

ارزیابی بالینی نتایج آزمایش مار (Mixed Agglutination Reaction-MAR) و آزمایش تات (Tray Agglutination Test-TAT) در مردان نابارور

(۱) دکتر داراب مهربان

خلاصه:

از ایمونوگلوبولین های ضد اسپرم تنها IgG, IgA که علیه سطح اسپرما تو زوید باشند، دارای اهمیت بالینی هستند، زیرا آنتی بادی های ضد اسپرم در سرم خون تعدادی از مردان بارور موجود می باشند. از آنجایی که لزوم استفاده از یک روش جستجوی آنتی بادی ضد سطح اسپرما تو زوید در کشور احساس میشود و روش Immunobead (IBT) به علت هزینه بالا رواج پیدا ننموده است، کارآیی روش کم هزینه تر یعنی مار (Mixed Agglutination Reaction, MAR) که آنهم یک روش اختصاصی بر علیه آنتی ژن های سطح اسپرما تو زوید است، در بیماران نابارور مطالعه شد. ضمناً در کنار آن کارآیی روش تات (Tray Agglutination Test, TAT) که میکرو آگلوتیناسیون و غیر اختصاصی است، نیز مطالعه شد. تعداد ۲۹ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه ارولوژی بیمارستان شریعتی در طی یک سال تحت بررسی آزمایش های مار مستقیم بر علیه IgA & IgG سطح اسپرم، و تات سرم و مایع منی در یک زمان قرار گرفتند. نتیجه این بررسی نشان داد که روش مار مستقیم به تنهایی برای ارزیابی آنتی بادی ها، کارآیی دارد. بعلاوه به احتمال قوی مار بر علیه IgG به تنهایی کافی میباشد و نیازی به انجام مار بر علیه IgA نخواهد بود. اگر مار در اختیار نباشد، آزمایش تات باید بر روی هردو نمونه سرم و مایع منی انجام گردد تا جواب قابل قبول فراهم سازد.

مقدمه:

از سال ها قبل ارتباط عوامل ایمونولوژیک و کاهش قدرت باروری شناخته شده است. مثلاً چنانچه عیار آنتی بادی آگلوتینه کننده اسپرما تو زوید از ۱/۶۴ بالاتر برود، شانس حاملگی پایین می آید.

به دلیل تفاوت در جواب آزمایشهای متداول و غیر اختصاصی بودن اغلب آنها، درباره یک حد استاندارد که باروری را از ناباروری جدا کند، و یا اینکه روش برتر کدام است، توافق کلی وجود ندارد. روش هاییکه در سرم بیماران به جستجوی آنتی بادی های آگلوتینه کننده یابی حرکت کننده اسپرما تو زوید می پردازند، ازدقت لازم

عوامل ایمونولوژیک در ۵ تا ۱۵ درصد ناباروری زوج ها دخالت دارند. گامت های جنسی مذکر از نظر سیستم ایمنی بدن غریبه هستند و تماس آنها با این سیستم سبب تحریک ایمنی و ساختن آنتی بادی علیه اسپرما تو زوید می شود. پس برای محافظت آن در مکانی با این توانایی ها، باید سیستم فعال تنظیم کننده و مهار کننده ایمنی وجود داشته باشد. مکانیسم های مزبور در ۳ منطقه اعمال نفوذ می کنند:

- ۱- سد خون و بیضه ۲- سد خون و اپیدیدیم.
- ۳- داخل مایع منی (۱).

که از سوی شرکت بلژیکی ارتو Ortho (Diagnostic Systems, Barse, Belgium) عرضه شده و ساده تر از روش Immunobead (IBT) می باشد استفاده شده است. بر روی لام میکروسکوپ ۱۰ میکرولیتر از مایع منی تازه و شسته رادرکنار ۱۰ میکرولیتر از مایع حاوی میکروسفرهای لاتکس و یک قطره آنتی سرم ضد FC اختصاصی از نوع IgA و یا IgG، قرار میدهم. پس از مخلوط کردن و سپس پوشاندن آنها بالامل، ماحصل پس از ۲ الی ۳ دقیقه در زیر میکروسکوپ برای شمارش درصد اسپرما توزوئیدهای متحرکی که دانه های لاتکس به آنها چسبندگی پیدا کرده است، ارزیابی میشود. آزمایش در صورتی مثبت است که ۴۰ درصد یا بیشتر اسپرما توزوئیدهای متحرک به این دانه ها چسبندگی پیدا کنند (۴ و ۵ و ۶ و ۷).

آزمایش تات (TAT) به روش Friberg (۱۹۷۴) و بر روی Trays انجام میشود. یک میکرولیتر مایع منی حاوی ۴۰ میلیون اسپرما توزوئید فعال در داخل حفره های ریز که قبلاً ۵ میکرولیتر مایع مورد مطالعه بارت های ۱/۴ به بالادریز پارافین مایع پر شده اند، قرارداده میشود. در حرارت اتاق ۴ ساعت و در حرارت ۳۷ درجه ۲ ساعت لازم است تا نتیجه آزمایش در زیر میکروسکوپ ارزیابی شود (۸). همانند سایر روش های آگلوتیناسیون، عیار ۱/۶۴ و یارقیق تر، مثبت تلقی می گردد.

نتایج:

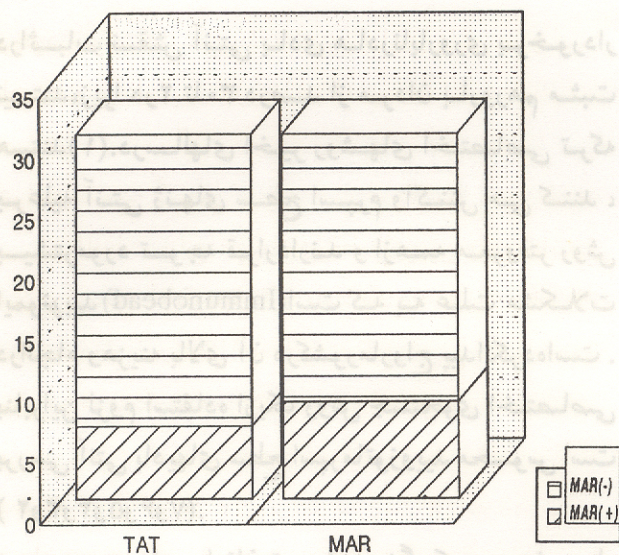
تعداد بیماران واجد شرایط ۱۲۹ نفر می باشد. دامنه سنی از ۲۱ تا ۵۸ سال و میانگین سن ۳۳/۸ سال با انحراف معیار ۶/۸ سال می باشد. معدل طول زمان ناباروری افراد ۶/۷ سال بوده است. سابقه واریکوسلکتومی در ۶۷ بیمار (۴۶٪) وجود داشت. در ۳۰ بیمار (۲۰٪) واریکوسل وجود داشت که در ۲۵٪ آنها آنتی بادی با ماروتات نشان داده شد، اما در ۱۱ بیمار که ارکیوپکسی شده بودند، آنتی

دراثبات نقش آنتی بادی هادر ناباروری برخوردار نیستند، زیرا در ۲ تا ۳۰ درصد از مردان بارور هم مثبت هستند (۱). در سالهای اخیر روشهای اختصاصی تر که بر علیه آنتی ژنهای سطح اسپرم واکنش می کنند، بیشتر مورد توجه قرار دارند و از همه معروفتر روش ایمونوبید (Immunobead) است که به علت مشکلات در انجام و هزینه بالای آن در کشور ما رواج پیدا نکرده است. بنابراین لزوم استفاده از یک روش جستجوی اختصاصی بررسی آنتی بادیهای سطح اسپرما توزوئید محسوس است (۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷).

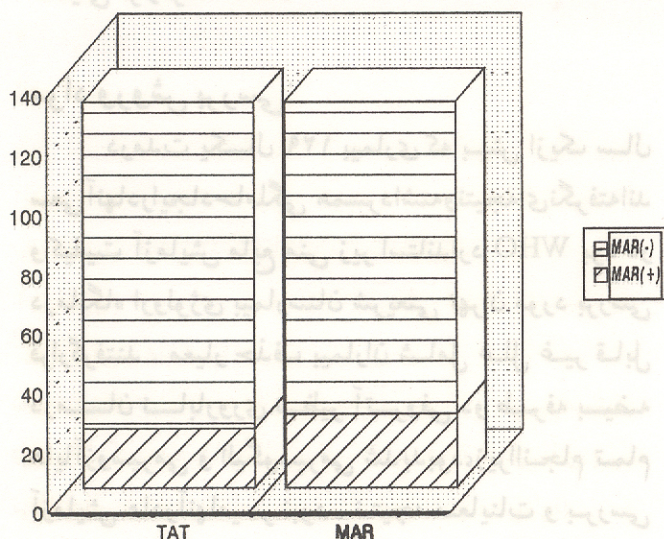
در جستجوی راهی ارزان تر و با پیچیدگی کمتر، روش مار (MAR) که یک روش اختصاصی بر علیه آنتی ژنهای سطح اسپرما توزوئید است، مورد کار آزمایشی قرار گرفت و درکنار آزمایش مار، روش تات (TAT) که میکرو آگلوتیناسیون و غیر اختصاصی است، نیز در مردان نابارور انجام شد (۸). در مطالعه فعلی نقاط قوت و ضعف هر دو روش که یکی اختصاصی و دیگری غیر اختصاصی است، مورد ارزیابی تحلیلی قرار گرفته است.

مواد و روش بررسی:

در مدت یکسال ۱۲۹ بیماری که بیش از یک سال سعی آنها در ایجاد حاملگی همسر داشته و نتیجه ای نگرفته اند و کیفیت آزمایش مایع منی زیر استاندارد WHO بود در درمانگاه ارولوژی بیمارستان شریعتی تهران مورد بررسی قرار گرفتند. معیار حذف بیماران شامل علل غیر قابل درمان ناباروری نظیر آتروفی دو طرفه بیضه های آژوسپرمی و الیگوسپرمی شدید بود، زیرا انجام تمام آزمایش هادر آنها میسر نبود. نتیجه معاینات و بررسی های اولیه در یک فرم اطلاعاتی وارد شد. در آزمایشگاه و بارعایت ۳ روز فاصله از آخرین مقاربت، نمونه های خون و منی جمع آوری شد. در این بررسی از کیفیت آزمایش مار

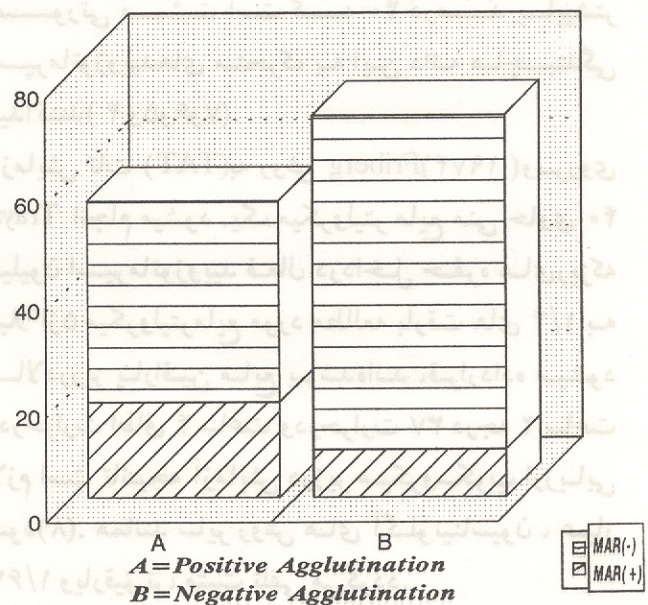


نمودار شماره ۲- بررسی آزمایش‌های تات و مار در واریکوسل با استفاده از Mann-whitney U test یک تفاوت معنی دار آماری برای داشتن آنتی بادی ضد اسپرم در افراد واجد یا فاقد چسبندگی اسپرم وجود دارد. در دارندگان چسبندگی ۳۴٪ و در غیر چسبندگی ۱۲٪ مار(ژ) مثبت بوده است (نمودار - ۳) (۹).



نمودار شماره ۳- میزان موارد مثبت و منفی آزمایش تات و مار بین اختلال حرکتی اسپرم و داشتن آنتی بادی ارتباط ضعیفی وجود دارد. بطوریکه ۲۷٪ کسانی که اختلال حرکت اسپرم داشتند، دارای آنتی بادی بودند، اما ۱۵٪ نیز

بادی مشاهده نشد. در یک نفر از ۳ بیمار که سابقه اورکیت داشتند، هر دو آزمایش ماروتات مثبت شد. پنج بیمار با سابقه وازکتومی و وازوپیدیموستومی نیز ماروتات مثبت داشتند. بین وجود آتروفی بیضه و قوام غیرطبیعی بیضه با مثبت شدن آزمایش ماروتات رابطه‌ای یافت نشد. در ۵۶ نفر (۳۸٪) بهم چسبندگی اسپرماتوزیدها مشاهده گردید. معدل شمارش اسپرم ۴۲/۸ میلیون درسی سی بود. در ۴۰٪ موارد شمارش زیر ۲۰ میلیون در هر میلی لیتر مکعب بود. بطور کلی آزمایش تات در سرم ۱۶/۳٪ بیماران مثبت شد. آزمایش مار در ۱۹/۴٪ افراد واکنش نشان داد (نمودار - ۱).



نمودار شماره ۱- آگلوتیناسیون و مار - ژ

برای بررسی ضریب همبستگی بین دوروش از Kendall, Spearmann استفاده شد و مقدار آن برای مار (ژ) یعنی مار آغشته به IgG و تات سرم برابر ۰/۶ و برای مار (ژ) و تات منی ۰/۳ برآورد شد ($P < 0.05$) (۹).

بین وجود واریکوسل و آنتی بادی ضد اسپرم با $P = 0.01$ ارتباط معنی دار وجود دارد و در ۲۵٪ کسانی که واریکوسل داشتند، آزمایش مار(ژ) و در ۲۲٪ آزمایش تات سرمی مثبت بود (نمودار - ۲).

چسبیدن دم به دم اسپرم است که آنهم از نظر بالینی حائز اهمیت نیست. در سایر موارد پاسخ های دو آزمایش همخوانی دارند (۳ و ۷ و ۶).

در میان روش های سرمی، هیچکدام از حساسیت و ویژگی کاملاً قابل قبول برخوردار نیستند با این وجود آزمایش های آگلوتیناسیون از میان آنها، پذیرفته تر هستند (۸).

روش های آگلوتیناسیون شامل ماکرو آگلوتیناسیون یا کایبریک (Kibric) و میکرو آگلوتیناسیون یا TAT (= Tray Agglutination Test) می باشد. در آزمایش تات برخلاف آزمایش مار تحرک اسپرم و تازگی آن از اهمیت نخست برخوردار نیست.

در تفسیر آزمایش های آنتی بادی ضد اسپرم می باید جانب احتیاط را رعایت کرد. مثبت بودن آن دلیل قطعی ناباروری نیست و شدت مثبت بودن، تعداد اسپرم و حرکت آن را باید در نظر داشت.

ایمونوگلوبین های مهم از نظر ایجاد ناباروری IgG و IgA هستند ولی از آنجاییکه تقریباً تمامی بیماران با آزمایش IgA مثبت، آزمایش IgG مثبت نیز دارند، بنظر می رسد که تنها انجام آزمایش IgG کافی خواهد بود.

از یافته های جالب این مطالعه مثبت شدن آزمایش مار در یک چهارم بیماران مبتلا به واریکوسل است ($P < 0.05$). شاید علت شکست درمان جراحی واریکوسل، همین عامل ایمونولوژیکی باشد.

یافته جالب دیگر وجود یک رابطه معنی دار بین چسبیدن اسپرماتوزوئیدها در اسپرموگرام و مثبت شدن آزمایش های ایمونولوژیک می باشد (ضریب همبستگی دوران یک) احتمال مثبت شدن آزمایش در کسی که در آزمایش منی داری چسبندگی اسپرم می باشد، ۳۴ درصد است.

بین اختلال حرکت و وجود آنتی بادی، ارتباطی ضعیف موجود است ($P > 0.05$). شاید با تعداد بیشتری از موارد بتوان ارتباط قویتری را نشان داد.

با وجود حرکت طبیعی نطفه آنتی بادی داشتند و این تفاوت معنی دار نیست ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه گیری:

مطالعات قبلی، رابطه ای قطعی را بین وجود آنتی بادی در گردش خون و ناباروری تایید نکرده است زیرا ۲۱ تا ۳۰ درصد مردان بارور مقادیر قابل توجه آنتی بادی ضد اسپرم در خون دارند و در ضمن وجود آنتی بادی در خون دلیل بودن آن در مایع منی نیست (۱). بنابراین آزمایشی از بیشترین ارزش تشخیصی برخوردار است که بتواند آنتی بادهای موجود در مایع منی و اختصاصاً بخشی از آن را که به اسپرم چسبیده است، نشان دهد. در این خصوص دوروش متداول می باشد. یکی تست ایمونوبید (IBT) و دیگری آزمایش ماریا (MAR). محاسن روش مار در برابری بی تی به قرار زیر است:

۱ - برخلاف آزمایش آی بی تی، مار احتیاج به مهارت فردی ندارد و در مطب و توسط یک میکروسکوپ معمولی و کیت مار قابل انجام است.

۲ - در آزمایش مار اسپرم شسته لازم نیست.

۳ - حساسیت مار نسبت به آی بی تی، بالاتر است. البته باید دانست که هنوز استاندارد قابل قبول همگان برای آنتی بادی ضد اسپرم وجود ندارد زیرا این آزمایش بیشتر یک ماهیت کیفی است تا یک کمیت مطلق.

۴ - اسپرم های متحرک کمتری برای آزمایش مار نسبت به آی بی تی، مورد نیاز است.

۵ - دانه های لاتکس در آزمایش مار همگی برابر هستند در صورتیکه دانه های پلی آکریلامید در آزمایش آی بی تی نابرابر بوده و با ذرات سیتوپلاسمی اشتباه میشوند.

۶ - آزمایش مار با میکروسکوپ نوری قابل انجام است اما آزمایش آی بی تی نیاز به میکروسکوپ دو مرحله ای دارد. تنها برتری آی بی تی بر مار، توانایی آن در نشان دادن

تنها ۲ نفر از ۱۲۹ نفر تحت بررسی دارای آزمایش مثبت مار (آ) و آزمایش منفی مار (ژ) بودند ولی در ۲۱ نفر از بیمارانی که آزمایش مار (ژ) مثبت بود، آزمایش منفی مار (آ) وجود داشت یعنی می توان گفت عملاً تنها انجام آزمایش مار (ژ) کافی است . ارتباط بین تات منی و تات سرم بامار (ژ) بررسی شد . چنانچه مار (ژ) را استاندارد فرض کنیم ، ارزش پیشگویی مثبت (PPV-Positive Predictive value) برای تات سرم ۶۲٪ و برای تات منی ۱۰۰٪ و ارزش پیشگویی منفی (NPV-Negative predictive value) برای تات سرم ۸۸٪ و برای تات منی ۸۳٪ می باشد . در صورت ادغام نتایج آزمایش تات سرم و منی باهم و مثبت تلقی کردن آن به شرط مثبت شدن هر کدام، PPV برابر ۷۶٪ و NPV برابر ۹۶٪ میشود . یعنی در صورت ادغام نتایج تات ، پاسخ های

قابل قبول تری ارایه میشود . اگر عیار تات بالاتراز $\frac{1}{64}$ را مثبت تلقی نماییم ، حساسیت (Sensitivity) آزمایش تات برابر ۵۲٪ و ویژگی (Specificity) آن برابر ۹۲/۵٪ است و در صورت ادغام نتایج آزمایش تات منی باتات سرم این حساسیت به ۸۵٪ و ویژگی به ۹۳٪ می رسد. یعنی با بررسی همزمان تات در سرم و منی به نتایج معقول تری می رسیم . شایان ذکر است که بدلیل موجود نبودن روش Gold Standard برای بررسی نتایج از ضریب همبستگی Spearman و Kendall استفاده شد. از مطالعه فعلی چنین نتیجه گیری میشود که برای بررسی های ایمنولوژیک مردان نابارور آزمایش مار مستقیم انتخاب اول می باشد . در شرایطی که انجام آزمایش مار مقدور نیست و یا حرکت اسپرم اشکال زیاد دارد ، انجام همزمان آزمایش های تات سرم و تات منی رامی توان جایگزین آن نمود.

REFERENCES:

- 1-Walsh.PC,Retic.AB,Stamey .TA,Vaughan.ED.Campbell's Urology ,6th ed.philadelphia ,W.B. Saunders CO. 1992,Vol1,PP.672-673.
- 2-Maclure,RD,et al.,Sperm check:A Simplified Screening Assessment for Immunologic Infertility .Fertil -Steril .1987,138:895 .
- 3-Hellestrom.WJG, et al:Antisperm Antibody Binds with Different Patterns to Sperm of Different Men.J.Urol .,1987,138:895.
- 4-Hellestrom.WJG,et al:A Comparison of Usefulness of Sperm MAR and Immunobead Test for the Detection of Antisperm Antibodies. Fertil Steril .1989,52(6):1027.
- 5-Rajah.SV,Parslow .JM,Howell .RJS,Hendry.WF,Comparison of Mixed Antiglobulin Reaction and Direct Immunobead Test for Detection of Sperm -Bound Antibodies in Subfertile Males .Fertil Steril .1992,57(6):1300.
- 6- Kay .DJ,Boettcher .B,:Comparison of the Sperm Mar Test with Currently Accepted Procedures for Detecting Human Sperm Antibodies ,Reprod Fertil Dev., 1992,4:175.
- 7-Ackerman .S.:An Evaluation of a Commercially Available Assay for the Detection of ASA.Fertil - Steril .1988,49(4):732.
- 8-Biggazzi .PE, Immunology of the Male Reproductive System.,2nd.ed.Dcker Co.1987 .PP.55-95.
- 9-Martin Bland .,An Introduction to Medical Statistics.,Oxford medical publication.,1989 PP217-236.

Clinical Evaluation of Mixed Agglutination Reaction (MAR) and Tray Agglutination Tests in Infertile Men

Mehrban,D.,MD

ABSTRACT:

Of the antisperm immunoglobulins ,only antisperm surface IgA an IgGs are significant clinically ,because many fertile men have antisperm antibodies present in their sera. Since the necessity of one form of sperm surface antisperm test(specific)is felt in our country,and Immunobead is not popular here for its high cost,Mixed Antiglobulin Reaction test was studied in a population of infertile male patients.mean while alongside ,the Tray Agglutination Test (TAT),a nonspecific assay ,was also evaluated.

During a one year period ,29 infertile male patients were studied sequentially at Dr. Shariati Urology Clinic .The study tests were Direct MAR against IgA and igG sperm surface antigens , and serum and semen TAT tests .Results show that a single Direct MAR test is capable of evaluating immunoinfertility .Besides , an IgG MAR is enough and there is probably no need for an associated IgA MAR test. When the MAR Kit is not available ,a TAT test of both serum and semen is probably as useful as a single MAR test .