بررسی قدرت تشخیصی الایزا و واکنش مختلط آنتی گلبولین در ردیابی آنتی بادیهای ضد اسپرم در سرم زوج های نابارور

عبدالرضا اسماعیل زاده*، نوید اسفندیاری**، پرویز پاکزاد***

خلاصه

سابقه و هدف: *ناباروری های ایمونولوژیک علت حدود ۲۰درصد از ناباروری ها می باشند. با توجهبه وجود روشهای مختلف جهت بررسی آنتی بادیهای ضد اسپرم، این مطالعه جهت بررسی قدرت تشخیصی دو روش ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) و واکنش مختلط آنتی گلبولین [(MAR) Mixed Antiglobulin Reaction] برای تشخیص آنتی بادی های ضد اسپرم در مراجعه کنندگان به بیمارستانهای تابع دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال۱۳۷۸ انجام شد .*

مواد و روش ها: *مطالعه از نوع مقایسه روشهای آزمایشگاهی است که بر روی ۲۰ زوج بارور و ۲۰ زوج نابارور صورت پذیرفت. افراد پس از بررسی های اولیه توسط متخصص زنان و زایمان و بررسی احتمال وجود علل ایمونولوژیک ناباروری، به طور مستمر در مطالعه وارد شدند و پس از گرفتن نمونه سرم، سطح آنتی بادی های ضد اسپرم در آنها با سه روش آگلوتیناسیون (به عنوان استاندارد)، ELISA و MAR مورد سنجش قرار گرفت و نتایج به شکل تعیین حساسیت و ویژگی و استفاده از آزمونهای آماری X^2 و دقیق فیشر ارزیابی شدند.*

یافته ها: *نتایج حاصل از بررسی ۷۹ نفر نشان داد که فراوانی آنتی بادیهای ضد اسپرم در افراد نابارور ۵/۲ برابر افراد بارور است ($P<0/005$) . نتایج مثبت در زنان ۲/۵ برابر مردان می باشد . سن و مصرف سیگار رابطه ای با مثبت شدن آنتی بادی ضد اسپرم ندارند . ویژگی ، حساسیت ، قدرت پیشگویی مثبت (PPV) و قدرت پیشگویی منفی (NPV) برای آزمون MAR به ترتیب ۹۸درصد ، ۱٦درصد، ۸٦ درصد ، ۵۷ درصد و برای ELISA به ترتیب ۸۸ درصد ، ۱۳/۵ درصد، ۵۰ درصد و ٥٤ درصد است. IgA در هیچ یک از سرمها یافت نشد.*

نتیجه گیری و توصیه ها : *روشهای MAR و ELISA دارای حساسیت کم ولی ویژگی مناسب برای تشخیص آنتی بادیهای ضد اسپرم هستند. استفاده از ELISA به دلیل گرانی و نتایج مثبت و منفی کاذب توصیه نمی شود . MAR می تواند ایزوتیپ آنتی بادی ضد اسپرم را تعیین کند و به کارگیری چند روش باهم به تشخیص کمک می کند. انجام تحقیق با حجم نمونه بیشتر را توصیه می نماید .*

واژگان کلیدی : آنتی بادی های ضد اسپرم ، ELISA ، ناباروری، واکنش مختلط آنتی گلبولین

مقدمه

ناباروری یکی از معضلات جوامع بشری است و به عنوان یک مشکل فردی و اجتماعی مهم برای زوجهای نابارور به شمار می آید به طوری که ۱۵ـ۱۰ درصد زوج ها ازاین مساله رنج می برند (۱). نا بارروری های ایمونولوژیک یکی از شایعترین و مهمترین اختلالات دستگاه تناسلی

* عضو هیات علمی گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

** استادیار گروه ایمونولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** استاد گروه ایمونولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

محسوب می شوند و حدود ۲۰ درصد ناباروری ها به دلایل ایمونولوژیک است (۱). ناباروری دلایل مختلفی دارد، از مهمترین علل ناباروری در مردان می توان به اختلال در اسپرماتوژنز و قدرت باروری اسپرم و در زنان به اختلال در تخمک گذاری، انسداد لوله فالوپ، ناهنجاریهای ساختمان یا عملکرد سرویکس و رحم اشاره کرد. در این میان حضور آنتی بادیهای ضد اسپرم در سرم و ترشحات دستگاه تناسلی هر دو جنس از علل اصلی ناباروری ایمونولوژیک محسوب می شوند (۲)، به گونه ای که بسیاری از محققان معتقدند که ۳۶ـ۵ درصد ناباروریها به دلیل وجود آنتی بادیهای ضد اسپرم است (۱،۳،٤،۵). در حال حاضر برای شناسایی و ردیابی آنتی بادیهای ضد اسپرم از روش هایMAR، ELISA، آگلوتیناسیون، بیحرکت سازی، ایمونوبید، ایمونوفلورسانس، رادیوایمونواسی (RIA) و Spermcheck استفاده می شود که هر یک به نوبه خود دارای معایب و مزایایی است. روش آگلوتیناسیون از روشهای رایج و قدیمی موجود برای بررسی وجود آنتی بادیهای ضد اسپرم بوده و هست . از آنجایی که از زمان مشخص شدن علل ایمونولوژیک به عنوان علل ناباروری مدت زیادی نمی گذرد ، از این رو ، اطلاع از مزایا و معایب روشهای رایج آزمایشگاهی در تشخیص کمک کننده خواهد بود. در این مطالعه در نظر است قدرت تشخیصی روشهای MAR و ELISA در مقایسه با روش آگلوتیناسیون بر روی سرم زوج های نابارور و بارور (شاهد) مراجعه کننده به مراکز آموزشی و درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی در سال ۱۳۷۸ صورت گیرد.

مواد و روشها

این مطالعه که از نوع مقایسه روشهای آزمایشگاهی است بر روی ۲۰ زوج نابارور و ۲۰ زوج بارور انجام گرفت. بررسی و مطالعات بالینی اولیه توسط متخصص زنان یا اورولوژی صورت پذیرفت و افرادی که احتمال حضور عامل ایمونولوژیک مربوط به آنتی بادی های ضداسپرم را داشتند با سه روش آگلوتیناسیون لوله ای – اسلایدی؛ (TSAT) ، IgA MAR، IgG MAR؛ غیر مستقیم و ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به برخی متغیرهای زمینه ای و مداخله گر همچون سن ، مصرف سیگار، مصرف داروها جمع آوری و در دو گروه مشابه سازی شد. از هر بیمار ۱۰–۵ سی سی خون وریدی گرفته شد و بعد از ۳۰–۱۵ دقیقه سرم خون با سانتریفوژ کردن جدا و در سه میکروتیوب جداگانه در فریزر منهای ۷۲ درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش فریز شد. برای ارزیابی وجود آنتی بادی ضد اسپرم در سرم، سلولهای اسپرم به عنوان آنتی ژن به کار می رود. نمونه مایع منی متعاقب ۵–۳ روز پرهیز از نزدیکی، در ظرف دهان گشاد تمیز و استریل جمع آوری شد. دهنده های مایع منی افراد سالم و باروری بودند که مشکل باروری نداشتند. اسپرموگرام و ارزیابی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه ها نیم تا یکساعت پس از تهیه نمونه به عمل آمد. مطابق استاندارد سازمان جهانی بهداشت نمونه های طبیعی، به عنوان منبع آنتی ژن سلولی در مطالعه وارد شدند. جهت اطمینان از عدم وجود آنتی بادی ضد اسپرم بر روی مایع منی تازه ، Direct Sperm MAR انجام گرفت . برای اطمینان از ذخیره آنتی ژنهای اسپرم، مخلوطی از نمونه ۳ فرد مختلف استفاده گردید. بعد از ارزیابی های کمی و کیفی اولیه نمونه های مایع منی به طریقه Swim up با استفاده از محیط کشت Ham's F-10 شسته شده سپس، سلولهای سالم و متحرک جداشده و با محیط کشت در غلظت بین ۱۰×٤۰ اسپرم در هر میلی لیتر تا ۱۰×۵۰ اسپرم در هر میلی لیتر تنظیم گردید. در روش Swim up لکوسیت ها، اسپرم های مرده و ترکیبات مختلف مایع منی حذف می گردد.تمام مراحل تهیه و فرآوری سلولهای اسپرم در شرایط استریل و در انکوباتور

Co_2 ۵ درصد و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد صورت پذیرفت. محیط کشت Ham's F-10 به صورت پودر بوده و با فرمولاسیون خاص در شرایط استریل و در زیر هود با استفاده از لوازم استریل تهیه گردید. pH نهایی محیط ۷/۵-۷/۲ ، اسمولاریته محلول ۲۸۵-۲۸۳ و پس از تنظیم نهایی با فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شد. محیط قبل از استفاده برای تنظیم کردن در انکوباتور Co_2 ۵ درصد در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

برای انجام ELISA آنتی ژنهای سطحی اسپرم های جمع آوری شده بعد از تهیه در داخل چاهکهای پلیت ELISA چسبانده (Coating) گردیدند. سرم انسانی را با محلول بافر رقیق کننده به نسبت ۱/۵۰ رقیق کرده و به میکروپلیت اضافه و دوباره انکوبه گردیدند. اگر سرم انسانی حاوی آنتی بادی ضد اسپرم باشد، این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای سطحی بی حرکت ته پلیت متصل می شوند. آنتی بادیهای اتصال یافته از طریق انکوباسیون با آنتی هیومن انسانی کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز (آنتی هیومن علیه IgA, IgM, IgG انسانی) بررسی می شوند. واکنش آنزیماتیک پراکسیداز با سوبسترای تترا متیلن بنزیدین (TMB) منجر به تولید رنگ می شود که جذب محصول رنگی در طول موج ۴۵۰ نانومتر تشخیص داده می شود. نمونه های مثبت و استانداردها به رنگ زرد درمی آیند. جذب نمونه ها با قرار دادن و تنظیم دستگاه خوانش الیزا (ELISA – reader) در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل هوا (طول موج بین ۶۰۰ الی ۶۵۵ نانومتر) محاسبه می گردد. غلظت آنتی بادی ضد اسپرم با نرم افزار تعبیه شده در دستگاه به طور مستقیم ارزیابی شد.

جوابهای مساوی یا بیشتر از ۷۵ واحد در هر میلی لیتر مثبت قلمداد می گردید . در روش آزمایشگاهی (TSAT) Tube Slide Agglutination Test آگلوتیناسیون اسپرم با آنتی بادی ضد اسپرم موجود در سرم در زیر میکروسکوپ ملاحظه می شود. رقت سرم از ۱/۴ شروع می شود. این آزمون زمانی مثبت تلقی می شود که ۱۰ درصد اسپرمهای موجود به صورت توده آگلوتیناسیون درآیند (۶) .

روش IgG sperm MAR غیر مستقیم برای تشخیص آنتی بادیهای موجود در مایعات و ترشحات بدن ، مایع منی، پلاسما، مخاط سرویکس و سرم استفاده می شود. در این روش، مشاهده ۴۰ درصد یا بیشتر واکنش بین اسپرم های متحرک و ذرات لاتکس پوشیده از آنتی بادی، مثبت گزارش می شود. روش sperm MAR IgA غیر مستقیم برای جستجوی IgA موجود در ترشحات بدن به کار می رود .در این آزمایش اتصال ۱۰ درصد یا بیشتر از اسپرمهای متحرک به ذرات لاتکس مثبت تلقی گردیده و احتمال ناباروری ایمونولوژیک را مطرح می سازد.

مواد و معرفهای MAR از شرکت Fertipro N.V. بلژیک، مواد و معرفهای ELISA از شرکت بیوتکنولوژی Seratec آلمان، پودر محیط کشت Ham'SF-10 و پودر پنی سیلین G از شرکت Biochrom AG آلمان، استرپتومایسین از شرکتseromed آلمان، پودر لاکتات کلسیم و پودر بی کربنات سدیم از شرکت Merck آلمان و بافر HEPES از شرکت Gibco انگلستان برای آزمایش ها به کار رفت .

یافته ها

نتایج حاصل از آگلوتیناسیون لوله ای ـ اسلایدی اسپرم برحسب وضعیت باروری افراد مورد مطالعه نشان داد که نسبت نتیجه مثبت در افراد نابارور ۵/۲ برابر افراد بارور است ($P<0/005$) (جدول ۱). یافته های تحقیق نشان می دهد که آزمون TSAT با تیتر ۱/۴ فقط در ۶ مورد از ۴۰ فرد بارور مثبت شد در حالی که در ۱۸ نفر از ۳۹ فرد نابارور این آزمون با تیتر ۱/۴ مثبت شد . با ادامه تیتر در حالی که هیچ کدام از افراد بارور در تیترهای بالاتر مثبت نشدند، به ترتیب ۳، ۷ و ۳ نفر از افراد نابارور در تیترهای ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ نیز مثبت شدند. از نظر تعیین محل اتصال

آنتی بادی به غشاء اسپرم در افراد بارور از ٦ مورد مثبت به روش TSAT ، ٥ نفر به صورت H–H (Head to Head) و یک نفر به حالت مرکب Mix (اتصال به همه قسمتهای سلول های اسپرم اعم از سر و دم و قطعه میانی بدن) مشاهده گردیده در حالی که در افراد نابارور، از ۳۱ نفر مثبت در تیترهای مختلف ، ۲۵ نفر به شکل H – H ، ٤ نفر Mix و ۲ نفر T – T(Tail to Tail) بودند . در افراد بارور هیچ کدام از افراد مثبت به روش TSAT ، آگلوتیناسیون به شکل T – T نشان ندادند.

جدول ۱ – توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه از نظر وجود آنتی بادی ضد اسپرم با آزمون آگلوتیناسیون لوله ای – اسلایدی (TSAT) بر حسب وضعیت باروری آنها

وضعیت باروری	نتایج آزمون TSAT		
	+	–	جمع
بارور	*(۱۵)٦	(۸۵) ۳٤	(۱۰۰) ٤۰
نابارور	(۸۰)۳۱	(۲۰) ۸	(۱۰۰) ۳۹
جمع	(٤۷)۳۷	(۵۳) ٤۲	(۱۰۰) ۷۹

*مقادیر داخل پرانتز بیانگر درصد است. P<۰/۰۰۵

در روش MAR غیر مستقیم (Ind MAR) نتیجه مثبت در افراد نابارور ۱۳ درصد بیشتر از افراد بارور شد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دارنبود . تمام آنتی بادیها از کلاس IgG بودند و IgA در افراد بارور و نابارور یافت نشد. یافته های حاصل از آزمایش ELISA نشان داد که نتیجه آزمایش در ۱۵/٤ درصد از افراد نابارور و در ۱۰ درصد از افراد بارور مثبت بود و این اختلاف معنی دار نبود چنانچه در جدول (۲) مشاهده می شود قدرت ELISA در تشخیص ناباروری در مقایسه با TSAT برای فراسنج های حساسیت، ویژگی، ارزش پیش بینی مثبت و منفی به ترتیب عبارت بودند از ۱۳/۵ درصد ، ۸۸ درصد ، ۵۰ درصد و ٥٤ درصد. فراسنج های مذکور برای Ind IgG MAR در مقایسه با TSAT به ترتیب عبارت است از :۱٦ درصد، ۹۸ درصد ، ۸٦ درصد و ۵۷ درصد. یافته ها نشان داد که نسبت آنتی بادی ضد اسپرم مثبت در افراد غیرسیگاری ۷/۸ درصد بیشتر از افراد سیگاری است ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود .

نتایج مثبت آنتی بادی ضد اسپرم در زنان ۲/۵ برابر مردان بود. یافته ها نشان داد که نتیجه مثبت آزمون آنتی بادی ضد اسپرم در افراد مصرف کننده داروهای کورتیکواستروییدی ۲۱ درصد بیشتر از افرادی بود که این گونه داروها را مصرف نمی کنند. ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. هم چنین نتیجه مثبت آزمون آنتی بادی ضد اسپرم در افراد جراحی شده (عمدتا لاپاراسکوپی) ۲/٦ برابر افراد جراحی نشده بود (P< ۰/ ۰۰ ۵)، هم چنین افراد مصرف کننده آنتی بیوتیک دو برابر افرادی که آنتی بیوتیک مصرف نمی کردند ، آنتی بادی ضد اسپرم مثبت داشتند (P< ۰/ ۰ ۵) .

جدول ۲ – نتایج تشخیص آنتی بادی ضد اسپرم افراد مورد مطالعه با روشهای ELISA و واکنش مختلط آنتی گلوبولین (MAR) در مقایسه با نتایج آزمون آگلوتیناسیون لوله ای ـ اسلایدی (TSAT)

TSAT	ELISA		MAR		جمع
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
مثبت	*(۱۳/۵) ۵	(۸٦/۵) ۳۲	(۱٦) ٦	(۸٤) ۳۱	(۱۰۰) ۳۷
منفی	(۱۲) ۵	(۸۸) ۳۷	(۲/۵) ۱	(۹۷/۵) ٤۱	(۱۰۰) ٤۲
جمع	(۱۲/۵) ۱۰	(۸۷/۵ ٦۹	(۹) ۷	(۹۱) ۷۲	(۱۰۰) ۷۹

*مقادیر داخل پرانتز بیانگر درصد است .

جدول۳- توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه از نظر محل اتصال آنتی بادی به اسپرم با روش آگلوتیناسیون لوله ای ـ اسلایدی (TSAT) بر حسب وضعیت باروری آنها

وضعیت باروری	محل اتصال آنتی بادی به اسپرم			جمع
	H-H**	T-T***	Mix****	
بارور	۵ (۸۳)*	–	۱(۱۷)	٦ (۱۰۰)
نابارور	۲۵ (۸۰)	۲ (۷)	٤ (۱۳)	۳۱ (۱۰۰)
جمع	۳۰ (۸۱)	۲ (۵)	۵ (۱٤)	۳۷ (۱۰۰)

*مقادیر داخل پرانتز بیانگر درصد است . ** Head to Head *** Tail to Tail

**** اتصال به همه قسمتهای سلول های اسپرم اعم از سر و دم و قطعه میانی بدن

جدول ٤ ـ توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه از نظرتیتر آنتی بادی ضداسپرم بر حسب وضعیت باروری آنها

وضعیت باروری	تیتر آنتی بادی				جمع
	۱/٤	۱/۸	۱/۱٦	۱/۳۲	
بارور	٦ (۱۰۰)*	—	—	—	٦ (۱۰۰)
نابارور	۱۸ (۵۸/۱)	۳ (۹/۷)	۷ (۲۲/۵)	۳ (۹/۷)	۳۱ (۱۰۰)
جمع	۲٤ (٦٤/۹)	۳ (۸/۱)	۷ (۱۸/۹)	۳ (۸/۱)	۳۷ (۱۰۰)

* مقادیر داخل پرانتز بیانگر درصد است. $P<0/05$

مطابق یافته های جدول (۳) مشخص می گرددکه در افراد بارور هیچ موردی پیدا نشد که در آن آنتی بادی ضد اسپرم به دم اسپرم متصل گردیده باشد. در حالی که در افراد نابارور محل اتصال آنتی بادی به سر، دم یا قطعه میانی بود و اکثر قریب به اتفاق آنتی بادی های IgG نیز به سر اسپرم اتصال پیدا کرده بودند. یافته های حاصل از جدول (۳) بیانگر معنی دار بودن تیتر ۱/٤ و به بالا در روش TSAT با استفاده از آزمون دقیق فیشر می باشد ($P<0/05$). در این مطالعه مدت ناباروری ، مدت ازدواج و سن ، تاثیری در مثبت شدن TSAT نداشت . روشهای سه گانه مذکور دوبه دو باهم از نظر قدرت تشخیصی مقایسه شد . نتایج بیانگر این است که استفاده هم زمان از چندین روش برای شناسایی افراد نابارور در مقایسه با تک تک روش ها به تنهایی، نتایج بهتری را نشان می دهد. به گونه ای که تعداد مثبت افراد نابارور باروشهای TSAT ، MAR، ELISA به ترتیب ۷۹/۵، ۱۵/٤ و ۱۵/٤ درصد است در حالی که با روش ترکیبی به ترتیب برایELISA+TSAT، ۸۲/۱ درصد و برای ELISA و MAR، ۳۰/۸ درصد است.

بحث

نتایج مطالعه نشان داد که روشهای ELISA و MAR دارای حساسیت کم ولی ویژگی مناسب برای تشخیص آنتی بادی ضد اسپرم هستند . مصرف سیگار، مصرف داروهایکورتیکواستروییدی ، مدت ازدواج ، مدت ناباروری و سن افراد مورد مطالعه اختلاف معنی داری را در افراد آنتی بادی ضد اسپرم مثبت و منفی نشان نمی دهد ، در حالی که مصرف داروهای آنتی بیوتیک، داروهای باروری ، سابقه جراحی (مثل لاپاراسکوپی) و جنس افراد مورد مطالعه افزایش معنی داری را در افراد آنتی بادی ضد اسپرم مثبت نشان می دهد.

طبق یافته های ما تمام آنتی بادیهای ضداسپرم موجود در سرم از کلاس IgG بودو IgA در سرم هیچ یک از افراد بارور و نابارور به روش IND IgA MAR مثبت نگردید . این یافته ها با نتایج کار Moghiss و همکارانش (۷) در سال ۱۹۹۰ مبنی بر عدم یافتن IgA ضد اسپرم در سرم و وجود آن در مخاط سرویکس و مایع منی افراد مورد مطالعه مطابقت دارد. هم چنین در سال ۱۹۸۸ Carson و همکارانش (۸) طی مطالعه ای راجع به الگوی اتصال آنتی بادی در مردان و زنان نابارور در سرم ۲۱٤ نفر ، عدم وجود IgA در سرم افراد را تایید کرده است .

Clarke و همکارانش (۹) در سال۱۹۸۵طی مطالعه ای با عنوان کلاس آنتی بادیهای ضد اسپرم در سرم نشان دادند که IgA معمولا در سرم وجود ندارد و تنها در مایع منی و سطح غشای اسپرم یافت می شود ، طبق یافته های این تحقیق نتایج مثبت کاذب با روش ELISA در ۱۰ درصد موارد مشاهده گردید . نتایج مثبت کاذب در مطالعه ای که NIPو همکارانش (۱۰) در سال ۱۹۹۵ تحت عنوان اتوآنتی بادی ها و آنتی بادی های ضد اسپرم در سرم و مایع فولیکولی بیماران نابارور به روش ELISA انجام دادند نیز مشاهده گردید به گونه ای که طبق گزارش آنها در مقابل ۷۷ درصد از افراد نابارور با آنتی بادی ضد اسپرم مثبت، ۵ درصد از افراد با روش ELISA مثبت شدند . هم چنین در سال ۱۹۸۸ Saji و همکارانش (۱۱) در دانشکده پزشکی دانشگاه Osaka ژاپن و در بخش زنان و مامایی در یک بررسی بالینی کیت ELISA برای ردیابی آنتی بادیهای ضد اسپرم را بر روی ۸۳ زن نابارور و ۲۹ نفر از افراد بارور (شاهد) با دو روش ELISA و SIT (Sperm Immobilization Test) مقایسه کردند. نتایج نشان داد که ۲٤ درصد بیماران نابارور و ۱۰ درصد افراد شاهد با روشELISA مثبت شدند که با نتایج ما مطابقت دارد. در خصوص تفاوت نتایج ما با یافته های Nip (تفاوت ۵ درصدی) می توان اشاره کرد که Nip و همکارانش فقط بر روی سرم زنان کار کرده اند، در حالی که مطالعه کنونی بر روی زوج نابارور انجام گرفته است. هم چنین کیت مورد استفاده و حساسیت و ویژگی آن در دو تحقیق متفاوت می باشد . تفاوت تعداد نمونه در دو تحقیق نیز می تواند یکی دیگر از دلایل این اختلاف باشد .

Eggert و همکارانش (۱۲) در سال۱۹۹۳ طی مطالعه ای تحت عنوان آیا اندازه گیری آنتی بادی ضد اسپرم در سرم افراد نابارور با ELISA قابل توصیه است؟ با مطالعه ای که بر روی ۹۵ زوج انجام دادند، نتیجه گرفتند که ارزیابی سرم افراد نابارور به روش ELISA نتیجه معنی دار و تفاوت آشکاری در مقایسه با سرم دختران و زنان حامله نشان نمی دهد و به این جهت توصیه کردند که نباید از ELISA برای ارزیابی در سرم افراد نابارور استفاده شود که با یافته های ما هم خوانی دارد . علت ناکارآمدی ELISA می تواند مربوط به تهیه کیت و راه اندازی روش و طریقه ELISA باشد، چرا که اسپرم به وسیله متاتل یا سایر ترکیبات به ته پلیت چسبانده می شود و این کار موجب آسیب به غشای اسپرم و آشکار شدن آنتی ژنهای داخلی گردیده که موجب جوابهای مثبت یا منفی کاذب می گردد (۱۳). حساسیت ضعیف ELISA برای یافتن بیماران در تحقیق ما (۱۳/۵درصد) همراه با جوابهای غیراختصاصی و مثبت کاذب در مطالعات دیگر (۱٤) استفاده از این روش را محدودمی کند . یافته های حاصل از برخی مطالعات مانند Naz و همکارانش (۱۵)، Hill و Best(۱) و Marshburn (۳) ارتباط عفونت با افزایش آنتی بادی ضد اسپرم در سرم را نشان داده اند .

Peters و همکارانش (۱٦) در سال ۱۹۹۵ در شیکاگو در یک مطالعه آینده نگر با سه روش مختلف SI (Sperm Immobilization Test) ، SA (Sperm Agglutination Test) و IBD غیر مستقیم (Indirect Immonobead Test) میزان آنتی بادی ضد اسپرم را در ۷۹ بیمار مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج به دست آمده با یکایک روشها برای SA ، ۸٤ درصد، IBD، ٤٦ درصد و SI، ۳۳ درصد بود که نتایج SA با نتایج تحقیق

حاضر به طریق آگلوتیناسیون (۷۹/۵ درصد) همخوانی دارد هم چنین در این مطالعه با به کارگیری روشهای ترکیبی امکان و درصد افزایش موارد مثبت تایید شد به طوری که این مقدار برای روشهای ترکیب SA+IB ، SA+SI و SI+IB به ترتیب ۹۹، ۸۵ و ۵۱ درصد بود. در تحقیق حاضر نیز با کاربرد روشهای ترکیبی درصد موارد مثبت افزایش یافت به گونه ای که برای TSAT + ELISA این میزان به ۸۲/۱ درصد افزایش یافت.نتایج هر دو مطالعه بیانگر این است که جهت بالا بردن قدرت تشخیص افراد نابارور می توان از چند روش توام استفاده کرد.

Ackerman و همکارانش (۱۷) در سال ۱۹۸۸ در آمریکا با سه روش آگلوتیناسیون ، MAR , IBT غیرمستقیم نمونه سرم ۳۱ نفر را مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه تیتراگلوتیناسیون آنتی بادیهای ضداسپرم در افراد سالم و بارور(شاهد) بین صفر تا ۱/٤ بود. در این مطالعه افراد مثبت تیتری بین صفر تا ۱/٤ داشتند . مطابق آنچه گفته شد تیتر در افراد شاهد با روش آگلوتیناسیون صفر تا ۱/٤ است که بانتایج حاصل از روش آگلوتیناسیونTSAT یکی می باشد. در این مطالعه تیتر مثبت ، بالاتر از ۱/۱٦ در نظر گرفته شده ولی محققان دیگر (٦،۹،۱۸،۱۹) تیترسرمی ۱/٤ را مثبت در نظر گرفته اند و اعلام می دارند که این تیتر در افراد نابارور حایز اهمیت است و در واکنش اسپرم به تخمک می تواند اختلال ایجاد کند . هر چند با افزایش تیتر ، احتمال ناباروری به دلایل ایمونولوژیک نیز افزایش می یابد.

بر اساس یافته های این تحقیق ، به دلیل گرانی کیت ELISA و لوازم آن و نتایج مثبت کاذب ، انجام آن در نمونه سرم توصیه نمی شود. روش sperm MAR غیرمستقیم در نمونه سرم بر خلاف نمونه semen برای IgA فاقد ارزش تشخیصی است . IND IgG MAR جهت تعیین کلاس آنتی بادیهای ضداسپرم نسبت به روشهای مشابه به لحاظ کوتاهی زمان ، ساده تر بودن روش آزمایش و ویژگی بالا توصیه می گردد . روش TSAT علیرغم این که توان تعیین ایزوتیپ آنتی بادی ضد اسپرم راندانشته ولی به جهت تعیین محل اتصال آنتی بادی به سطح اسپرم ، عدم نیاز به کیت وارداتی و شناسایی تمام کلاسهای آنتی بادیهای ضداسپرم برای غربالگری آنتی بادیهای ضداسپرم در سرم زوج های نابارور بارعایت جمیع جهات توصیه می شود .

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر مهرانگیز حاتمی استادیار گروه زنان ، خانم مریم جمشیدیان و خانم زینت کمالی از کارشناسان حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر زحماتشان و همکاری در انجام این تحقیق تشکر می شود . از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر تامین هزینه تحقیق و تصویب طرح تشکر به عمل می آید .

منابع

1- Best CL , Hill JA. Immunology and unexplained infertility. ***Infertil and Reprod Med Clin of N A*** 1997; 8(4):545.

۲- اسماعیل زاده عبدالرضا .ارزیابی آزمایشهای تشخیصی آنتی بادیها ی ضد اسپرم (ASA) در ناباروریهای ایمونولوژیک .***مجله علمی ـ پژوهشی تشخیص*** ۱۳۷۹؛ شماره ۱۰ : صفحات ۵۱ ـ ٤۸.

3- Marshburn P B.Antisperm antibodies and infertility. ***Infertil and Reprod Med Clin of N A*** 1997;8(2):243-59.

4- Ohl DA ,Naz RK . Infertility due antisperm antibodies. ***Urology*** 1995; 46 (4):591-602.

5- Kunathikom S, worasatit Ch, Toongsuwan S. Relationship between the direct Mixed Antiglobulin Reaction (MAR) test in men from infertil couples. ***J Med Assoc Thai Ruaxy*** 1995; 78(2) :88-92.

6- Shulman S, Sholman JF. Sperm agglutinating activity in man and guinea pig . ***Fertil and Steril*** 1971; 22:633.

7- Moghiss KS, Thomas AY. Male infertility. ***ACOG Technical Bulten*** 1990; 142: 1-5.

8- Carson SA, Reiher J, scommegna A, prins GS. Antibody binding pattern in infertile males and Females as detected by IBD, Gel-agglutination test and sperm Immobilization test. ***Fertil and Steril*** 1988;49 :487-492.

9- Clarke GN, Stojanoff A, Cauchi MN, Johnston WIH. The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum. ***Am J Reprod Immunol Microbiol*** 1985 ;7:143-147.

10- Nip MMC,Tayor PV,Rutherford AJ, Hancock KW. Autoantibodies and antisperm antibodies in sera and follicular fluids of infertile patients:relation to reproductive outcome after in-vitro Fertilization. ***Human Reprod*** 1995; 10: 2564-9.

11- Saji F, Ohashi K, Kato M, Negoro T, Tanizawa O. Clinical evaluation of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) kit for antisperm antibodies .***Fertility and Sterility*** 1988;50(40): 644 – 47.

12- Eggert-Kruse W, Huber K,Rohr G,Runnebaum B. Determination of ASA in serum samples by means of ELISA-a procedure to be recommended during infertility investigation? ***Human Reprod*** 1993 ;8:1405-13.

13- Peters AJ , Coulam CB. Review sperm antibody. ***A J Reprod Immuno*** 1992; 27: 156-62.

14- Mazumdar S, Levine A S. Anti sperm antibodies. ***Fertil and Steril*** 1998;70(5) :799-810.

15- Naz RK , Menge AC. Role of antisperm antibodies in infertility . ***Fertil and Steril*** 1994; 67(6): 1001-13.

16- Peters AJ, Ivanovic M, Jeyendran RS. Variation in antisperm antibody results using different assays. ***A J Reprod Immunol*** 1995; 33:140-143.

17- Ackerman S, McGuire G, Fulgham DL, Alexander NJ. An evalution of a commercially available assay for the detection of antisperm antibodies. ***Fertil and Steril*** 1988; 49(4) :732.

۱۸- اسفند یاری نوید. بررسی نقش عوامل ایمونولوژیک در ناباروری با علت نامشخص. ***پایان نامه دکترای تخصصی در ایمونولوژی پزشکی***، تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۳، صفحات ۱۱۲_۱۰۵.

۱۹- اسماعیل زاده عبدالرضا. بررسی مقایسه ای روشهای تشخیص آنتی بادیهای ضداسپرم در ناباروری ایمونولوژیک. ***پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی***، تهران: دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی ،۱۳۷۸، صفحات ۱۶۳ –۱۶۰.