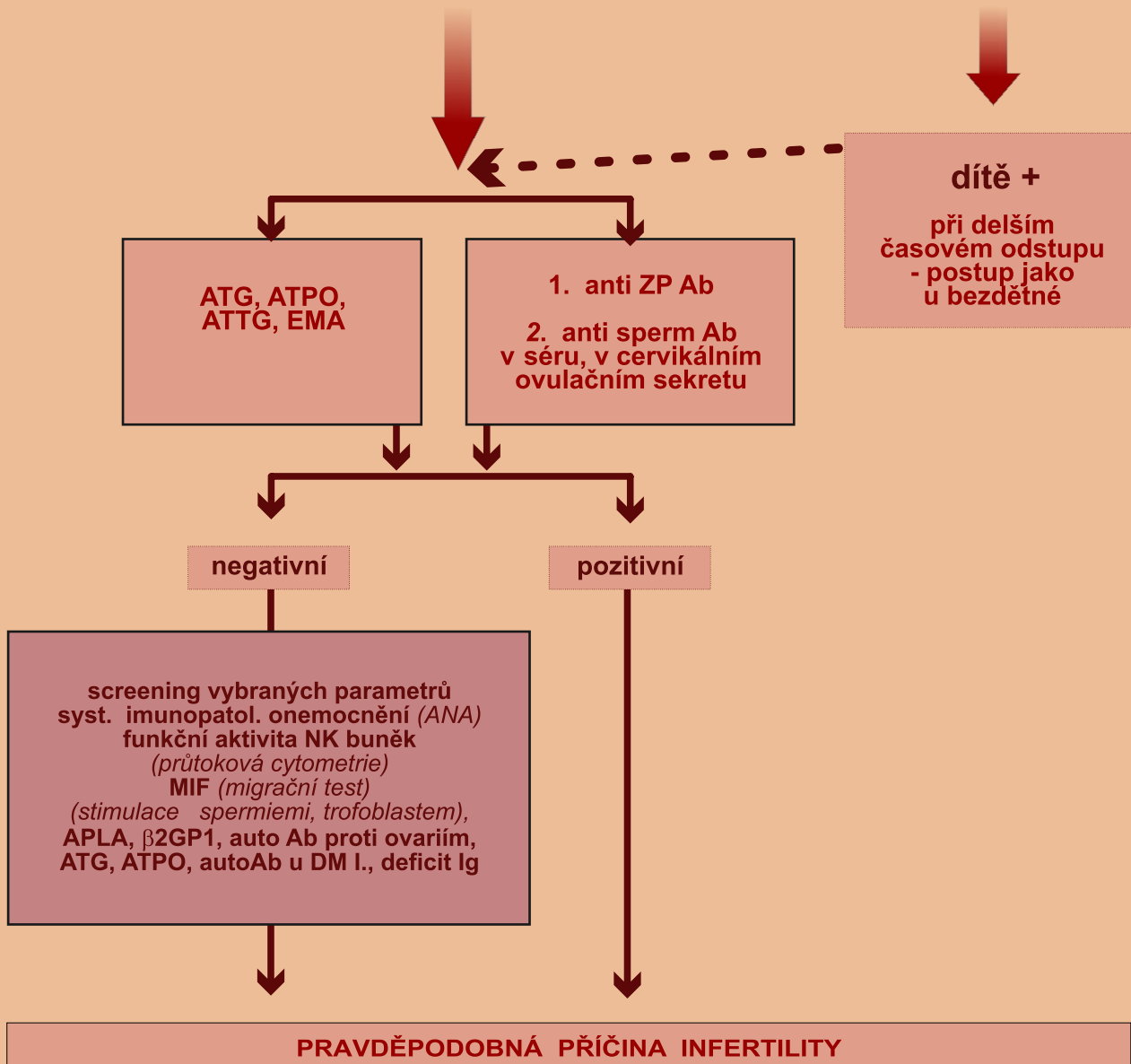
8. APLA profil IgG, IgM

(fosfatidylserin, kys. fosfatidová, fosfatidylinositol, fosfatidyletanolamin, kardiolipin + beta2GP1)

metoda: ELISA (beta2GP1 dependentní), minimální počet cílových antigenů 3

(kardiolipin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol + beta2GP1)

Pozitivní nález opakovat po cca 6 týdnech



ŽENA II

(opakované ztráty plodu)

metody I. volby

ACLA
APLA profil, annexin V
anti beta2 glykoprotein-1

metody II. volby

anti protrombin
funkční aktivita NK buněk
ATTG, endomysium
ANF
ATG, ATPO
imunofenotypizace

indikace: - opakované těhotenské ztráty
- předčasné porody morfologicky normálních novorozenců
před 34. týdnem těhotenství z důvodu eklampsie nebo závažné
preeklampsie nebo placentární insuficience

1. Protilátky proti kardiolipinu (ACLA) IgG, IgM

metoda: ELISA (*beta2GP1 dependentní*), kalibrace na Harrisovy standardy
Pozitivní nález opakovat po cca 6 týdnech

2. Protilátky proti $\beta 2$ glykoproteinu-1 IgG, IgM

metoda: ELISA
Pozitivní nález opakovat po cca 6 týdnech

3. APLA profil IgG, IgM (*fosfatidylserin, kys. fosfatidová, fosfatidylinositol, fosfatidyletanolamin, kardiolipin + beta2GP1*)

metoda: ELISA (*beta2GP1 dependentní*)
Pozitivní nález opakovat po cca 6 týdnech

4. stanovení Ab proti annexinu V IgG, IgM

metoda: ELISA

5. stanovení Ab proti protrombinu IgG, IgM

metoda: ELISA

6. funkční aktivita NK buněk

metoda: průtoková cytometrie, MIF
-stimulace buňkami trofoblastu
-stimulace spermiemi

7. stanovení parametrů systémového imunopatologického onemocnění

ANF
metoda: nepřímá fluorescence

8. protilátky proti endomysiu a tkáňové transglutamináze (ATTG)

metoda: nepřímá fluorescence, ELISA

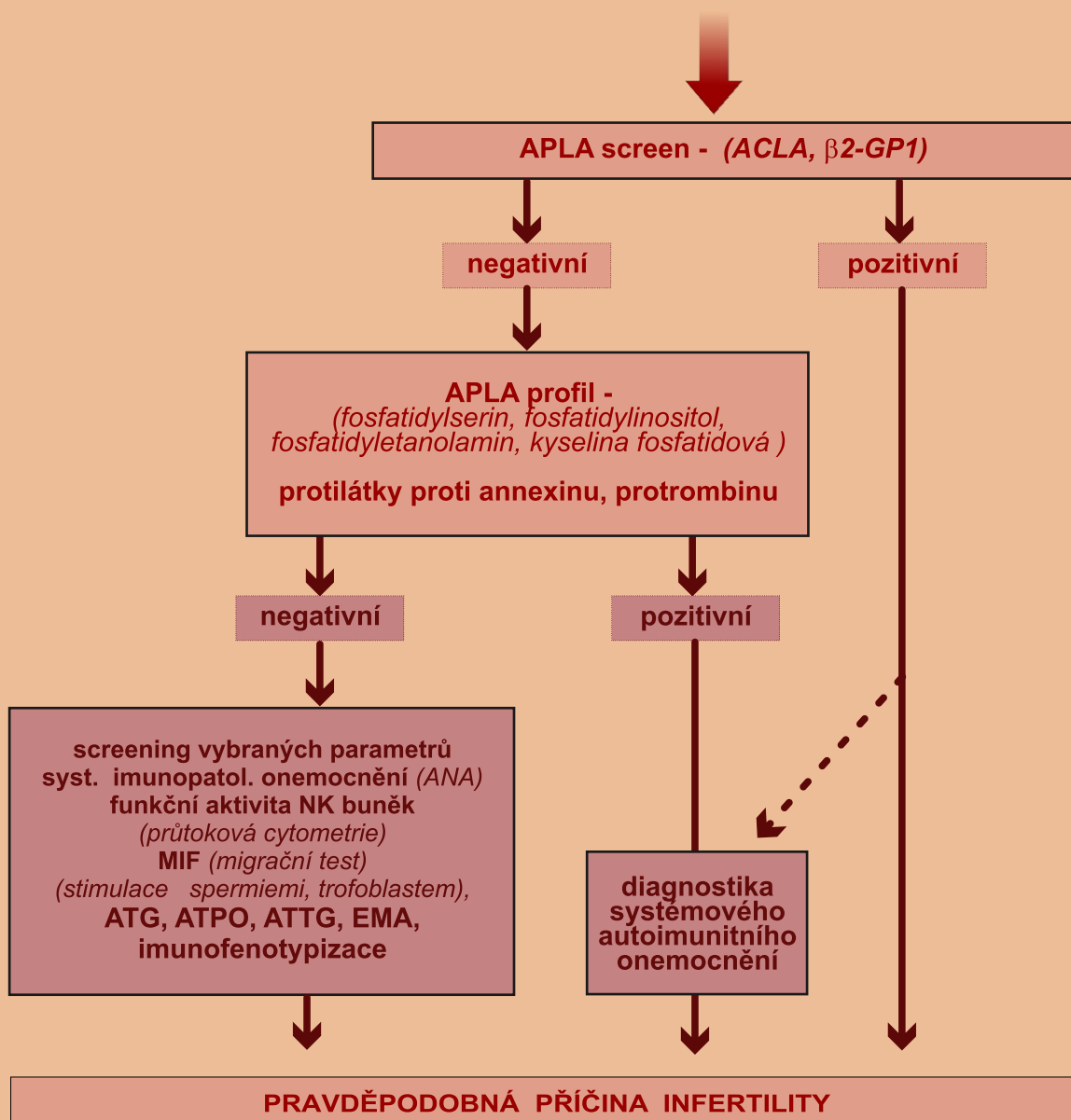
9. Protilátky proti tyreoperoxidáze (ATPO), event, tyreoglobulinu (ATG)

10. imunofenotypizace lymfocytů periferní krve v indikovaných případech

metoda: průtoková cytometrie

11. Další možné (doplňkové) testy

- stanovení embryocytotoxických cytokinů
- vyšetření folikulární tekutiny
- vyšetření peritoneální tekutiny (*např. protilátky proti lamininu*)
- stanovení produkce cytokinů po stimulaci antigeny spermií a trofoblastu



Kontrola kvality:

IQA

Nejsou až na výjimky k dispozici referenční séra, laboratoř musí mít své interní kontroly, které zařazuje do každé série vyšetření. Je vhodné zařadit kontrolu „negativní“ (*s nízkou hladinou protilátek*) a „pozitivní“ (*s vysokou hladinou protilátek*).

EQA

Až na výjimky (APLA, ATG + ATPO, ATTG, EMA, ANA) není pro ostatní parametry k dispozici. Jednou z možností je pravidelná mezilaboratorní kontrola (výměna vzorků) mezi laboratořemi po vzájemné dohodě.

Kvalita diagnostických souprav je velmi rozdílná. Nutno vyzkoušet a konzultovat!

Použitá literatura

- 1.Alexander R, Mestecky J. Neutralizing antibodies in mucosal secretions: IgG or IgA Curr HIV Res. 2007 Nov;5(6):588-93
- 2.Boffa MC, Lachassinne E. Infant perinatal thrombosis and antiphospholipid antibodies: a review. Lupus. 2007;16(8):634-41.
- 3.Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, Thompson EJ, Beaman KD. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. Am J Reprod Immunol 1995;33:40-46.
- 4Coulam CB. The role of antiphospholipid antibodies in reproduction: questions answered and raised at the 18th annual meeting of the American Society of Reproductive Immunology. Am J Reprod Immunol 1999; 41:1-4.
- 5Donat H. Sperm antigens and sperm antibodies Zentralbl Gynakol. 1985; 107(23):1401-8
- 6.Drahošová M., Madar J., Janatková I., Lochman I. Diagnostic of infertility algorithm of immunological laboratory testing. 13th Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, May 2007. Abstract book p. 35
- 7.Drudy, L., McCaffrey M., Mallon E., Harrison R., Spermatozoal DNA flow cytometry and recurrent miscarriage. Arch Androl, 1996. 37(3): p. 143-7.
- 8.Galli M, Barbui T. Antiphospholipid antibodies and pregnancy. Best Pract Res Clin Haematol. 2003 Jun;16(2):211-25
- 9.Galli M.Improving management of pregnancy in antiphospholipid antibody-positive women. J Rheumatol. 2006 Nov;33(11):2108-9
- 10.Glinoer D, Soto, MF Bourdaux P, Lejeune B, Delange F, Lemone M, Kinthaert J, Robyn C, Grun JP, DeNayer P. Pregnancy in patients with mild thyroid antibodies: maternal and neonatal repercussions. J Clin Endocrinol Metab 1991;73:421-427.
- 11.Gruberová J, Biková S, Ulcová-Gallová Z, Reischig J, Rokyta Z. Ovulatory mucus and its pH, arborization and spermagglutination antibodies in women with fertility disorder. Ceska Gynekol. 2006 Jan;71(1):36-40
- 12.Gruberová J, Ulcová-Gallová Z, Bibková K, Micanová Z, Králíková M, Novotný Z, Rokyta Z.Are the antibodies against laminin-1 the significant marker of decreased fertility in women? Ceska Gynekol. 2007 Aug;72(4):284-6
- 13.Chaouat G, Dubanchet S, Ledée N. Cytokines: Important for implantation? J Assist Reprod Genet. 2007 Nov;24(11):491-505. Epub 2007 Nov 28.
- 14.Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? Semin Immunopathol. 2007 Jun;29(2):95-113
- 15.Chládek D. , Pěkníková J. , Čapková J. , Geussová G. , Teplá O. , Madar J.: Využití monoklonálních protilátek proti proteinům lidských spermií k diagnostice patologie spermií a výběru vhodné metody fertilizace v asistované reprodukci Čes. Gynek. 65, 2000, č. 1 s. 28 - 32
- 16.Jonáková V, Manásková P, Kraus M, Liberda J, Tichá M. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. Mol Reprod Dev. 2000 Jun;56(2 Suppl):275-7.
- 17.Krizanovská K, Ulcová-Gallová Z, Bouse V, Svábek L, Rokyta P, Suchá R, Rokyta Z. Analysis of the zona pellucida in human oocytes and embryos in an assisted reproduction program] Ceska Gynekol. 2002 Jul;67(4):197-202.
- 18.Kwak JYH, Kwak FMY, Ainbinder SW, Ruiz AM, Beer AE. Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively down regulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions. Am J Reprod Immunol 1996;35:363-69.
- 19.Lédée N, Dubanchet S, Oger P, Meynant C, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G. Uterine receptivity and cytokines: new concepts and new applications. Gynecol Obstet Invest. 2007;64(3):138-43.
- 20.Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, Frankenne F, Foidart JM, Maggi E, Romagnani S, Ville Y, Piccinni MP. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. Hum Reprod. 2008 May 24.
- 21.Luborsky JL, Vinsintin I, Boyers S, Asari T, Caldwell B, DeCherney A. Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure. J Clin Endocrinol Metab 1990;70:69-75.
- 22.Madar J., Urbánek V., Chaloupková A., Nouza K., Kinský R: Role protilátkové a buněčné autoimunity proti spermiím v patogenezi mužské neplodnosti. Čes. Gynek., 67, 2002, No. 1, p. 3-7
- 23.Mardesic T, Ulcova-Gallova Z, Huttelova R, Muller P, Voboril J, Mikova M, Hulvert J. The influence of different types of antibodies on in vitro fertilization results. Am J Reprod Immunol. 2000 Jan;43(1):1-5.
- 24.Meroni PL, Gerosa M, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO. Updating on the pathogenic mechanisms of the antiphospholipid antibodies-associated pregnancy loss. Clin Rev Allergy Immunol. 2008 Jun;34(3):332-7.

25. Mestecky J, Moldoveanu Z, Elson CO. Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens. *Vaccine*. 2005 Mar 7;23(15):1800-3
26. Mestecky J, Russell MW. Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Apr;27(4):351-5.
27. Mestecky et al. Mucosal Immunity of the Female Genital Tract. *J Adol Health*, 2003, 23(3):183-186
28. Mettler L, Bachmann J, Schmutzler A. High prevalence of markers for immunological disorders in IVF patients. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004 Jul;86(1):59-60
29. Nouza K., Madar J., Kučera E., Nouza M., Tolarová M., Nováková D.: Mechanismy ovlivňující implantaci embrya co je nového v posledních letech . *Čes. Gynek*. 71, 2006, č. 6 s. 489-494
30. Pavlásek J, Peknicová J, Ulcová-Gallova Z, Nováková P, Reischig J, Micanová Z, Rokyta Z. Significance of determination of intra-acrosomal proteins and sperm antibodies in human reproduction. *Ceska Gynekol*. 2004 Jul;69(4):306-11
31. Peknicova J, Chladek D, Hozak P. Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol*. 2005 Jan;53(1):42-9.
32. Purvis MT, Kaider BD, Roussev RG, Coulam CB. Antinuclear antibody prevalence in patients with reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:463.
33. Rukavina D, Gill TJ 3rd. Immunobiology and immunopathology of early pregnancy. *Early Pregnancy*. 1997 Jun;3(2):141-5
34. Rukavina D, Podack ER, Rubesa G, Spanjol-Pandelo S, Randic L. Down-regulated expression of perforin-positive/CD16+ cells in the peripheral blood lymphocytes in the first trimester of pregnancy and up-regulation at the end of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1997 Sep;38(3):189-96.
35. Shoenfeld Y, Krause I, Kvapil F, Sulkes J, Lev S, et al. Prevalence and clinical correlations of antibodies against six beta2-glycoprotein-I-related peptides in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol*. 2003 Sep;23(5):377-83.
36. Stagnaro-Green A, Roman SH, Cabin RH, El-Harazy E, Alvarez-Marfany M, Davies TF. Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid antibodies. *JAMA* 1990;264:1422-1425.
37. Subrt I, Ulcova-Gallova Z, Bibkova K, Micanova Z, Hejnalova M, Cerna M, Hradecky L, Novotny Z. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Mar;59(3):193-200.
38. Suchá R, Ulcová-Gallova Z. Follicular fluid and its properties. *Ceska Gynekol*. 2000 May;65(3):181-8
39. Szekeres-Bartho J. Regulation of NK cell cytotoxicity during pregnancy. *Reprod Biomed Online*. 2008 Feb;16(2):211-7.
40. Tegzová D., Dostál C., Andělová K., Madar J., Kovařík J., Musilová L., Průběh těhotenství u žen se systémovým lupus erythematosus nebo s antifosfolipidovým syndromem_ *Čes. Revmatol.*, 8, 2000, No. 4, p. 133-138.
41. Tepla O, Peknicova J, Koci K, Mika J, Mrazek M, Elzeinova F. Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertil Steril*. 2006 Jul;86(1):113-20
42. Ulcová-Gallova Z, Babcová K, Nováková P, Micanová Z, Rokyta Z. Antizonal antibodies in ovulatory cervical mucus and in serum of patients with fertility disorders. *Ceska Gynekol*. 2004 May;69(3):215-8
43. Ulcová-Gallova Z, Bouse V, Krizanovská K, Balvín M, Rokyta Z, Netřvalová L. Beta 2-glycoprotein I is a good indicator of certain adverse pregnancy conditions. *Int J Fertil Womens Med*. 2001 Nov-Dec;46(6):304-8.
44. Ulcová-Gallova Z, Kotál L, Mardesic T, Nový J, Turek J, Novotný Z, Bouda J. [Zona pellucida antibody detection using the passive hemagglutination reaction. II. Clinical part] *Ceska Gynekol*. 1994 Aug;59(4):183-6
45. Ulcova-Gallova Z, Krauz V, Novakova P, Milichovska L, Micanova Z, Bibkova K, Sucha R, Turek J, Balvin M, Rokyta Z. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54(2):112-7.
46. Ulcova-Gallova Z, Krauz V, Rokyta Z. Six kinds of anti-phospholipid antibodies (aPLs) in ovulatory mucus and seminal plasma from couples with repeated miscarriages. *Int J Fertil Womens Med*. 2000 Jul-Aug;45(4):292-6.
47. Ulcová-Gallova Z, Krauz V, Vozeh F, Fialová P. Zona pellucida antibodies determined by the passive hemagglutination reaction--I. Methods. *Ceska Gynekol*. 1994 Jun;59(3):127-30
48. Ulcová-Gallova Z, Mardesic T. Does in vitro fertilization (IVF) influence the levels of sperm and zona pellucida (ZP) antibodies in infertile women? *Am J Reprod Immunol*. 1996 Oct;36(4):216-9.
49. Ulcová-Gallova Z, Mukengnábl P, Hadravská S, Bibková K, Slechtová J, Kyselová V, Micanová Z, Rokyta Z. Placenta and annexin V receptors, antibodies against annexin V and against other phospholipids in patients with recurrent pregnancy loss] *Ceska Gynekol*. 2006 Dec;71(6):469-73
50. Ulcová-Gallova Z, Turek J, Bibková K, Micanová Z, Panzner P, Balvín M, Rokyta Z. Serum antibodies against annexin V and other phospholipids in women with fertility failure. *Ceska Gynekol*. 2006 May;71(3):200-3
51. Ulcova-Gallova Z. Antiphospholipid antibodies and reproductive failure. *Chem Immunol Allergy*. 2005;88:139-49
52. Ulcová-Gallova Z. Mixed antiglobulin reaction and tray agglutination test for detection of sperm antibodies. *Int J Fertil Menopausal Stud*. 1994;39(3):185-91.
53. Ulčová-Gallova Z. Imunologie v reprodukční medicíně. *ZDN* 28.3.2001
54. Ulčová-Gallova Z. Neplodnost-útok imunity, Grada 2006, 1-140
55. Vancíková Z, Chlumecký V, Sokol D, Horáková D, Hamsíková E, et al. The serologic screening for celiac disease in the general population (blood donors) and in some high-risk groups of adults (patients with autoimmune diseases, osteoporosis and infertility) in the Czech republic. *Folia Microbiol (Praha)*. 2002;47(6):753-8.
56. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev*. 2005;206:64-69
57. World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 128