مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۳۰۴-۲۹۳)

آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در زنان، مقایسه‌ای بین دو روش جهت تشخیص آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در سرم و موکوس سرویکال زنان نابارور

ساطین صالحی[۱]، حوری سپهری[۱] ، سیدشهاب الدین صدر[۲] ، یاسمن رسولی[۱]
۱. گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی پزشکی- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
(دریافت: ۸۱/۶/۱۰ ؛ پذیرش:۸۱/۹/۱۷)

چکیده

یک دسته از عوامل ایجاد کننده ناباروری، آنتی‌بادیهای ضد اسپرم هستند که علیه آنتی‌ژنهای سطحی اسپرم عمل می‌نمایند. تغییرات سطح اسپرم، عامل تولید آنتی بادیهای ضد اسپرم در زنان محسوب می‌شود. در این پژوهش جهت سنجش آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در سرم و موکوس سرویکال زنان نابارور (n = ۱۱۷) و بارور (n =٤٠) از روش TAT یا تست آگلوتیناسیون در پلیت و روش غیرمستقیم MAR استفاده شده است. هماهنگی مناسبی بین تست TAT و تست غیرمستقیم MAR برای IgG و IgA در نمونه های سرم به ترتیب با احتمال P <۰/۰۰۰۱ و P <۰/۰۲۲۱ و در نمونه های موکوس سرویکال P <۰/۰۰۰۰۱ و P <۰/۰۰۰۰۱ مشاهده شد. در بخش دیگری از این پژوهش، نتایج حاصل از محل اتصال آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در تست TAT و کلاس ایمونوگلوبولین توسط تست غیرمستقیم MAR برای IgG و IgA در سرم زنان نابارور نشان داد که بین کلاس ایمونوگلوبولین‌ها و محل اتصال آنتی‌بادیهای ضد اسپرم همبستگی معنی‌داری وجود ندارد. چنین پیشنهاد می‌شود که آنتی‌بادیهای ضد اسپرم دارای چند کلاس مجزا از ایمونوگلوبولین می‌باشند و همچنین وزن ملکولی متفاوت و جایگاههای مختلفی برای واکنش با آنتی‌ژن دارند.

واژه‌های کلیدی: *آنتی‌بادیهای ضد اسپرم، سرم، موکوس سرویکال، روش TAT، روش غیرمستقیم MAR.*

مقدمه

برای اولین بار دانشمندی به نام Meaker (۱۹۲۲) فعالیت آگلوتینه کننده اسپرم درسرم زنان نابارور را مشاهده کرد. بسکین (Baskin, 1932) زنی را به وسیله منی شوهرش ایمونیزه کرد. نتیجهٔ تجربه او، وجود یک عامل هومورال ضد اسپرم در پلاسمای خون زن بود که در حامله شدن او ایجاد اشکال می‌کرد. مک لارن (McLaren, 1964) نشان داد که ایمنی نسبت به اسپرماتوزوا با تلقیح آن به داخل پریتونئال گونه های ماده می‌تواند به تولیدمثل آسیب برساند. تولید آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در زنان و ارتباط آن با نازایی معمای حل نشده در فرایند تولید مثل است، به نظر می‌رسد که آنتی‌بادیهای ضد اسپرم نقشی در باروری داشته باشند، ولی مکانیسم یا مکانیسم‌هایی که در بدن والد ماده موجب تشکیل آنتی‌بادیهای ضد اسپرم می‌شوند هنوز کاملاً مشخص نشده‌اند (Karoly, 1991). اخیراً شواهدی نشان داده که تغییرات سطح اسپرماتوزوآ، به عنوان عاملی است که باعث تولید آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در زنان می‌شود. آنتی‌بادیهای سطح اسپرم والد نر، لنفوسیتهای والد ماده را فعال کرده و باعث تولید آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در آنها می‌شود (Witkin & Chaudhry, 1989). در سرم زنان نابارور حداقل دو نوع آنتی‌بادی بی‌حرکت کننده اسپرم وجود دارد، یکی، آنتی‌بادیهای ضد آنتی‌ژنهای پلاسمای منی و دیگری، آنتی‌بادیهای ضد آنتی‌ژنهای غشاء سلول اسپرم می‌باشد (Koyama & Kameda, 1991). آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در زنان باعث آگلوتیناسیون اسپرم و کاهش تحرک آن، مهار نفوذ اسپرم به داخل موکوس سرویکال از طریق بی‌حرکت ساختن اسپرم با واسطه سیستم کمپلمان، افزایش فاگوسیتوز اسپرم توسط ماکروفاژها در مجاری تولید مثلی، مهار نفوذ اسپرم به داخل اووسیت از طریق مهار گیرنده‌های آن، تداخل با رشد و تکامل طبیعی تخم لقاح یافته و کاهش جایگزینی جنین می‌شود(Munuce *et al.,* 2000; Hjort,1998; Menge, 1982).

در این پژوهش نشان داده می‌شود که هماهنگی مناسبی بین تستهای غیرمستقیم MAR و TAT جهت سنجش آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در هر دو نمونه سرم و موکوس سرویکال زنان نابارور وجود دارد، همچنین رابطه بین کلاس ایمونوگلوبولین و نوع آگلوتیناسیون اسپرمها مطالعه شده است.

مواد و روشها

عمل swim – up جهت تهیه آنتی‌ژن اسپرم:

یک نمونه منی مناسب از یک فرد دهنده سالم انتخاب کرده و پس از مایع شدن نمونه منی، حداقل ۱ میلی‌لیتر از آن را با ۱ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژیک ۹ در هزار مخلوط کرده و به

مدت ۵-۷ دقیقه با سرعت۲۵۰۰-۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. محلول رویی را دور ریخته و ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک به ته نشین اضافه می‌نمائیم و به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۳۷درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. در این مدت اسپرم‌های متحرک و سالم از ته نشین جدا شده و شناور می‌شوند. اسپرمهای موجود در محلول باید دارای تحرک ۷۰ درصد و تراکم ۴۰ میلیون اسپرماتوزوئید در میلی‌لیتر باشند (Shulman & Hu, 1992).

تهیه نمونه های موکوس سرویکال و سرم

جهت انجام این پژوهش از ۱۴۷ زن بارور و نابارور نمونه‌های سرم و موکوس سرویکال تهیه کردیم (با همکاری بیمارستان میرزاکوچک خان). موکوس سرویکال این زنان بایستی در فاز قبل از تخمک گذاری (۷۲-۴۸ ساعت) جمع‌آوری گردد، علت انتخاب این فاز برای این است که تراکم IgA در موکوس سرویکال در زمان تخمک گذاری نسبت به زمان قبل از تخمک‌گذاری کاهش می‌یابد که احتمالاً در اثر رقیق شدن موکوس سرویکال در زمان تخمک‌گذاری می‌باشد (Mashburn & Kutteh, 1994) . برای مایع کردن موکوس برابر حجم آن، محلول سرم فیزیولوژیک ۹ در هزار به آن اضافه کرده و به خوبی مخلوط می‌نمائیم، سپس نمونه‌ها را در فریزر ۲- درجه سانتیگراد نگهداری می‌کنیم. نمونه‌های سرم و موکوس سرویکال را به مدت۳۰دقیقه در بن ماری۵۶ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم تا کمپلمان آنها غیرفعال شود (Dondero & Lenzi, 1991).

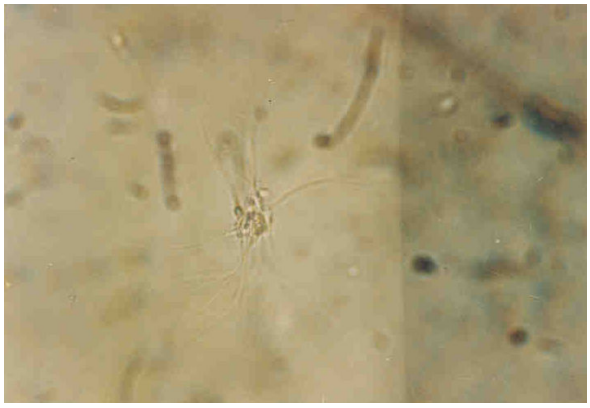
سنجش آنتی‌بادیهای ضداسپرم:

تستهایی نظیر تست آگلوتیناسیون درپلیت Tray-*987xsw2Agglutination Test (TAT) و تست غیرمستقیم MAR یا Indierct Mixed Antiglobulin Reaction برای تشخیص آنتی‌بادیهای ضداسپرم قابل قبول می‌باشند و دریک کارگاه بین‌المللی استاندارد شده‌اند (Kay & Bottcher, 1992).

تست آگلوتیناسیون در پلیت (TAT)

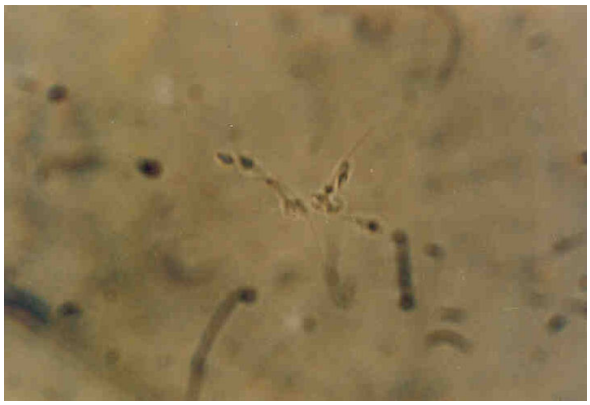
روش TAT اولین بار در سال ۱۹۷۴ توسط فریبرگ پیشنهاد شده است. از این روش جهت بررسی آنتی‌بادیهای آگلوتینه‌کننده در سرم، پلاسمای منی و موکوس سرویکال استفاده گردیده است زیرا بهترین روش میکروآگلوتیناسیون می‌باشد. ابتدا حفرات پلیت Micro-tray را با روغن

معدنی پوشش داده و هر ردیف از پلیت را به یک نمونه سرم و یا موکوس سرویکال اختصاص می‌دهیم، سپس رقت‌هایی از هر نمونه را به ترتیب در هر حفره آن می‌ریزیم. حجمی حدود ۴-۵ میکرولیتر از هر نمونه را در هر حفره ریخته و بعد ۱ میکرولیتر از آنتی‌ژن اسپرمی تهیه شده توسط روش Swim-Up به هر حفره می‌افزائیم. پلیت آماده شده را به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم و ایجاد آگلوتیناسیون را توسط میکروسکوپ اینورت مورد مطالعه و بررسی قرار می‌دهیم. درصد اسپرم متحرک آگلوتینه شده نسبت به درصد اسپرم متحرک آزاد اندازه‌گیری شده، شدت و نوع آگلوتیناسیون نیز ارزیابی می‌گردد. تیترهای مثبت از ۱/۱۶ به بعد برای نمونه‌های سرمی وتیترهای به بعد آگلوتیناسیون برای موکوس سرویکال قابل قبول است (Shulman & Hu, 1992). در بررسی آگلوتیناسیون، انواع آگلوتیناسیونهای سر به سر، دم به دم و مخلوط مشاهده می‌شود (شکلهای ۳و۲و۱)



شکل ۱-آگلوتیناسیون سر به سر در روش TAT

شکل ۲- آگلوتیناسیون دم به دم در روش TAT



شکل ۳- آگلوتیناسیون مخلوط در روش TAT

تست غیرمستقیم MAR

روش غیرمستقیم MAR می‌تواند کلاسهای اختصاصی ایمونوگلوبولین‌ها را در سرم و موکوس سرویکال تعیین کند. در این روش، آنتی ژن اسپرمی را به صورت Swim-up تهیه کرده و بعد نمونه‌های مورد نظر را با سرم فیزیولوژیک یک به شانزده رقیق می‌کنیم. ۵۰ میکرولیتر از نمونه غیرفعال و رقیق شده را با ۵۰ میکرولیتر از اسپرمهای فعال در یک چاهک پلیت میکروتیتر مخلوط کرده، یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. روی لام حجمهای زیر را کنار هم قرار می‌دهیم:

- ۱۰میکرولیتر از مخلوط اسپرم – سرم و یا اسپرم – موکوس سرویکال
- ۱۰میکرولیتر از ذرات لاتکس Sperm – MAR – IgG و یا
- ۱۰ میکرولیتر از ذرات لاتکس Sperm – MAR – IgA
- ۱۰میکرولیتر از آنتی سرم Sperm – MAR – IgG

بعد از ۲-۳ دقیقه با میکروسکوپ نوری، چسبیدن سر، گردن، دم و یا تمامی سلول اسپرم به ذرات لاتکس بررسی می‌گردد (شکل ۴). و درصد اسپرم چسبیده به ذرات لاتکس تعیین می‌شود. در نمونه موکوس سرویکال، اگر اسپرماتوزوای متحرک که به ذرات لاتکس چسبیده‌اند، ۱۰ درصد یا بیشتر از ۱۰درصد باشد جواب مثبت خواهد بود و نمونه سرم اگر مقدار چسبندگی اسپرماتوزوآ به ذرات لاتکس ۴۰ درصد یا بیشتر از ۴۰ درصد باشد نتیجه مثبت گزارش می‌شود (Hinting *et al.*, 1988).

شکل ۴- اتصال ذرات لاتکس به سلول اسپرم

نتایج

نمونه‌های سرم و موکوس سرویکال زنان بارور (n=۳۰) و زنان نابارور (n=۱۱۷) در ابتدا توسط تست TAT از نظر وجود آنتی‌بادیهای ضد اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و بعد از انجام تست TAT نتایج را براساس وجود یا عدم آنتی‌بادیهای ضد اسپرم به سه گروه تقسیم کردیم.

۱. افراد نابارور دارای آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در سرم یا موکوس سرویکال و یا هر دو (+n) (ASA =۱۹)
۲. افراد نابارور فاقد آنتی بادیهای ضداسپرم (ASA=۳۱) (-n)
۳. افراد بارور فاقد آنتی بادیهای ضد اسپرم (ASA=۳۰) (-n)

البته گروه دوم یعنی افراد نابارور فاقد آنتی‌بادیهای ضد اسپرم بعد از انجام روش TAT به طور اتفاقی انتخاب شده‌اند، و بعد توسط روش غیرمستقیم MAR هر سه گروه جهت تعیین کلاس ایمونوگلوبولین IgG و IgA بررسی شدند.

دربین افراد بارور فاقد آنتی‌بادیهای ضداسپرم (گروه سوم) بعداز انجام روش غیرمستقیم MAR فقط درسرم یک نفر با تیتر پایینی آنتی‌بادی ضداسپرم مشاهده شد، بنابراین تجزیه وتحلیل آماری فقط روی افراد نابارور انجام گرفته است. کلیه داده‌های خام طبق الگوهای آماری مناسب بااین طرح، آزمون Fisher's Exact Test مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت (Shulman & Hu, 1992).

الف) مقایسهٔ نتایج حاصل از سنجش آنتی‌بادیهای ضداسپرم توسط دو روش غیرمستقیم MAR و TAT در سرم زنان نابارور:

۱. با استفاده از آزمون فیشر نشان داده شد که ارتباط مثبت معنی‌داری بین نتایج تست غیرمستقیم MAR برای IgG و تست TAT در سرم زنان نابارور وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه بین نتایج تست غیرمستقیم MAR برای IgG با تست TAT در سرم زنان نابارور

Fisher's Exact Test P< 0.00001

IgG-MAR	TAT		Total
	(ASA^-)	(ASA^+)	
(ASA^-)	۳۲	۱	۳۳
(ASA^+)	۱	۱۶	۱۷
Total	۳۳	۱۷	۵۰

ASA+: افراد نابارور دارای آنتی بادیهای ضداسپرم
ASA-: افراد نابارور فاقد آنتی بادیهای ضد اسپرم
n: ۵۰ = تعداد کل زنان نابارور

۲. بررسی آماری نشان داده که همبستگی معنی‌داری بین نتایج تست TAT و تست غیرمستقیم MAR برای IgA در سرم زنان نابارور مشاهده می‌شود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه نتایج سنجش آنتی‌بادیهای ضد اسپرم توسط تست TAT و تست غیرمستقیم MAR برای IgA در سرم زنان نابارور

Fisher's Exact Test P< 0.0221

IgA-MAR	TAT		Total
	(ASA^-)	(ASA^+)	
(ASA^-)	۳۲	۱۳	۴۵
(ASA^+)	۱	۴	۵
Total	۳۳	۱۷	۵۰

ASA+: افراد نابارور دارای آنتی بادیهای ضداسپرم
ASA-: افراد نابارور فاقد آنتی بادیهای ضد اسپرم
n: ۵۰ = تعداد کل زنان نابارور

ب) مقایسهٔ نتایج حاصل از سنجش آنتی‌بادیهای ضداسپرم توسط دو روش غیرمستقیم MAR و TAT در موکوس سرویکال زنان نابارور.

۱. ارتباط مثبت معنی‌داری بین نتایج حاصل از سنجش آنتی‌بادیهای ضد اسپرم توسط دو روش غیرمستقیمMAR برای IgG و TAT در موکوس سرویکال زنان نابارور وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسهٔ بین نتایج تست غیرمستقیم MAR برای IgG و تست TAT در موکوس سرویکال زنان نابارور.

Fisher's Exact Test P< 0.00001

IgG-MAR	TAT		Total
	(ASA^-)	(ASA^+)	
(ASA^-)	۳۵	۱	۳۶
(ASA^+)	۱	۳	۴
Total	۳۶	۴	۴۰

ASA+: افراد نابارور دارای آنتی بادیهای ضداسپرم
ASA-: افراد نابارور فاقد آنتی بادیهای ضد اسپرم
n=۴۰: تعداد زنان نابارور

۲. مقایسه نتایج حاصل از سنجش آنتی بادیهای ضد اسپرم توسط روش TAT و تست غیرمستقیم MAR برای IgA در موکوس سرویکال زنان نابارور نشان داد که همبستگی معنی‌داری از نظر آماری بین نتایج وجود دارد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسهٔ بین نتایج تست غیرمستقیمMAR برای IgA و تست TAT در موکوس سرویکال زنان نابارور.

Fisher's Exact Test P< 0/00001

IgA-MAR	TAT		Total
	(ASA^-)	(ASA^+)	
(ASA^-)	۳۵	۱	۳۶
(ASA^+)	۱	۳	۴
Total	۳۶	۴	۴۰

ASA+: افراد نابارور دارای آنتی بادیهای ضداسپرم
ASA-: افراد ابارور فاقد آنتی بادیهای ضد اسپرم
n=۴۰: تعداد زنان نابارور

ج) مقایسهٔ نتایج حاصل از نوع آگلوتیناسیون در روش TAT و کلاس ایمونوگلوبولین روش غیرمستقیم MAR در سرم زنان نابارور.

بررسی محل اتصال آنتی‌بادیهای ضداسپرم در تست TAT و کلاس آنتی‌بادیهای ضد اسپرم IgG و IgA با استفاده از روش غیرمستقیم MAR نشان داد که IgG و IgA به نواحی مختلف

اسپرم متصل می‌شوند، ولیکن IgG و IgA بیشتر به ناحیهٔ سر اسپرم درمقایسه با نـواحی دیگـر متصل شده‌اند و رابطه مثبـت معنـی‌داری بـین نـوع آگلوتیناسـیون و کـلاس ایمونوگلوبولینهـا مشاهده نمی‌شود (جدول۵).

جدول ۵- مقایسهٔ محل اتصال آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در تست TAT و کلاس آنتی‌بادی ضد اسپرم در تست MAR سرم زنان نابارور.

Ind-MAR	TAT Agglutination Type			Total
	H – H	Mixed	T - T	
IgG	۱۲	۲	۱	۱۵
IgA	۳	ـــــ	۱	۴
Total	۱۵	۲	۲	۱۹

H-H: head positivity; Mixed: Mixed positivity; T-T: tail positivity

P<۰/۴۶۰۳ n.s. $\chi2$= ۱/۵۵۱۶

n: تعداد زنان نابارور = ۱۹

بحث

در پژوهش حاضر نشان داده شده‌است که هماهنگی مناسبی بـین تسـت غیرمسـتقیم MAR و تست TAT وجود دارد. با توجه به تیتر آنتی‌بادیهای ضداسپرم در روشهای غیرمستقیم ارتبـاط بالایی بین تست غیرمسـتقیم MAR بـرای IgG و IgA بـا تسـت TAT در سـرم زنـان نابـارور مشاهده می‌شود (جداول ۲و۱).

نتایج ناسازگاری در هر دو تست مشاهده می‌گردد، به طوریکـه بـین دو تسـت غیرمسـتقیم MAR برای IgG و تست TAT در ۵۰ نمونه سرم زنان نابارور فقـط دو مـورد نتیجـهٔ ناسـازگار مشاهده شده است، اولین مورد تیتر آگلوتینین آن ۱:۱۶ بود ولیکن در تست غیرمستقیم MAR برای IgG منفی گزارش شده است و دومین مورد یک نتیجهٔ TAT منفی مشـاهده شـد کـه در تست MAR مثبت بوده است. بین دو تست غیرمستقیم MAR برای IgA و تست TAT در ۵۰ نمونه سرم از زنان نابارور، ۱۴ نتیجهٔ ناسازگار مشاهده شد، تیتر آگلـوتینین ۱۳ نمونـه از رقـت ۱:۱۶ به بالا می‌باشد در حالیکه همان نمونه ها برای تست غیرمستقیمMAR از نظر IgA منفی گزارش شده‌اند. بـا توجـه بـه نتـایج بـه دسـت آمـده چنـین پیشـنهاد مـی‌شـود کـه احتمـالاً آگلوتیناسیون می‌تواند توسـط عوامـل دیگـر نظیـر عفونـت‌هـای باکتریـایی و آگلـوتینین‌هـای غیرایمونولوژیـک نیـز بـه وجـود آینـد. مـورول و همکـاران درسـال (۱۹۹۳) بـه ایـن عوامـل

غیرایمونولوژیک اشاره کرده و سئوالی می‌کند که آیا برخی از آگلوتینین‌ها بطور معنی‌دار بر عملکرد اسپرم و باروری تأثیر دارند؟ جواب این سئوال هنوز بطور دقیق داده نشده است (Moroll *et al.,* 1993). سولیس نشان داد که هماهنگی مناسبی بین تستهای مستقیم آگلوتیناسیون با تست MAR وجود دارد (Salis *et al.,* 2000).

دراین مطالعه، هماهنگی مثبتی بین تستهای غیر مستقیم MAR و TAT جهت تشخیص آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در موکوس سرویکال زنان نابارور مشاهده شده است (جداول ۳و۴).

فعالیت آنتی‌بادیهای ضد اسپرم کلاس IgG و IgA در موکوس سرویکال ۴۰ زن نابارور توسط تست غیرمستقیم MAR و تست TAT بررسی شده است و ارتباط معنی‌دار بین نتایج هر دو تست مشاهده گردیده است.

بر پایه تحقیق حاضر و گزارشات منتشر شده توسط پژوهشگران برای جلوگیری از داشتن نتایج مثبت و منفی کاذب توصیه می‌شود که تعداد تستها افزوده شود (Dondero & Lenzi, 1991).

در بخش دوم این پژوهش، نتایج حاصل از محل اتصال آنتی‌بادیهای ضد اسپرم در روش TAT و روش غیرمستقیم MAR برای IgG و IgA در سرم زنان نابارور نشان داد که رابطه معنی‌داری بین کلاس ایمونوگلوبولین و نوع آگلوتیناسیون اسپرمها وجود ندارد (جدول ۵). با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان پیشنهاد کرد که در ارتباط بین محل اتصال و کلاسهای مختلف ایمونوگلوبولین نتایج متفاوتی بدست می‌آید، احتمالاً این نتایج ناشی از مکانهای متفاوت واکنش آنتی ژن- آنتی‌بادی است، به طوریکه آنتی‌بادیهای ضد اسپرم دارای چند کلاس مجزا از ایمونوگلوبولین‌های IgA , IgG و IgM می‌باشند(Dondero & Lenzi, 1991). این ملکولها دارای وزن ملکولی متفاوتی بوده و تعداد مختلفی جایگاه برای واکنش با آنتی‌ژن دارند. آنتی‌بادیهای ضد اسپرم انسان معمولاً به آنتی‌ژنهایی متصل می‌شوند که در نواحی مختلف آکروزوم، منطقه عقب آکروزوم، قطعه استوایی، قطعه میانی، قطعه اصلی دم و نوک دم اسپرم قرار گرفته‌اند. بنابراین انواع مختلف ایمونوگلوبولین‌ها با آنتی‌ژنهای متفاوت اسپرم واکنش می‌کنند.

References

Baskin, M.Y. (1982). Temporary sterilization by the injection of human spermatozoa. A preliminary report. Am. J. Obstet. Gynecol., **24,** 892-897.

Dondero, F., Lenzi A. (1991). A comparison between the direct immunobead test and other tests for sperm antibodies detection. J. Endo. Invest. **14,** 443-449.

Gandini, L., Lenzi, A. (1995). Study of antisperm antibodies bound to the sperm cell surface and their relationship to circulating ASA. Am. J. Reprod. Immunol. **34,** 375-380.

Hinting, A., Vermeulen, L., Comhaire, F. (1988). The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially available for the detection of antisperm antibodies in serum.

Hjort, T. (1998). Do autoantibodies to sperm reduce fecundity? A mini review in historical perspective. Am.J.Reprod. Immunol: Sep. **40(3),** 215-22.

Fertil. Steril. **49(6),** 1039-44 .

Karoly, C., Hago, C.W., Shulmans, S. (1991). The relationship between female sexual practices and the development of antisperm antibodies. Fiertil. Steril,; **56,** 461-464 .

Kay, D.Y., Bottcher, B. (1992). Comparison of the sperm MAR test with currently accepted procedures for detecting human sperm antibodies. Reprod. Fertil. Dev. **4,** 175-181.

Koyama, K., Kameda, K. (1991). Recognition of carbohydrate antigen epitopes by sperm – immobilizing antibodies in sera of infertile women. Fertil. Steril. **56,** 954-59.

Mashburn, P.B., Kutteh, W.H. (1994). The role of antisperm antibodies in infertility. Fertil. Steril. **61,** 799-811.

McLaren, A. (1964). Immunological control of fertility in female mice, Nature 201, 582.

Meaker, S.R. (1992). Some aspects of the problem of sterility. Boston. Med. Surg. J., 187; 535.

Menge, A. Medley, N.E., (1982). The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm – cervical mucus interactions and subsequent fertility. Fertil. Steril, **38,** 439-446.

Morroll, D.R., Lieberman, B.A., and Matson, P.L. (1993). The detection of antisperm antibodies in serum : a comparison of the tray agglutination test, indirect immunobead test & indirect sperm check assay. International. J. Andrology, **16,** 207-213.

Munuce, M.Y., Berta, C.L., Pauluzzi, F., Caille, A.M. (2000). Relationship between antisperm antibodies, sperm movement, and semen quality. Urol Int., **65(4),** 200-203.

Shulman, S., Hu, Ch.-Y. (1992). A Study of the detection of sperm antibody in cervical mucus with a modified immunobead method. Fertil. Steril. **58(2),** 387-391.

Salis, E.A., Gatti, V.N., Brufman, A.S., Bouvet, B.R., and Provenzal, O.C. (2000). Advantages of a new kit for the determination of antisperm autoantibodies. Arch ESP Urol; May; **53(4),** 363-366.

Witkin, S.S., Chaudhry, A. (1989). Relationship between circulating antisperm antibodies in women & autoantibodies on the ejaculated sperm of their parents. Am. J. Obstet. Gynecol,; **161,** 900-903.