

## تأثیر آنتی اسپرم آنتی بادی های اندازه گیری شده به روش واکنش آگلوتیناسیون مختلط مستقیم بر درصد لقاح آزمایشگاهی

فرهاد شاهسوار<sup>۱</sup>، دکتر عباس رضایی<sup>۲</sup>، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی<sup>۳</sup>، دکتر عبدالرضا خیرالهی<sup>۴</sup>، علی فرهادی<sup>۱</sup>

یافته / سال ششم / شماره ۲۰

### چکیده

**مقدمه:** اگر چه لقاح آزمایشگاهی (IVF) برای برطرف نمودن اثر مهاری سطوح بالای آنتی اسپرم آنتی بادی ها بر حرکت اسپرم ابداع شده است؛ ولی در این روش میزان باروری تقریباً در ۴۰٪ موارد کاهش می یابد. در این مطالعه ارتباط بین آنتی اسپرم آنتی بادیهای اندازه گیری شده به روش واکنش آگلوتیناسیون مختلط (MAR) مستقیم و درصد لقاح در زوجهای نابارور کاندید IVF بررسی شد.

**مواد و روشها:** نمونه های سمن از مردان ۸۰ زوج نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مراکز باروری و ناباروری اصفهان به دست آمد. زوج ها بر اساس درصد لقاح به دو گروه دارای درصد لقاح بالا و درصد لقاح پایین تقسیم شدند. ۵۲ زوج درصد لقاح بالا (۶۵٪) و ۲۸ زوج درصد لقاح پایین (۳۵٪) داشتند. سپس درصد آنتی اسپرم آنتی بادی ها از کلاس IgG و IgA در نمونه های سمن به روش MAR مستقیم تعیین شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون های  $T$ ،  $X^2$  مستقل و همبستگی پیرسون انجام گرفت.

**یافته ها:** میانگین درصد آنتی اسپرم آنتی بادی ها در گروه های بادرصد لقاح بالا و پایین اختلاف معنی داری داشت ( $p < 0/001$ ). از نظر آماری ارتباط معکوس معنی داری بین درصد لقاح و سطح آنتی اسپرم آنتی بادی ها از کلاس IgA مشاهده شد ( $p < 0/001$  و  $r = 0/56$ ). همچنین از نظر آماری ارتباط معکوس معنی داری بین درصد لقاح و سطح آنتی بادی از کلاس IgG مشاهده شد ( $p < 0/001$  و  $r = -0/42$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه به وضوح نشان می دهد که سطوح بالای آنتی اسپرم آنتی بادی درصد لقاح را کاهش می دهد. بنابراین پیشنهاد می گردد که زوجها با سطوح بالای آنتی اسپرم آنتی بادی ها، کاندید تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) گردند.

**واژه های کلیدی:** آنتی اسپرم آنتی بادی، لقاح آزمایشگاهی، واکنش آگلوتیناسیون مختلط، ناباروری

- ۱- مربی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
- ۲- دانشیار، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- ۳- استادیار، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- ۴- استادیار، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

## مقدمه

اگر چه برخی محققین بر شیوع آنتی اسپرم آنتی بادی (ASA)<sup>۱</sup> در بیماران نابارور تأکید داشته اند (۱)؛ ولی برخی دیگر ASA را در درصد نسبتا بالایی از مردان و زنان بارور و نابارور مشخص کرده اند (۲). با وجود این مطالعات انجام شده در سیستم های حیوانی و انسانی نشان داده است که وجود آنتی اسپرم آنتی بادی ها ممکن است با باروری تداخل نماید. ASA بر سطح اسپرم و در ترشحات تناسلی در پاتوژنز ناباروری دخیل است، در صورتی که اهمیت بالینی ASA سرم بحث انگیز است. شیوع ASA در زوج های نابارور ۳۶-۹ درصد و در جمعیت مردان نابارور ۲۱-۸ درصد است (۳). ASA اثرات متنوعی روی باروری انسان دارد که از آن جمله می توان معیوب کردن حرکت پیش رونده اسپرم (۴،۵)، محبوس کردن و فاگوسیتوز اسپرم در موکوس سرویکس، کاهش اتصال و نفوذ اسپرم به زوناپلوسیدا، مهار ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی و مهار ادغام اسپرم - تخمک (۵،۶) را نام برد.

بنابراین وجود ASA به عنوان عامل ایمنولوژیک، یکی از علل اصلی ناباروری مردان در نظر گرفته می شود. استفاده از فن آوری کمک باروری در بیشتر زوج های دارای ASA مفید است؛ زیرا عیب اتصال و ادغام گامت ها را به حداقل می رساند. به همین علت لقاح آزمایشگاهی به عنوان ابزاری برای درمان ناباروری ایمنولوژیک استفاده شده است (۷). با وجود این، آنتی اسپرم آنتی بادی ها می توانند در موارد ذیل با IVF<sup>۲</sup> نیز تداخل نمایند:

اتصال و نفوذ اسپرم به زوناپلوسیدا؛ واکنش زونا؛ ادغام اسپرم، تخمک؛ تسهیم و گسترش اولیه جنینی (۸).

امروزه تعیین ASA یکی از مهم ترین مراحل در ارزیابی ناباروری مردان است. آنتی اسپرم آنتی بادی ها از طریق آزمایش های متعددی تعیین می شوند. بیشتر

مطالعات استفاده از روش MAR<sup>۳</sup> را برای ارزیابی وجود ASA و ایزوتیپ آن تأیید می نمایند (۹). در این روش گلبول های قرمز Rh مثبت گروه خونی O با IgA یا IgG انسانی پوشیده می شوند و سپس با اسپرم های متحرک شسته شده یا شسته نشده مخلوط می گردند. در ادامه آنتی سرم اختصاصی علیه ایمونوگلوبولین اضافه می شود و آگلوتیناسیون اریتروسیت - اسپرم در حضور ASA رخ می دهد. این آگلوتیناسیون سپس به طور نیمه کمی با میکروسکوپ نوری تعیین می گردد (۱۰). درکیت های تجاری با نام Sperm Mar Test به جای گلبول های قرمز از ذرات لاتکس استفاده شده است. این کیت ها توانایی تعیین هر سه کلاس ASA (۴،۵،۶) را دارا است (۱۱).

لذا در این مطالعه وجود ASA از کلاس IgA و IgG در مردان زوج های نابارور کاندید IVF به روش MAR مستقیم مشخص گردید و اهمیت بالینی ایزوتیپ های IgA و IgG در پیشگویی درصد لقاح بررسی شد.

## مواد و روشها

تهیه نمونه های سمن: نمونه های سمن از مردان ۸۰ زوج نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان بین مهرماه ۱۳۸۰ تا فروردین ماه ۱۳۸۱ به دست آمدند. این نمونه ها ۷۲-۴۸ ساعت پس از آخرین مقاربت، معمولا به کمک همسر، بدون زناشویی و بدون استفاده از لوبریکانت جمع آوری گردید (۱۲). مردان تحت بررسی از نظر حرکت، تعداد و ریخت شناسی اسپرم طبیعی بودند و همسران آنها آندومترپوز و اووسیت های نامناسب نداشتند. زوج هایی که پارامترهای سمن ضعیف داشتند (به خصوص از نظر حرکت و ریخت شناسی) به جای IVF تحت عمل ICSI قرار گرفتند و از مطالعه حذف شدند.

1. Antisperm Antibody 2. In vitro Fertilization  
3. Mixed Agglutination Reaction

شد (۱۴). زوج‌ها با درصد لقاح  $\geq 50\%$  در گروه با درصد لقاح پایین و زوج‌ها با درصد لقاح  $< 50\%$  در گروه با درصد لقاح بالا قرار گرفتند.

تحلیل آماری: اطلاعات جمع‌آوری شده با نرم افزار آماری SPSS تحلیل قرار گردید. برای تعیین وابستگی دو متغیر از آزمون  $X^2$  برای مقایسه میانگین‌ها از t-test و برای تعیین ضریب همبستگی از آزمون همبستگی پیرسون استفاده گردید.

#### یافته‌ها

پس از ثبت نتایج IVF براساس درصد لقاح، ۲۸ زوج (۳۵٪) در گروه با درصد لقاح پایین و ۵۲ زوج (۶۵٪) در گروه با درصد لقاح بالا قرار گرفتند.

ASA از کلاس IgA به روش MAR مستقیم، در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی پایین، در ۱۰ زوج (۳۶٪) منفی و در ۱۸ زوج (۶۴٪) مثبت گردید. در حالی که، در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا در ۴۶ زوج (۸۸٪) منفی و در ۶ زوج (۱۲٪) مثبت شد. آزمون  $\chi^2$  نشان می‌دهد که درصد موارد مثبت در گروه با درصد لقاح پایین نسبت به گروه با درصد لقاح بالا تفاوت دارد ( $P < 0/001$ ) (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه سطح ASA از کلاس IgA به روش MAR

زوج‌ها	مستقیم در گروه با درصد لقاح پایین و گروه با درصد لقاح بالا	
	Direct - MAR-IgA $\geq 10\%$	سطح ASA $< 10\%$
تعداد زوج‌های نابارور با درصد لقاح پایین	۱۸	۱۰
تعداد زوج‌های نابارور با درصد لقاح بالا	۶	۴۶
کل	۲۴	۵۶

$p < 0/001$

میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) سطح ASA از کلاس IgA به روش MAR مستقیم، در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی پایین (۰/۲۹  $\pm$  ۰/۳۶) و در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا،

آزمایش MAR مستقیم: برای تعیین ASA از کلاس IgA از کیت Sperm Mar Test IgA محصول Fertipro کشور بلژیک استفاده گردید. ۱۰MI سمن تازه روی یک لام ریخته شد و ۱۰ml معرف لاتکس به آن اضافه گردید. پس از مخلوط کردن و قرار گرفتن ۲-۳ دقیقه زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $\times 400$ ، اسپرم‌های متحرک چسبیده به ذرات لاتکس تا ۱۰۰ اسپرم شمارش گردید و نتیجه بصورت درصد گزارش شد. نتیجه بزرگ تر یا مساوی ۱۰٪ مثبت تلقی گردید. جهت تعیین ASA از کلاس IgG از کیت Sperm mar test IgG (محصول Fertipro کشور بلژیک) استفاده شد. ۱۰MI سمن تازه روی یک لام ریخته شد و ۱۰MI معرف لاتکس به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن، ۱۰MI آنتی سرم اختصاصی علیه قطعه FC، IgG انسانی اضافه شد. با قرار دادن لامل بعد از ۲-۳ دقیقه زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $\times 400$  اسپرم‌های متحرک چسبیده به ذرات لاتکس در ۱۰۰ اسپرم شمارش گردید و نتیجه به صورت درصد گزارش شد. نتیجه بزرگ تر یا مساوی ۱۰٪ مثبت تلقی گردید (۱۳، ۱۱).

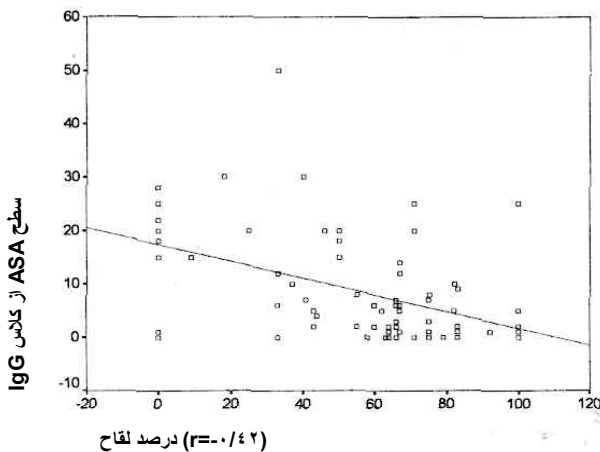
پروتکل IVF: رشد فولیکول‌های تخمدان در همسر بیماران با استفاده از آگونیست‌های GnRH، hMG تحریک شدند. سپس وضعیت رشد فولیکول‌ها با اولتراسونوگرافی ارزیابی شد و با تجویز hCG به میزان ۱۰۰۰۰IU تخمک گذاری القا گردید. پس از ۳۲-۳۶ ساعت اووسیت‌ها از طریق تخلیه فولیکول جمع‌آوری شد.

پس از شستشو در Ham'sF10 + ۱۰% HSA، اووسیت‌ها به محیط کشت (Vitrolife-Goteberg-Sweden) IVF-20 منتقل شدند.

پس از ۲ ساعت تعداد ۱۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰ اسپرم متحرک که به روش Pure Sperm آماده شده بود در مجاور هر اووسیت قرار گرفت. بعد از گذشت ۱۷-۱۹ ساعت وجود لقاح با توجه به تشکیل پرونوکلئوس‌ها ارزیابی و درصد لقاح ثبت

میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) سطح ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم، در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی پایین ( $0.24 \pm 0.26$ ) و در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا، ( $0.15 \pm 0.09$ ) شد. آزمون t نشان می دهد که میانگین سطح ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی پایین بیشتر از گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا است و اختلاف میانگین ها معنی دار بود ( $P < 0.001$ ).

آزمون همبستگی پیرسون نیز نشان می دهد که بین درصد لقاح و سطح ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم رابطه خطی معکوس وجود دارد ( $r = -0.42$ ,  $P < 0.001$ ) (شکل ۲).



شکل ۲ - پراکنش سطح ASA از کلاس IgG به روش MAR

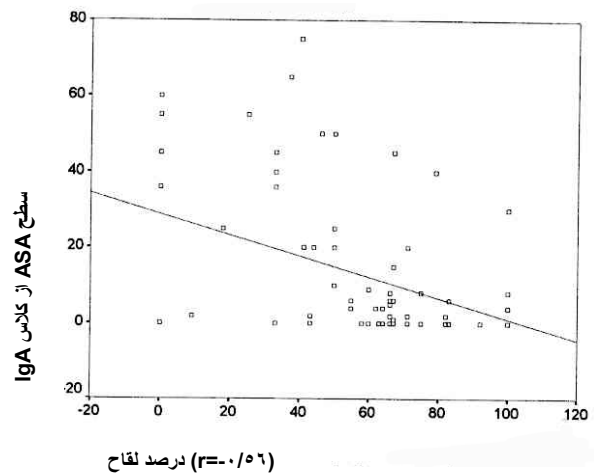
مستقیم با درصد لقاح در افراد نابارور کاندید ( $r = -0.42$  و  $P < 0.001$ )

### بحث

مطالعات زیادی نشان داده اند که غلظت های بالای ASA، توانایی باروری اسپرم ها را کاهش می دهد. به عبارت دیگر سطوح بالای ASA بر سطح اسپرم تأثیر دارد و در پلاسمای سمن با کاهش معنی داری در توانایی اسپرم برای بارور نمودن تخمک همراه است. (۱۶، ۱۵).

در مطالعه ای که راجا<sup>۱</sup> و همکاران وی به روش MAR مستقیم انجام دادند، بیماران با سطوح پایین ASA ( $0.20 - 0.0$ ) درصد لقاحی از  $34\% - 60\%$  بیماران با سطوح متوسط ASA

( $0.12 \pm 0.07$ ) به دست آمد. آزمون t نشان می دهد که میانگین سطح ASA از کلاس IgA به روش مستقیم در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی پایین بیشتر از گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا است و اختلاف میانگین ها معنی دار است ( $P < 0.001$ ). آزمون همبستگی پیرسون نیز نشان می دهد که بین درصد لقاح و سطح ASA از کلاس IgA به روش MAR مستقیم رابطه خطی معکوس وجود دارد ( $r = -0.56$  و  $P < 0.001$ ) (شکل ۱).



شکل ۱ - پراکنش سطح ASA از کلاس IgA به روش MAR

مستقیم با درصد لقاح در افراد نابارور کاندید ( $r = -0.56$  و  $P < 0.001$ )

ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم، در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی پایین در ۱۰ زوج ( $36\%$ ) منفی و در ۱۸ زوج ( $64\%$ ) مثبت گردید. در حالی که در گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا در ۴۷ زوج ( $64\%$ ) منفی و در ۵ زوج ( $10\%$ ) مثبت شد. آزمون Z فیشر نشان می دهد که درصد موارد مثبت در گروه با درصد لقاح پایین نسبت به گروه با درصد لقاح بالا تفاوت دارد ( $P < 0.001$ ) (جدول ۲).

جدول ۲ - مقایسه سطح ASA از کلاس IgG به روش MAR مستقیم در گروه با درصد لقاح پایین و گروه با درصد لقاح بالا

گروه	Direct - MAR-IgA	
	$\geq 10\%$	$< 10\%$
تعداد زوج های نابارور با درصد لقاح پایین	۱۸	۱۰
تعداد زوج های نابارور با درصد لقاح بالا	۵	۴۷
کل	۲۳	۵۷

از دیگر عوامل مؤثر بر میزان باروری IVF می تواند به حرکت و ریخت شناسی اسپرم اشاره کرد (۴). در این مطالعه زوج هایی که پارامترهای سمن ضعیف داشتند (به خصوص از نظر حرکت و ریخت شناسی) به جای IVF، تحت عمل تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)<sup>۲</sup> قرار گرفتند و از مطالعه حذف شدند. بنابراین، در این مطالعه کلیه نمونه ها دارای پارامترهای تقریباً استاندارد بودند و پارامترهایی از قبیل حرکت و ریخت شناسی اسپرم تأثیری بر درصد لقاح IVF نداشت.

در پایان، انجام آزمون آنتی اسپرم آنتی بادی پیش از انجام IVF توصیه می گردد و در صورتی که تشخیص داده شود که بیماران ASA مثبت هستند می توان به تدابیر زیر دست یافت :

- از انجام درمان IVF و در نتیجه اتلاف هزینه و وقت بیماران جلوگیری کرد؛ زیرا از تعیین سطح ASA برای پیشگویی درصد لقاح IVF استفاده می نمایم.

می توان روش درمانی را تغییر داد و ICSI را به جای IVF پیشنهاد کرد؛ زیرا در این روش با تزریق مستقیم اسپرم به داخل تخمک و عبور از جسم شفاف شانس لقاح با اسپرم های پوشیده با ASA افزایش می یابد (۲۱).

بدین وسیله از زحمات کادر آزمایشگاه مرکز باروری و ناباروری اصفهان قدردانی می گردد.

## References

1. Bronson R. Detection of antisperm antibodies: an argument against therapeutic nihilism. Hum Reprod, 1999; 14: 1671-3
2. Collins JA, Burrows EA, Yeo J. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. Hum Reprod, 1993 ; 8 : 592-598

(۲۱) / ۸۰٪) درصد لقاحی از ۰-۱۰۰٪ و بیماران با سطوح بالای ASA (بیش از ۸۰٪) درصد لقاحی از ۰-۸۰٪ داشتند (۱۷).

مطالعه وازکوئیز لوین<sup>۱</sup> و همکاران وی به روش MAR مستقیم در زوج های کاندید IVF نشان داد که میزان باروری در بیماران با درصد بالای ASA متصل به سطح اسپرم به طور معنی داری کاهش می یابد (۱۵). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که بین سطح ASA اندازه گیری شده به روش MAR مستقیم با درصد لقاح IVF ارتباط معکوس وجود دارد.

یکی از عوامل مؤثر در میزان باروری IVF، جایگاه اتصال ASA به سطح اسپرم (۱۹،۱۸) و توانایی آن برای بلوک کردن شاخص های آنتی ژنیک<sup>۲</sup> درگیر در واکنش متقابل اسپرم - اووسیت است (۸). به عبارت دیگر حضور ASA در سر اسپرم اثر زیان آوری بر باروری دارد. از طرف دیگر معمولاً آنتی اسپرم آنتی بادی ها در یک فرد علیه طیفی از آنتی ژن ها هستند. بنابراین تأثیر آنتی اسپرم آنتی بادی ها احتمالاً به ملکول هایی که در سطح اسپرم شناسایی می کنند بستگی دارد (۱۹،۱۸). در این مطالعه تعدادی از بیماران با درصد لقاح بالا، ASA مثبت بودند که غیر منتظره است. این تغییر غیر منتظره یا ناشی از اتصال ASA به محلی غیر از سر اسپرم می باشد و یا ناشی از ناتوانی ASA برای بلوک کردن شاخص های آنتی ژنیک درگیر در واکنش متقابل اسپرم - اووسیت است. در ضمن وجود درصد لقاح پایین در بیماران فاقد ASA ممکن است به علل غیر ایمونولوژیک باشد.

یکی دیگر از عوامل مؤثر در میزان باروری IVF، ایزوتیپ ASA است. مطالعات زیادی نشان داده اند که سطوح بالای یکی از دو ایزوتیپ ASA برای مهار اتصال اسپرم به زوناپلوسیدا کافی است. با وجود این، پیش تر مطرح شده است که حضور هر دو ایزوتیپ IgA و IgG اثر مهاری سینرژیک بر روی اتصال اسپرم به زوناپلوسیدا و باروری IVF دارد (۲۰). طبق یافته های این مطالعه هر دو ایزوتیپ IgA و IgG با درصد لقاح IVF ارتباط داشت.

1. Vazquez-Levin                      2. Epitope  
2. Intra cytoplasmic sperm injection

3. Gubin DA, Dmochowski R, Kutteh WH. Multivariate analysis of men from infertile couples with and without antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol*, 1998 ;39:157-60
4. Munuce MJ, Berta CL, Pauluzzi F, Caille AM. Relationship between antisperm antibodies, Sperm movement, and semen quality. *Url Int*, 2000 ; 65 : 200-3
5. Taneichi A, Shibahara H, Hirano Y, Suzuki T, vobara H, Fujiwara H, Takamizawa S, Sato I. Sperm immobilizing antibodies in the sera of infertile women cause low fertilization rates and poor embryo quality in vitro. *Am J Reprod Immunol*, 2002 ;47 : 46-51
6. Fann CH, Lee CYG. Monoclonal antibodies affecting sperm – zona binding and/ or zona – induced acrosom reaction. *J Reprod Immunol*, 1992 ; 21:175-187
7. Hjort T. Antisperm antibodies and infertility : an unsolvable question ? *Hum Reprod*, 1999 ; 14: 2423-6
8. Mardesic T, ulcova – Gallova 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;43:1-5
9. Helmerhorst FM, Finken MJJ, Erwich JJ. Detection assays for antisperm antibodies: what do they test ? *Hum Reprod*, 1999; 1669- 71
10. Hendry WF, Stedronska J. Mixed erythrocyte – spermatozoa antiglobulin reaction (MAR test) for the detection of antibodies against spermatozoa in infertile males. *J obstet Gynecol*, 1980 ; 1:59 –62
11. Mahmoud A, Comhire F. Antisperm antibodies : use of the mixed agglutination reaction (MAR) test using latex beads. *Hum Reprod*, 2000 ; 15 : 231 – 3
12. Mallidis C, Howard R, Baker HWG. Variation of semen quality in normal men. *Int J Androl*, 1991 ; 14 : 99-107
13. Rasanen M, Agrawal YP, Saarikoski S. Seminal fluid antisperm antibodies measured by direct flow cytometry do not correlate with those measured by indirect flow cytometry, the indirect immunobead test, and the indirect mixed antiglobulin reaction. *Fertil steril*, 1996 ; 65 : 170 – 5
14. Culligan PJ, Crane MM, Boone WR, Allen TC, Price TM, BlaueZ KL. Validity and cost – effectiveness of antisperm antibody testing before in vitro fertilization. *Fertil steril*, 1998 ;69:894-898
15. Vazquez – Levin MH, Notrica JA, de Fried EP. Male immunologic infertility : sperm performance on in vitro fertilization. *Fertile Steril*, 1997 ; 68 : 675 – 81
16. Bohring G, Krause W. Immune infertility : towards a better understanding of sperm (auto) – immunity. *Hum Reprod*, 2003; 18: 915 – 24
17. Rajah SV, Parslow JM, Howell RJ, Hendry WF. The effects on in vitro fertilization of auto antibodies to spermatozoa in subfertile men. *Hum Reprod*, 1993; 8 : 1079 – 82
18. Shibahara H, Shiraishi Y, Hirano Y, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M. Diversity of the inhibitory effects on fertilization by antisperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. *Hum Reprod*, 2003 ; 18 : 1469 – 73.
19. Shibahara H, Tsunoda T, Taneichi A, Hirano Y, Ohno A, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Diversity of antisperm antibodies bound to sperm surface in male immunological

- infertility. *Am J Reprod Immunol*, 2002 a; 47 : 146 – 50
20. Zouari R, De Almeida M. Effect of sperm associated antibodies on human sperm ability to bind to zona pellucida and penetrate zona – free hamster oocytes. *J Reprod Immunol*, 1993 ; 24:175 – 86.
21. Nagy ZP, Arayona C, Creco E. Results of ICSI in the treatment of male immunological infertility. *Andrologia*, 1999 ; 31 : 316 – 7