جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره اول – شماره ۳– پاییز ۸۶

بررسی آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم با روش فلوسیتومتری غیرمستقیم در مقایسه با آزمون واکنش آگلوتیناسیون مختلط مستقیم

فرهاد شاهسوار* دکتر عباس رضایی** دکتر محمد حسین نصر اصفهانی*** بهنام اسدی فر**** محمدرضا نصیری***** محمدجعفری***** پریوش دانش*****

* دانشجوی دکترای ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

** استاد گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*** دانشیار گروه جنین شناسی و آندرولوژی، پژوهشکده رویان

****کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

***** کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

زمینه و هدف

متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای تعیین آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم آزمون اتصال ایمونویید و واکنش آگلوتیناسیون مختلط می‌باشند. تعیین ASA با روش فلوسیتومتری اولین‌بار به‌وسیله Haas و Cunningham شرح داده شد. هر دو روش می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم انجام شوند. در این مطالعه FCM غیرمستقیم با MAR مستقیم جهت تعیین آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم مقایسه گردیده است.

روش بررسی

مایع منی مردان ۸۰ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جمع‌آوری گردید. نمونه‌های پلاسمای مایع منی با اسپرم‌دهنده ASA منفی انکوبه شدند. سپس آنتی‌بادی متصل به سطح به روش FCM غیرمستقیم با ایمونوگلوبولین ضدانسانی متصل به FITC علیه IgA و IgG مشخص‌گردید. ASAهای متصل به سطح اسپرم بیمار نیز به‌وسیله آزمون MAR مستقیم تعیین گردیدند.

یافته‌ها

روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم جهت تعیین آنتی‌بادی های ضداسپرم از کلاس IgA همبستگی نشان داد (r=۰/۵۵،P=/۰۰۶) روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم جهت تعیین آنتی‌بادی های ضداسپرم از کلاس IgG همبستگی ندارد (P=۰/۲۵، r= ۰/۲۵).

نتیجه‌گیری

تقریباً مقداری از آنتی‌بادی‌های ضداسپرم از کلاسIgG در مایع منی به اسپرم‌ها متصل می‌شوند. بنابراین آزمون‌های غیرمستقیم برای تعیین آنتی‌بادی‌های ضداسپرم پلاسمای مایع منی احتمالاً وجود این آنتی‌بادی‌ها از کلاس IgG را تشخیص نمی‌دهند، در حالی‌که ASA از کلاس IgA را تعیین می‌نمایند.

کلیدواژه ها: آنتی‌بادی ضداسپرم، آگلوتیناسیون ، فلوسیتومتری، آگلوتیناسیون اسپرم

نویسنده مسئول: دانشجوی دکترای ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

آدرس: تهران- بزرگراه شهید همت غرب بین تقاطع شیخ فضل‌اله نوری و شهید چمران، دانشگاه علوم پزشکی ایران تلفن: ۸۸۰۵۸۶۵۲

E-mail: shahsavarfarhad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱ تاریخ پذیرش:۸۶/۱۱/۲۷

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

امروزه تعیین آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم ASA یکی از مهم‌ترین مراحل ارزیابی ناباروری مردان است(۱). آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم از طریق آزمون‌های متعددی تعیین می‌شوند. اطلاعات ضد و نقیض که درباره اهمیت آنتی‌بادی ضد اسپرم در ناباروری وجود دارد ممکن است در ارتباط با مشکلات روش استفاده شده جهت بررسی ASA[1] باشد[۲،۳].

یکی از خصوصیات اصلی آنتی‌بادی ضد اسپرم که به‌طور شایع در تشخیص ناباروری ایمونولوژیک و در تحقیقات تجربی استفاده شده، وجود آن بر روی سطح اسپرم زنده می‌باشد. بیشتر مطالعات، استفاده از روش MAR[2] را برای ارزیابی وجود ASA و ایزوتیپ آن تأیید می‌نمایند[۴]. FCM[3] روش آینده‌نگر دیگری جهت تخمین کمّی ASA روی سطح اسپرم زنده می‌باشد[۵]. یکی از مزایای آزمون‌های MAR و FCM بررسیASA بر روی سطح اسپرم‌های زنده است. از این رو محدودیت آزمون‌هایی از قبیل ELISA، آنتی‌گلوبولین نشاندارشده با مواد رادیواکتیو و آنتی‌گلوبولین کونژوگه با فلورسئین که بر روی اسپرم‌های تثبیت‌شده انجام می‌شوند را ندارند. تثبیت‌کردن اسپرم ممکن است منجر به اتصال غیر اختصاصی IgG، بررسی آنتی‌ژن‌های داخل سلولی، دناتوره‌شدن آنتی‌ژن‌های اسپرم یا آسیب غشاء گشته ودر نهایت نتایج مثبت یا منفی کاذب به‌همراه داشته باشد[۵،۴].

روش‌های مستقیم تعیین ASA، آنتی‌بادی‌های متصل به اسپرم بیمار را ارزیابی می‌کنند. از آن‌جایی که این روش‌ها روی نمونه‌های مایع منی تازه انجام می‌گیرند، نتایج آن به سرعت مشخص می‌گردد. از طرفی در این روش‌ها احتمال تعیین آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی نیز وجود دارد. روش‌های غیرمستقیم تعیینASA، آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم غیراختصاصی را در سرم، پلاسمای مایع منی و سایر ترشحات دستگاه تناسلی ارزیابی می‌نمایند. تعیین آنتی‌بادی با این روش به‌دلیل نیاز به اسپرم نرمال فاقد ASA، در همان‌روز جمع‌آوری نمونه ممکن است میسر نباشد. هر چند در روش‌های غیرمستقیم ممکن است نتایج سریعاً محقق نگردد ولی ویژگی بیشتری داشته و از قاطعیت بیشتری برخوردار می‌باشند[۷،۶].

Haas و همکاران روش‌های MAR، FCM (IBT) ImmunoBinding Test را در ۳۶ بیمار(۱۸ نمونه سرم IBT مثبت و ۱۸ نمونه سرم IBT منفی) با یکدیگر مقایسه کردند. در بیماران IBT منفی، FCM و MAR نیز منفی بودند. ۷۷ درصد از بیماران با نمونه‌های سرمی IBT مثبت، به‌روش FCM نیز مثبت بودند. در مقایسه، تنها ۲۷ درصد این بیماران به روش MAR مثبت بودند. این نتایج حساس‌تربودن روش FCM را نسبت به روش MAR مطرح نمود. از این رو نتیجه گرفته شد که IBT، یک آزمون تشخیصی با حساسیت بالا می‌باشد[۸].

Rajah و همکاران در مطالعه نمونه مایع منی از ۱۰۹ مرد نابارور، ارتباط مهمی بین روش‌های IBT ، MAR و Tray Aglotination Test (TAT) یافتند. آن‌ها نتیجه گرفتند که روش MAR، باید به‌عنوان یک آزمون غربالگری استفاده شود زیرا سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر از IBT است. به‌علاوه دریافتند که اگر ابتدا ASA به‌وسیله آزمون MAR بررسی گردد، آزمون IBT می‌تواند جهت تعیین ایزوتیپ ایمونوگلوبولین استفاده شود[۹]. Andreou و همکاران طی مطالعه دیگری این موضوع را تأیید کرده و نتیجه گرفتند که آزمون MAR برای ارزیابی IgG و IgA حساس و اختصاصی بوده و آسان‌تر و دقیق‌تر از IBT است[۱۰].

با توجه به این که در اکثر مطالعات از روش‌های مستقیم جهت تعیین ASA استفاده نموده‌اند، در این مطالعه از روش FCM غیرمستقیم جهت تعیین ASA استفاده شد و در ادامه نتایج آن با نتایج روش MAR مستقیم در تعیین ASA از کلاسIgA و IgG مقایسه گردید.

روش بررسی

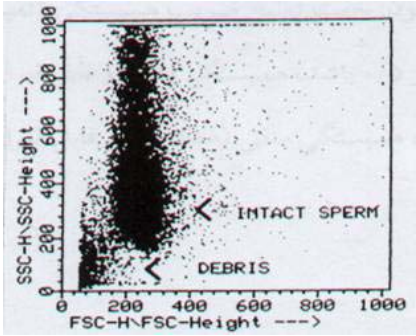
افراد مورد مطالعه ۸۰ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان بودند که در فاصله زمانی مهرماه ۱۳۸۰ تا فروردین ۱۳۸۱ پس از کسب رضایت شفاهی مورد بررسی قرار گرفتند. مردان شرکت‌کننده در این مطالعه در طیف سنی ۲۹ تا ۴۰ سال قرار داشتند و نمونه

[1]. Antisperm Antibody
[2]. Mixed agglutination Reaction
[3]. Flowcytometry

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مایع منی آنان بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) از نظر تعداد، حرکت و مرفولوژی اسپرم طبیعی بود. جهت انجام آزمایش حداقل ۲۰۰ میکرولیتر مایع منی در یک لوله اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از برداشتن مایع رویی جهت غیرفعال نمودن سیستم کمپلمان در دمای ۵۶° C به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس پلاسمای مایع منی عاری از سلول در دمای ۲۰° C- ذخیره شد تا برای تعیین ASA به‌روش FCM غیرمستقیم استفاده گردد [۷].

جهت انجام FCM غیرمستقیم از نمونه‌های مایع منی استفاده شد که دارای حد اقل معیار WHO برای یک نمونه طبیعی باشند و از نظر ASA به روش MAR منفی باشند. ۱میلی‌لیتر مایع منی با ۴ میلی‌لیتر محیط Ham's F10+PVP[1] (Seromed ,Germany) شستشو و در ۲۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف مایع رویی به رسوب اسپرم‌ها ۱میلی‌لیتر از محیط فوق اضافه شد، اسپرم‌ها در دمای ۳۷°C به‌مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از این مدت، اسپرم‌های متحرک از مایع رویی برای آنالیز استفاده شدند. از طرفی پلاسمای مایع منی بیماران کاندید IVF که قبلاً در دمای ۲۰°C- منجمد شده بود در حرارت اتاق ذوب شد. سپس ۱۰۰میکرولیتر از نمونه حاوی اسپرم‌های متحرک آماده شده به‌روش فوق، به ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای مایع منی ذوب شده اضافه گردید و در دمای ۳۷°C به‌مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سوسپانسیون اسپرم با ۱۰ میلی‌لیترمحیط فوق شسته شد. پس از سانتریفوژ رسوب اسپرمی مجدداً در ۲۰۰ میکرولیتر محیط فوق سوسپانسیون گردید. در این مطالعه از قطعه F(ab) آنتی‌بادی‌های خرگوشی ضد IgA (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) یا IgG (۲۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) انسانی کونژوگه با FITC مخصوص FCM (DAKO, Denmark) جهت تعیین ASA استفاده گردید. از این آنتی‌بادی ۱۰ میکرولیتر به یک میلیون اسپرم انکوبه شده با پلاسما اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۴°C و فاقد نور نمونه‌ها با ۳ میلی‌لیترمحلول PBS[2] شسته شدند و در۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. رسوب اسپرمی مجدداً در۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول PBS سوسپانسیون گردید و برای حذف اسپرم‌های مرده از آنالیز، ۵ میکرولیتر از محلول PI[3] (Sigma, USA) با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. ایمونوگلوبولین خرگوشی کونژوگه با FITC به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد که در صورت وجود ASA نیز توانایی اتصال به آن را ندارد. سپس اسپرم‌ها توسط فلوسیتومتر FACS-Star (Becton Dickinson) با استفاده از لیزر یون آرگون با طول موج ۴۸۸ نانومتر مورد آزمایش قرار گرفتند. اطلاعات حداقل ۱۰۰۰۰ سلول توسط FSC[4] جمع‌آوری گردید. با استفاده از ترکیب FSC و SSC[5] جمعیت اسپرم‌ها محدودسازی[۶] شده و میزان فلورسانس آن‌ها تعیین گردید، در حالی‌که بقایای سلولی و ذرات غیرسلولی و دیگر سلول‌ها از قبیل گلبول‌های سفید حذف گردیدند (شکل).



شکل: آنالیز خطی FSC وSSC اسپرم‌های دست نخورده

سیگنال‌های فلورسانس FITC با استفاده از فیلترهای استاندارد FITC (DF[7] 530/30) و فلورسانس PI با استفاده از فیلترهای استاندارد (DF PE[8] 585/42) (Becton Dickinson, USA) مشخص گردید. نتایج فلورسانس با استفاده از تقویت‌کننده لگاریتمی جمع‌آوری گردید.

---

1. Polyvinyl Pyrolidone
2. Phosphate Buffered Saline
3. Propidium Iodide
4. Forward Scather
5. Side Scather
6. Gating
7. Dichroic Filter
8. Phycoerythrin

FL1-H نشانگر فلورسانس FITC اندازه‌گیری شده توسط آشکارساز اول و FL2-H نشانگر فلورسانس PI اندازه‌گیری شده توسط آشکارساز دوم بود. محدوده[1] کنترل (Quadrant) با استفاده از کنترل منفی علامت‌گذاری شد به نحوی که کمتر از ۱٪ سلول‌های مثبت در محدوده‌های ۱، ۲ و ۴ قرار گرفتند. در آنالیز فلوسیتومتریک، سلول‌های مرده (PI مثبت) در محدوده ۱، سلول‌های مرده (PI مثبت)حاوی آنتی‌بادی غیراختصاصی در محدوده ۲، سلول‌های زنده (PI منفی، ASA منفی) در محدوده ۳ و سلول‌های زنده (PI منفی، ASA مثبت) در محدوده ۴ قرار می‌گیرند (شکل ۲). برای بررسی اسپرم‌های دارای ASA هنگامی که بیشتر یا مساوی ۱۰٪ اسپرم‌ها در محدوده ۴ قرار گرفتند، نتیجه مثبت در نظر گرفته شد[۶،۱۱].

جهت انجام آزمون MAR مستقیم از کیت SpermMar IgG test و SpermMar IgA test محصول Fertipro N.V. کشور بلژیک برای تعیین ASA از کلاس IgG و IgA استفاده گردید. جهت آزمایش ۱۰ میکرولیتر از مایع منی تازه شسته نشده روی یک لام قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر معرف لاتکس به آن اضافه گردید (در مورد تعیین ASA از کلاس IgG آنتی‌سرم اختصاصی علیه قطعه IgG Fc انسانی نیز اضافه شد). پس از مخلوط‌کردن، با قراردادن لامل و بعد از۳–۲ دقیقه توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰x اسپرم های متحرک چسبیده به ذرات لاتکس در ۱۰۰ اسپرم شمارش شدند و نتایج به‌صورت درصد مشخص گردید. نتایج بزرگتر یا مساوی ۱۰٪ مثبت تلقی شد (۱۲،۴). آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های Fisher's exact test و همبستگی پیرسون انجام گرفت.

یافته‌ها

ASA از کلاس IgA به روش MAR مستقیم در ۲۴ زوج با میانگین (±انحراف معیار) ۱۷٪±۵۱٪ و به روش FCM غیرمستقیم در ۲۴ زوج و با میانگین (±انحراف معیار) ۹٪±۲۱٪ مثبت گردید (جدول شماره ۱). آزمون آماری χ^2 نشان داد که روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم در تعیین موارد مثبت ASA از کلاس IgA تفاوت ندارد(P<۰/۰۰۱) آزمون همبستگی پیرسون نشان داد که، بین روش MAR مستقیم و FCM غیرمستقیم، در تعیین ASA از کلاس IgA ارتباط وجود دارد (P= ۰/۰۰۶) (r= ۰/۵۵) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسهٔ نتایج روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم در تعیین ASA از کلاس IgA در افرادنابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان (P= ./۰۰۶)

۱۰٪ >منفی

۱۰٪≤ مثبت

کل	Indirect-FCM-IgA		Direct-MAR-IgA
	۱۰٪ ≥	۱۰٪ <	
۵۶	۰	۵۶	<۱۰٪
۲۴	۲۴	۰	≥۱۰٪
۸۰	۲۴	۵۶	کل

ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم در ۲۳ زوج و با میانگین (±انحراف معیار)(۱۷٪±۳۸٪) و به روش FCM غیرمستقیم در۹ زوج و با میانگین (±انحراف معیار) ۷٪±۱۱٪ مثبت گردید (جدول شماره ۲). آزمون آماری χ^2 (Fisher´s Exact test) نشان داد که روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم در تعیین موارد مثبت ASA از کلاس IgG تفاوت دارد (P>۰/۰۸) آزمون همبستگی پیرسون نشان داد که، بین روش MAR مستقیم و FCM غیرمستقیم، در تعیین ASA از کلاس IgG ارتباط وجود ندارد (P= ۰/۲۵ ، r= ۰/۲۵) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسهٔ نتایج روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم در تعیین ASA از کلاس IgG در افرادنابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان (P> ۰/۰۸)

۱۰ ٪> منفی

۱۰٪≤ مثبت

کل	Indirect-FCM-IgG		Direct-MAR-IgG
	۱۰٪≤	۱۰٪<	
۵۷	۰	۵۷	<۱۰٪
۲۳	۹	۱۴	≥۱۰٪
۸۰	۹	۷۱	کل

[1]. Quadrant

بحث

دقت تشخیص روش MAR مستقیم و غیرمستقیم در مقایسه با چندین آزمون دیگر ارزیابی شده است. به‌علاوه مقالات زیادی اهمیت کلینیکی این روش را تأییدکرده‌اند. ولی مشخص شده است که آزمایش پلاسمای مایع منی با سرم با این روش، کمتر برای ارزیابی باروری مناسب است[۶،۷]. در این مطالعه روش MAR مستقیم به‌عنوان یک استاندارد طلایی در نظر گرفته شد و روش FCM غیرمستقیم با آن مقایسه گردید.

Haas و همکاران اختصاصیت ۱۰۰٪ و حساسیت ۷۷٪ را برای FCM غیرمستقیم، در مقایسه با IBT غیرمستقیم گزارش کردند. در مطالعه آن‌ها اسپرم‌های مرده از آنالیزها حذف نشده بودند. سلول‌های مرده به‌علت دناتوره شدن آنتی‌ژن‌های اسپرم با مواجهه با آنتی‌ژن‌های داخلی می‌توانند نتایج منفی یا مثبت کاذب ایجاد نمایند. نتایج این مطالعه نشان داد که روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم تنها در تعیین ASA از کلاس IgA ارتباط دارد [۸] .

در این مطالعه اسپرم‌های مرده به‌وسیله روش swim-up و گیت‌کردن حذف شدند. در روش MAR و IBT، اتصال غیراختصاصی به اسپرم‌های مرده از طریق شمارش اسپرم‌های متحرک حذف می‌گردد.

اخیراً Rasanen و همکاران طی مطالعه‌ای، روش‌های مختلف مستقیم و غیرمستقیم را مقایسه کرده‌اند. آن‌ها ارتباط خوبی بین MAR مستقیم و FCM مستقیم نشان دادند. هرچندکه، درصد اسپرم مثبت با روشFCM کمتر از MAR بود. به عبارت دیگر، از ۱۱ نمونه مایع منی که برای ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم مثبت بودند، ۹ نمونه به روش MAR غیرمستقیم، ۸ نمونه به روش IBT غیرمستقیم و تنها ۵ نمونه به روش FCM غیرمستقیم مثبت بودند. نتایج برای IgA بهتر بود. با هر دو روش MAR غیرمستقیم و IBT غیرمستقیم، از ۱۱ نمونه MAR مستقیم مثبت، ۱۰ نمونه مثبت بودند. با روش FCM غیرمستقیم هر ۱۱ نمونه مثبت بودند. هنگامی که آن‌ها نتایج روش IBT غیرمستقیم و FCM غیرمستقیم ۱۱ نمونه را برای وجود IgG با یکدیگر مقایسه کردند، ارتباط خوبی را بین این دو روش نشان دادند[۶]. مطالعه Nicholson و همکاران نیز این ارتباط را تأیید کرد[۷]. علی‌رغم تعداد محدود بیماران مطالعه شده، نتایج مطالعه Rasanen و همکاران نشان داد که روش FCM مستقیم با روش FCM غیرمستقیم برای اندازه‌گیری ASA از کلاس IgG ارتباط نداشته و تنها ارتباط ضعیفی با اندازه‌گیری ASA از کلاس IgA دارد [۶]. مطالعه ما تأییدی بر مطالعه Rasanen و همکاران بود. اختلاف زیاد بین نتایج روش‌های مستقیم و غیرمستقیم ممکن است به دلایل زیر اتفاق افتاده باشد.

در مطالعه Rasanen و همکاران شایع‌ترین نوع اتصال در روش MAR غیرمستقیم وIBT غیرمستقیم، اتصال به انتهای دم بود که تأییدی بر مطالعه Bronson و همکاران[۱۳] می‌باشد. به عبارت دیگر روش‌های غیرمستقیم توانایی تعیین آنتی‌بادی‌های علیه ناحیه سر اسپرم را ندارند [۶]. از طرف دیگر، آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم پلاسمای مایع منی بیماران به اسپرم‌های خودشان متصل می‌گردند. در نتیجه، تنها آنتی‌بادی‌های غیرمتصل که توانایی اتصال به اسپرم‌های خود بیمار را نداشته‌اند (اگرچه توانایی اتصال به اسپرم‌های‌دهنده را دارند) به‌وسیله روش‌های غیرمستقیم تعیین می‌گردند. دلیل احتمالی برای وجود آنتی‌بادی‌های غیرمتصل در پلاسمای مایع منی، وجود آنتی‌بادی‌های اضافی مربوط به آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم بیمار می‌باشد [۶،۱۳]. هم‌چنین این موضوع با توجه به خصوصیات ایزوتیپ‌های ASA قابل بررسی است. ایزوتیپ IgA روی سطح اسپرم و اغلب در پلاسمای مایع منی یافت می‌شود و معمولاً در سرم وجود ندارند. بنابراین ارزیابی ASA از کلاس IgA در سرم پیشنهاد نمی‌شود. ایزوتیپ IgA خاصیت آگلوتینه‌کنندگی دارد و بندرت بدون ASA از کلاس IgG وجود دارد. بنابراین آزمایش IgG به‌تنهایی، به‌عنوان یک روش غربالگری معمول کافی می‌باشد. بر خلاف IgA، ایزوتیپ IgG اغلب روی اسپرم و یا در سرم تعیین می‌گردد و اثرات سیتوتوکسیک دارد[۱۳] .

نتیجه‌گیری

روش FCM غیرمستقیم با روش MAR مستقیم در تعیین سطح ASA از کلاس IgG ارتباط ندارد. به‌عبارت دیگر، روش‌های غیرمستقیم با روش‌های مستقیم تنها در تعیین ASA از کلاس IgA ارتباط دارند. بنابراین روش FCM غیرمستقیم بر خلاف روش MAR مستقیم جهت بررسی روتین ASA توصیه نمی‌گردد.

References:

1. Bohring G, Krause W. The Role of Antisperm Antibodies During Fertilization and for Immunological Infertility. Chem Immunol Allergy 2005; 88:15-26.
2. Helmerhorst FM, Finken MJ, Erwich JJ. Detection Assays for Antisperm Antibodies: What do They Test? Hum Reprod 1999; 14:1669-71.
3. Bronson R Detection of Antisperm Antibodies: An Argument Against Therapeutic Nihilism. Hum Reprod 1999; 14:1671-3.
4. Mahmoud A, Comhaire F. Antisperm Antibodies: Use of the Mixed Agglutination Reaction (MAR) Test Using latex Beads Hum Reprod 2000; 15:231-3.
5. Haas GG Jr, Cunningham ME. Identification of Antibody-Laden Sperm by Cytofluorometry. Fertil Steril 1984; 42:606-13.
6. Rasanen M, Agrawal YP, Saarikoski S. Seminal Fluid Antispirm Antibodies Measured by Direct Flow Cytometry Donot Correlate with Those Measured by Indirect Flow Cytometry, the Indirect Iimmunobead Test, and the Iindirect Mixed Antiglobulin Reaction. Fertil Stiril 1996; 65:170-5.
7. Nicholson SC, Robinson JN, Sargent IL, Barlow DH. Detection of Antisperm Antibodies in Seminal Plasma by Flow Cytometry: Comparison with the Indirect Immunobead Binding Test. Fertil Steril 1997; 68:1114-9.
8. Haas GG Jr, D'Cruz OJ, DeBault LE. Comparison of the Indirect Immunobead, Radiolabeled, and Immunofluorescence Assays for IgG Serum Antibodies to Human Sperm. Fertil Steril 1991; 55:377-88.
9. Rajah SV, Parslow JM, Howell RJS, Hendry WF.Comparison of Mixed Agglutination Reaction and Direct Immunobead Test for Detection of Sperm-Bound Antibodies in Subfertile Males. Fertil Steril 1992; 57P:1300-3.
10. Andreou E, Mahmoud A, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. Comparison of Different Methods for the Investigation of Antisperm Antibodies on Spermatozoa,in Seminal Plasma and in Sperm.Hum Reprod 1995; 10:125-31.
11. Nikolaeva MA, Kulakov VI, Korotkova IV, Golubeva EL, Kuyavskaya DV, Sukhikh GT. Antisperm Antibodies Detection by Flow Cytometry is Affected by Aggregation of Antigen-Antibody Complex on the Surface of Spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15:2545-53.
12. Kipersztok S, Kim BD, Morris L, et al.Validity of a Rrapid Assay for Antisperm Antibodies in Semen. Fertil Steril 2003; 79:522-8.
13. Bronson RA, Cooper GW, Rosenfeld DL. Seminal Fluid Antisperm Antibodies Do not Reflect Those Present on the Spermsurface. Fertil 1987; 48:505-6.

Detection of Antisperm Antibodies by Indirect Flow Cytometry: Comparison with Direct Mixed Agglutination Reaction Test

F. Shahsavar MSc* A. Rezaei PhD** M. H. Nasr Esfahani PhD*** B. Asadifar MSc****
M. R. Nasiri MSc***** M. Jafari MSc***** P. Danesh BSc*****
* PhD student of Immunology, Iran University of Medical Science
** Professor of Immunology, Isfahan University of Medical Sciences
*** Associate Professor of Embryology and Andrology, Royan Institute
**** MLT, Iran University of Medical Sciences
***** Immunology MLT, Iran University of Medical Sciences

Abstract

Background and objectives: The immunobead binding test (IBT) and the mixed agglutination reaction (MAR) are the most commonly used methods for detection of antisperm antibodies (ASA). The detection of ASA by flow cytometry (FCM) was first described by Haas and Cunningham. Both assays can be performed as direct or indirect methods. In this study, indirect FCM was compared with the direct MAR for detection of ASA.

Methods: Semen samples were obtained from 80 men (infertile couples) in Isfahan Fertility and Infertility Center. Seminal plasma samples were incubated with ASA-negative donor sperm. Then, surface-bound antibody was detected with FITC-labeled antihuman immunoglobulin directed against IgA and IgG in the indirect FCM assay. ASAs bound to the surface of patients' sperm were detected by direct MAR test.

Results: The indirect FCM correlates with direct MAR for detection of IgA antisperm antibodies (r=0.55 and P=0.006). The indirect FCM, however, does not correlate with direct MAR for the detection of IgG antisperm antibodies (r=0.25 and P=0.25).

Conclusion: Some of the ASAs in seminal fluid bind to spermatozoa. Therefore, indirect tests to detect ASAs in seminal plasma are likely to miss the presence of IgG antisperm antibodies while they effectively detect IgA antisperm antibodies.

Keywords: Antisperm Antibody, Agglutination, Flow Cytometry, Sperm Agglutination

Corresponding Author: Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences

Email: shahsavarfarhad@yahoo.com