

L'Endocrinologia e la Patologia Clinica: dialogo continuo dalla diagnosi alla terapia

Sabato 22 febbraio 2020

Aula Magna Nuovo Arcispedale S. Anna
Cona, Ferrara

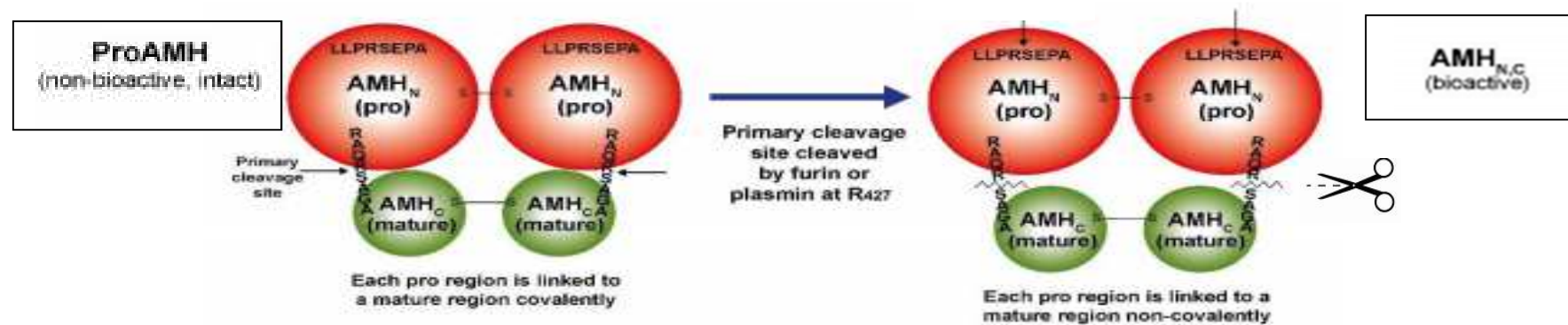


Ormone anti-Mülleriano

Michela Boni
Laboratorio Unico Provinciale, Ferrara

Francesco Capodanno
Laboratorio del Centro di Fisiopatologia della Riproduzione Umana,
Lagosanto

L'AMH è una glicoproteina omodimerica di 140kDa, costituita da due monomeri uniti da ponti disolfuro, appartenente alla superfamiglia dei TGF β

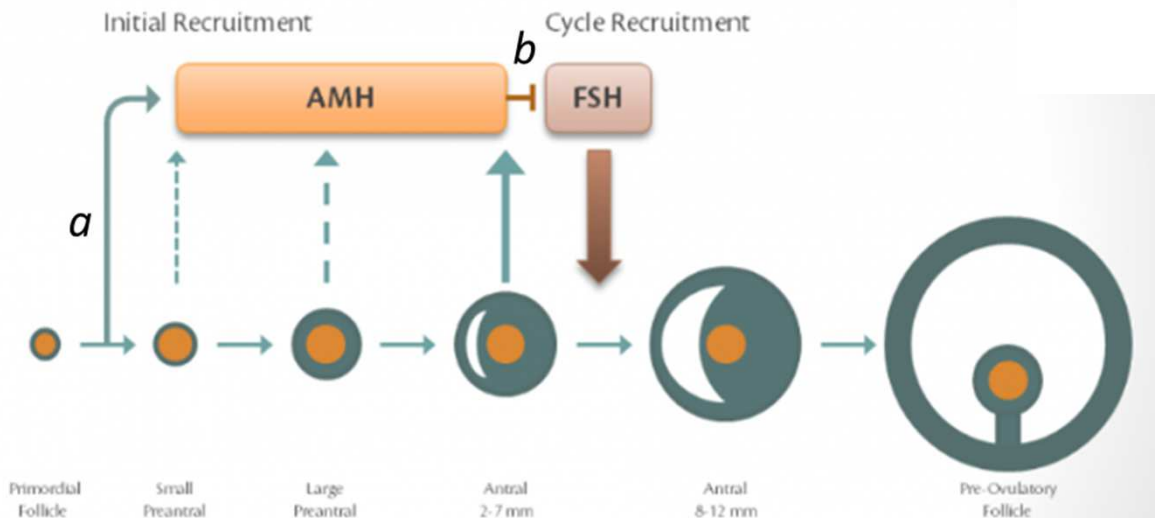


ProAMH and AMH_{N,C} occur in approximately equal amounts in human peripheral blood (3).

♂ Prodotto nelle **cellule del Sertoli** E' responsabile della regressione dei dotti di Müller all'inizio della vita fetale. Concentrazioni stabili ed elevate durante l'infanzia fino alla pre-pubertà, in progressivo decremento con lo sviluppo puberale.

♀ L'assenza di AMH nelle prime fasi della vita fetale, consente lo sviluppo dei dotti di Müller che si differenziano nei futuri organi riproduttivi femminili.

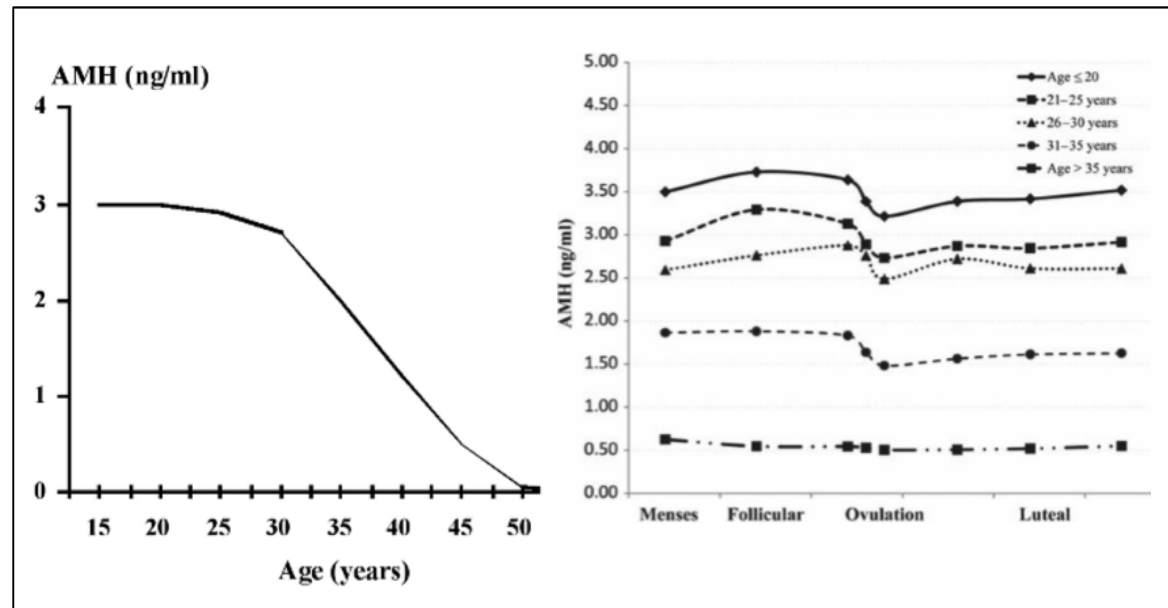
- Prodotto dalle **cellule della granulosa** dei follicoli primari, pre-antrali e antrali
- Ruolo inibitorio sul passaggio dei follicoli dalla fase primordiale a quella pre-antrale (*reclutamento primario - a*)
- Riduce la sensibilità dei follicoli all'FSH, fino alla selezione del follicolo dominante (*reclutamento ciclico - b*)



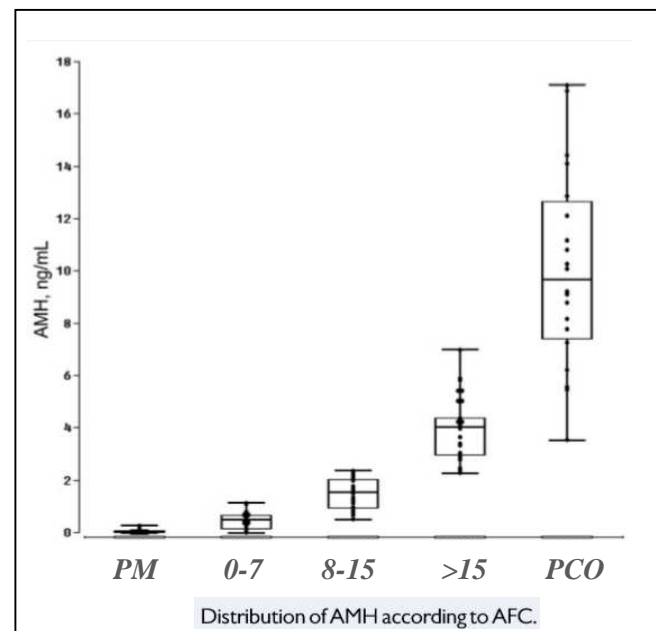
I livelli di AMH

▪ ↓↓ nascita - ↑ dopo pubertà,
↓ progressivamente fino a risultare
indossabili in menopausa

▪ Mostrano elevata variabilità inter-
individuale; variabilità intra-
individuale dipendente principalmente
da età, con variazioni minime durante
le fasi del ciclo mestruale



▪ correlano positivamente con al conta
del follicoli antrali (AFC); ↑ ovaio
policistico



Introdotta nella pratica clinica come:

**MARKER PER LA VALUTAZIONE QUANTITATIVA
DELLA RISERVA OVARICA**

- Previsione della risposta ovarica alla stimolazione con gonadotropine nell'ambito della PMA
- Inquadramento sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) e insufficienza ovarica prematura (POF)
- Valutazione del danno della riserva ovarica indotto da fonti iatrogene (radio/chemioterapia) e trattamenti chirurgici



Tabella 2- Valore diagnostico del dosaggio di AMH

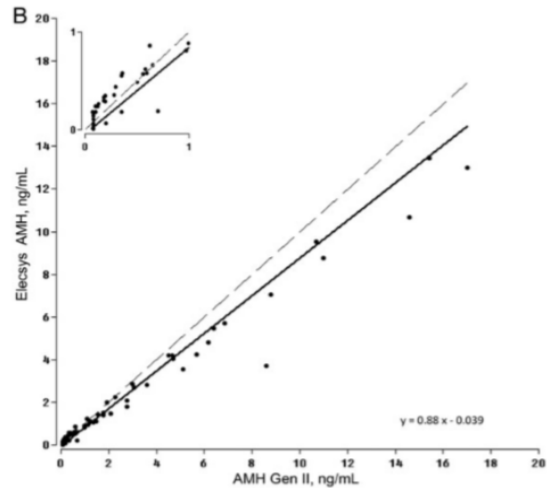
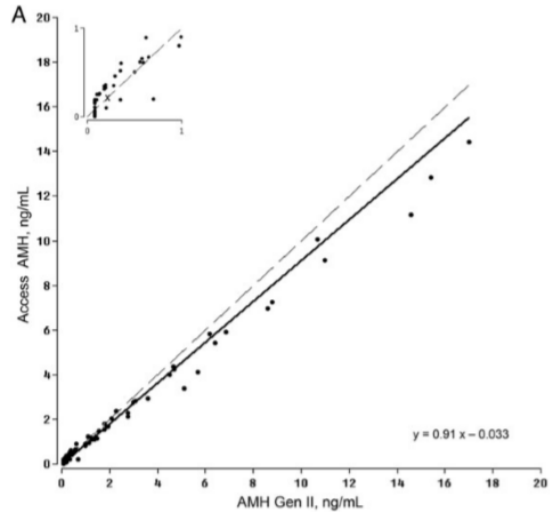
UOMO	
Condizione morbosa	AMH sierico e diagnosi differenziale
Gonade non palpabile bilateralmente	<p>ND:</p> <ul style="list-style-type: none"> Anorchia Sindrome dei dotti Mülleriani persistenti (mutazione del gene <i>AMH</i>) <p>Basso:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ipogonadismo primario Ipogonadismo centrale (Sindrome da disgenesia testicolare) <p>Normale:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sindrome dei dotti Mülleriani persistenti (mutazione dell'<i>AMHR</i>)
Micropene	<p>Basso:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ipogonadismo primario Ipogonadismo centrale <p>Normale:</p> <ul style="list-style-type: none"> Micropene malformativo
Pubertà ritardata	<p>Basso:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ipogonadismo primario Ipogonadismo centrale <p>Normale:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ritardo costituzionale di crescita e pubertà (RCCP)

Segni di pubertà precoce	<p>Basso:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pubertà precoce centrale Pubertà precoce periferica <p>Normale:</p> <ul style="list-style-type: none"> Iperplasia surrenalica congenita (ISC) Tumore surrenalico androgeno-secerne
Disordini dello sviluppo sessuale (DSD)	<p>ND:</p> <ul style="list-style-type: none"> 46,XY disgenesia gonadica completa <p>Basso:</p> <ul style="list-style-type: none"> 46, XY disgenesia gonadica parziale Sindrome di Klinefelter (47, XXY e varianti), DSD ovotesticolare <p>Normale:</p> <ul style="list-style-type: none"> Difetto di sintesi degli androgeni Sindrome da insensibilità agli androgeni 46,XY DSD malformativo 46,XX maschio (DSD testicolare)

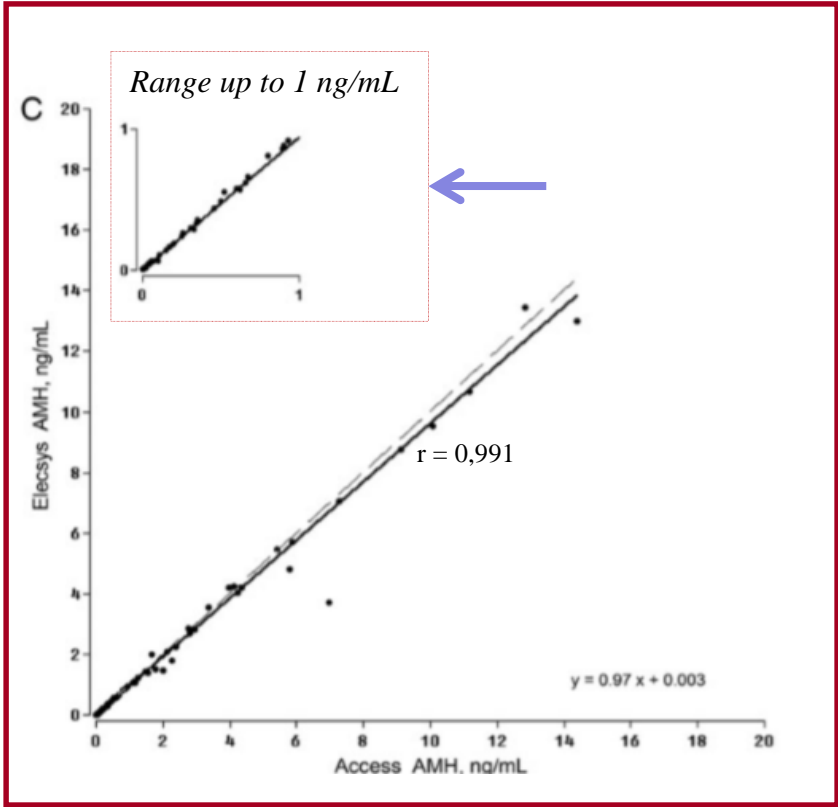
AMH: metodi di determinazione e loro evoluzione

<i>anni '90</i>	▪ <i><u>Primi metodi home-made</u>. Sensibilità inadeguata a basse concentrazioni di AMH</i>
<i>1999</i>	▪ <i><u>1° test ELISA in commercio</u>. Coppia di anticorpi monoclonali verso pro-regione e regione matura (11F8/22A2) calibrato con AMH ric. Miglioramento sensibilità (0,1 ng/ml)</i>
<i>2003</i>	▪ <i><u>2° test ELISA in commercio</u>. Coppia di anticorpi monoclonali verso pro-regione e regione matura (F2B/7A-F2B/12H): calibrato con AMH bovino. Ulteriore miglioramento sensibilità (valori di AMH ↓ rispetto al precedente)</i>
<i>2010</i>	▪ <i><u>Nuovo test ELISA</u>, combinazione due test precedenti (valori di AMH ↑ rispetto ai precedenti ELISA) – sensibilità 0,08 ng/ml</i>
<i>2013</i>	▪ <i>Introdotta versione del test modificata per eliminare interferenza da complemento</i>
<i>2012-13</i>	▪ <i>Introduzione di due nuovi test ELISA</i>
<i>2014</i>	▪ <i>Introduzione dei test in automazione</i>

Confronto test manuali vs automatizzati



Confronto test automatizzati



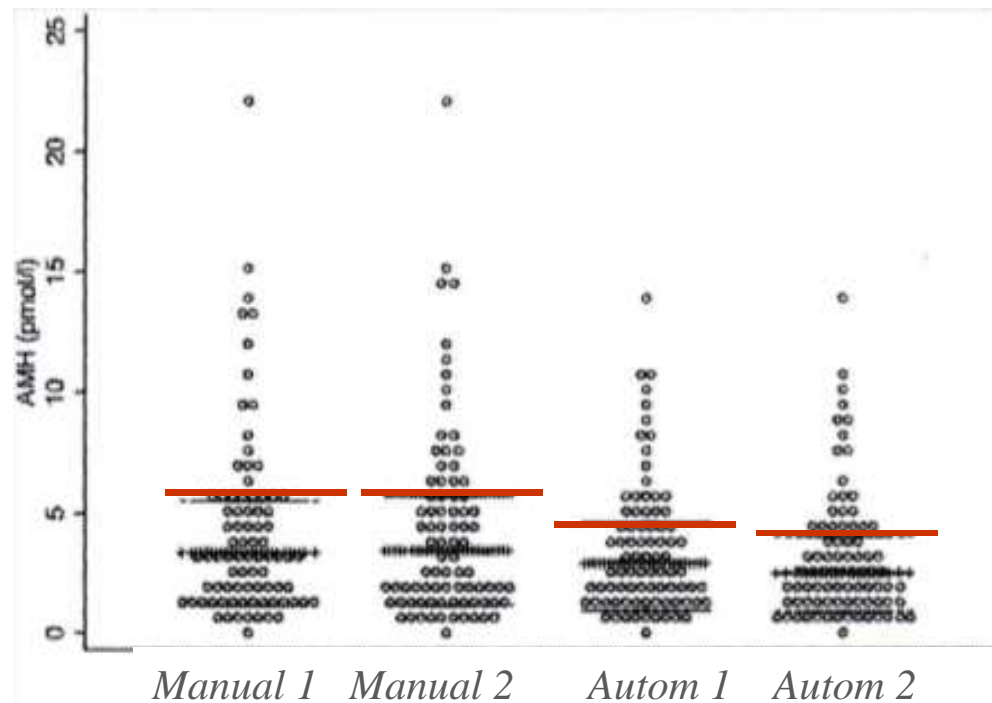
Sample	Concentration		Within-run precision				Intermediate Precision			
	Elecsys AMH		Elecsys AMH		Access AMH		Elecsys AMH		Access AMH	
	Mean, ng/ml	Mean, ng/ml	SD, ng/ml	CV, %	SD, ng/ml	CV, %	SD, ng/ml	CV, %	SD, ng/ml	CV, %
Human serum pool 1	0.108	0.112	0.002	1.8	0.004	3.6	0.007	6.5	0.012	10.7
Human serum pool 2	1.05	1.11	0.009	0.8	0.010	0.9	0.023	2.2	0.027	6.6
Human serum pool 3	2.55	2.71	0.031	1.1	0.033	1.2	0.079	3.1	0.085	4.4
Human serum pool 4	9.78	10.3	0.118	1.1	0.122	1.2	0.429	4.4	0.501	5.3
Human serum pool 5	17.5	18.5	0.257	1.4	0.268	1.4	0.644	3.7	0.688	7.5
Preci Control AMH1	1.05		0.010	1.0			0.032	3.0		
Preci Control AMH2	5.25		0.055	1.0			0.221	4.2		

[AMH] ↓ nei test automatizzati vs manuale

Two new automated, compared with two enzyme-linked immunosorbent, antimüllerian hormone assays

Scott M. Nelson, Ph.D.,^a Ewa Pastuszek, M.S.,^{b,c} Grzegorz Kloss, M.S.,^b Iwona Malinowska, M.S.,^b Joanna Liss, Ph.D.,^b Aron Lukaszuk, B.S.,^b Lukasz Plociennik, Ph.D.,^b and Krzysztof Lukaszuk, M.D., Ph.D.,^{b,c,d}

^a School of Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom; ^b NVICTA Fertility and Reproductive Center, Gdansk; ^c Department of Nursing, Medical University, Gdansk; and ^d INVICTA Fertility and Reproductive Center, Warsaw, Poland



In conclusion, we demonstrate that all 4 assays can be used clinically for ovarian response prediction

However, the values generated by these assays can be markedly different, and assay-specific interpretation is required.

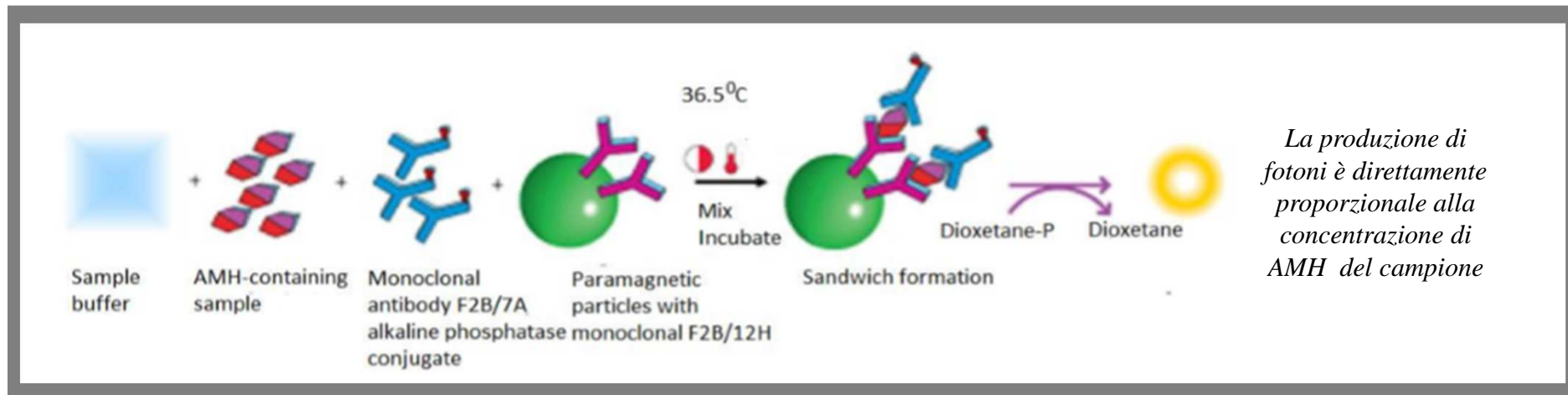
AMH: metodi di determinazione e loro evoluzione

Table I Anti-Müllerian hormone (AMH) assays characteristics.

Competitor assays						
Assay type	Manual	Manual	Manual	Manual	Automated	Automated
Imprecision	<8%	<14%	<6%	<6%	1.8–2.0%	2.87–4.34%
Sample type	Serum, plasma	Serum, plasma	Serum, plasma	Serum, plasma	Serum, Li-heparin plasma	Serum, Li-heparin plasma
Minimum sample volume	20 µl	25 µl	50 µl	100 µl	50 µl	20 µl
Incubation time	<3 h	3 h	2.5 h	4.5 h	18 min	39 min
Limit of detection (LoD)	0.08 ng/ml	0.14 ng/ml	0.023 ng/ml	0.0012 ng/ml	0.01 ng/ml	≤0.02 ng/ml
Limit of Quantification (LoQ)	0.16 ng/ml	0.35 ng/ml (Decanter et al., 2014)	0.06 ng/ml	0.0039 ng/ml	0.03 ng/ml	≤0.08 ng/ml
Measurement range	0.16–22.5 ng/ml	0.42–21.0 ng/ml	0.06–11.6 ng/ml	0.003–0.75 ng/ml	0.01–23.0 ng/ml	0.02–24.0 ng/ml

Migliori performance analitiche test automatizzati vs test manuali in termini di precisione, tempi di esecuzione, limiti di sensibilità

AMH: quale test presso il LUP



- Immunodosaggio «sandwich» a singola fase, automatizzato
- Metodo chemiluminescenza
- Coppia di anticorpi monoclonali anti-AMH (topo) diretti verso la regione (pro)AMH + AMH_{N,C}
- Calibrato con AMH ricombinante in matrice sintetica (curva a 6 punti)
- Campione: siero o plasma (litio-eparina) da conservare max 24h a Tamb, fino a 6 gg 2-8°C, oltre 6 gg a -20°C.
- Intervallo di misura: 0.02-24 ng/mL (fino a 240 ng/ml)
- LoD ≤ 0,02; LoQ = 0,08 ng/ml
- Imprecisione totale: CV ≤ 10%

	n. replicati	Range	Media	Intra-serie	
				DS	CV%
Pool 1	20	0,09-0,10	0,092	0,004	4,5
Pool 2	20	2,83-3,04	2,938	0,054	1,8

Risultati prove interne preliminari

AMH: potenziali interferenze legate al test

Sostanza	Concentrazione più alta aggiunta
Acetaminofene	20 mg/dL
Acido acetilsalicilico	65 mg/dL
Acido ascorbico	170 µmol/L
● Bilirubina (coniugata)	43 mg/dL
● Bilirubina (non coniugata)	40 mg/dL
Biotina	735 nmol/L
Gammaglobulina	60 mg/mL
● Emoglobina	300 mg/dL
Eparina (basso peso molecolare)	3.000 U/L
Ibuprofene	50 mg/dL
Multivitamine	1% (v/v)
● Intralipidi	37 mmol/L
Proteine totali (albumina sierica umana)	12 g/dL
Acido urico	1,4 mmol/L

Sostanza	Concentrazione più alta aggiunta
Inhibin A	100 ng/mL
Attivina A	16,32 µg/mL
hLH	100 mIU/mL
hFSH	115 mIU/mL
TGF β-1	65 ng/mL

Possibilità di interferenze da: anticorpi eterofili eventualmente presenti nel siero del pz, FR, fosfatasi alcalina endogena, fibrina, proteine con capacità legante la fosfatasi alcalina...

Valutare i dati di Laboratorio in stretta relazione al quadro clinico, tenendo sempre presenti eventuali fonti di interferenza

AMH: intervalli di riferimento proposti

Gruppo di riferimento adulti	Range di età (anni)	N	Mediana ng/mL (pmol/L)	Intervallo di riferimento 95% ng/mL (pmol/L)
Donne	18-25	80	3,71 (26,49)	0,96-13,34 (6,82-95,22)
Donne	26-30	82	2,27 (16,21)	0,17-7,37 (1,22-52,66)
Donne	31-35	80	1,88 (13,43)	0,07-7,35 (0,53-52,48)
Donne	36-40	80	1,62 (11,60)	0,03-7,15 (0,20-51,03)
Donne	41-45	79	0,29 (2,05)	0,00-3,27 (0,00-23,35)
Donne	≥ 46	82	0,01 (0,06)	0,00-1,15 (0,00-8,19)
Uomini	> 18	83	4,87 (34,77)	0,73-16,05 (5,20-114,60)

Gruppo di riferimento pediatrico	Intervallo di età (giorni)	N	Mediana ng/mL (pmol/L)	Intervallo di riferimento 95% ng/mL (pmol/L)
Uomini	≤ 60	55	46,94 (335,17)	15,11-266,59 (107,92-1903,49)
Donne	≤ 60	44	0,16 (1,17)	0,01-3,39 (0,04-24,19)

Gruppo di riferimento pediatrico	Fascia di età (anni)	N	Mediana ng/mL (pmol/L)	Intervallo di riferimento 95% ng/mL (pmol/L)
Maschio Stadio 1 di Tanner	8-13	39	56,58 (403,97)	4,95-144,48 (35,37-1031,59)
Maschio Stadio 2 di Tanner	8-17	40	26,55 (189,58)	5,02-140,06 (35,87-1000,03)
Maschio Stadio 3 di Tanner	10-19	40	8,64 (61,70)	2,61-75,90 (18,63-541,92)
Maschio Stadio 4 di Tanner	12-18	40	7,15 (51,02)	0,43-20,14 (3,04-143,82)
Maschio Stadio 5 di Tanner	11-19	40	7,00 (49,96)	1,95-21,20 (13,90-151,38)

AMH: il problema della standardizzazione dei metodi

Ad oggi: notevoli passi avanti sui metodi per la determinazione dell'AMH, ma diversi test, diverse unità di misura, diversi materiali utilizzati per la calibrazione

→ *criticità legate alla scarsa standardizzazione dei metodi e alla concordanza dei risultati*

J Clin Endocrinol Metab, March 2014, 99(3):723–732

The Measurement of Anti-Müllerian Hormone: A Critical Appraisal

Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response.

Hum Reprod Update. 2015; 21(6):698-710 (ISSN: 1460-2369)

Iliodromiti S; Anderson RA; Nelson SM

Hum Reprod, 2016 Dec;31(12):2796-2802. Epub 2016 Oct 4.

Comparative evaluation of three new commercial immunoassays for anti-Müllerian hormone measurement.

for AMH interpretation will be necessary. There is a clear need for an international reference standard for AMH and for robust independent evaluation of commercial assays in routine clinical samples with well-defined sample handling and processing protocols. These issues of sample instability and lack of reliable interassay comparability data should be taken into account in the interpretation of available research evidence and the application of AMH measurement in clinical practice.

national Federation of Clinical Chemistry. Given the increasing availability of a number of AMH assays and their widespread adoption into clinical practice there is an urgent need for an international human standard preparation to allow external calibration of AMH assays and standardize reporting and clinical interpretation. Figure 1 shows the Passing-Bablok

lent discrimination of PCOS from normal ovulatory controls. An international standard is urgently needed to unify the calibration across different assay platforms so as to allow clinically meaningful cut-off values to be set up for various applications.

Conclusioni

- L'introduzione di sistemi automatizzati per la determinazione quantitativa dell' AMH ha permesso di introdurre il test nella pratica clinica ed avere risultati disponibili in tempi rapidi
- L'evoluzione dei test per l'AMH ha permesso di implementare le performance analitiche, migliorando l'accuratezza diagnostica e clinica
- E' auspicabile l'adozione di uno standard internazionale per superare le criticità relative alla standardizzazione dei metodi e all'armonizzazione dei risultati per massimizzare l'utilità clinica del test



International Ref. Reagent
Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, human,
recombinant
NIBSC code: 16/190
Instructions for use
(Version 1.0, Dated 20/11/2019)

1. INTENDED USE

This reference reagent (coded 16/190) consists of a batch of lyophilized ampoules containing purified, recombinant human Mullerian Inhibiting Substance, also known as Anti-Mullerian Hormone (AMH). The preparation was established as the 1st WHO International Reference Reagent at the 70th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardisation (2019). The intended use is for the characterization of AMH assays.