

ANTİSPERM ANTİKOR SAPTANMASINDA ELISA VE İNDİREKT İMMUNOFLORESANS YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF ELISA AND INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE METHODS IN DETECTING ANTISPERM ANTIBODIES

Ragıp BELGİN İclal BALCI Tekin KARSLIĞİL

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Anahtar Sözcükler: Antisperm antikor, ELISA, IFA

Key Words: Antisperm antibody, ELISA, IFA

ÖZET

Antisperm antikorlar (ASA) kadın ve erkek infertilitesinde rol oynayan immunojenik faktörlerdendir. Bu çalışmanın amacı, ASA saptanmasında iki yöntemin karşılaştırılmasıdır. Çalışmada 1997-1999 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin Üroloji ve Kadın Hastalıkları-Doğum servislerine ve özel muayenehanelere başvuran 25 kadın, 46 erkek toplam 71 infertil hastada Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve indirekt immunofloresans (IFA) yöntemleriyle ASA araştırması yapıldı. Kontrol grubu olarak son bir yıl içerisinde çocuk sahibi olmuş 19 erkek ve sekiz kadında aynı yöntemlerle ASA araştırıldı. İnfertil grupta ELISA ve IFA yöntemleriyle sırasıyla % 23.9 ve % 28.2 oranında antisperm antikor saptanırken kontrol grubunda bu oran sırasıyla % 11 ve % 7.4 olarak bulundu. Kontrol gruplarındaki kadınlarda ASA pozitifliği saptanmadı. Her iki yöntemle de kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek oranda ASA saptandı. ELISA ve IFA testleri arasında duyarlılık yönünden anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

SUMMARY

Antisperm antibodies (ASA) are immunogenic factors that play a role in male and female infertility. The purpose of this study was to compare two methods used to determine ASA. Forty-six men and 25 women, totally 71 patients, sent from Urology and Gynecology Services of Gaziantep University Medical Faculty and private offices were screened for ASA with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and indirect immunoflorescence test (IFA). The control group consisted of 19 men and eight women who had babies in the previous one year. In the infertile group with ELISA and IFA ASA rates were 23.9 % and 28.2 % and in the control group 11% and 7.4%, respectively. There was no seropositive woman in the control group. In both tests ASA were detected in high rates in infertile groups compared to the control group. There was no difference between the sensitivities of ELISA and IFA ($p>0.05$).

GİRİŞ

Doğurganlık döneminde olup çiftlerin istedikleri halde iki yıl içerisinde bebek sahibi olamaması infertilite olarak adlandırılmaktadır (1). Çocuksuz evliliklerde yaşanan psikolojik ve sosyolojik baskılar gözönüne alındığında, infertilite halen çözüm bekleyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde infertil çiftlerin oranı yakla-

şık % 15'tir (2). Bu nedenle her beş çiftten biri infertilite araştırmalarına gerek duymaktadır. Ancak bu sorunu çözmek her zaman kolay olmamaktadır. Çoğu zaman uzun süren ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir. Sorunun kaynağı her iki cinsiyette de irdelenmelidir. İnfertilitede sorunun % 40'ı erkeğe, % 40' kadına % 20'si ise her iki cinse birden dayanmaktadır (1). Tıp bilimi bu konuya her

geçen gün daha fazla eğilmekte, fertilizasyon olayını engelleyen tüm faktörleri ortaya çıkarıp çözüm yolları aramaktadır. Ancak kadın ve erkek tek tek ele alınmasına karşın aydınlatılamayan olgular olmaktadır. Nedeni belirlenemeyen infertilite olgularında immunojenik faktörlerin ön plana çıktığı belirtilmektedir (1). İmmünojenik faktörler içerisinde sperm hücrelerine karşı gelişen antikorların da (ASA) rolü vardır. Hem erkekte hem de kadında ASA tek başına infertiliteden sorumlu olabilir (1, 2). Bu nedenle ASA değerlendirmesi yapılmayan infertilite araştırmalarının eksik kaldığı bildirilmektedir. Antisperm antikorlar, serum, semen, foliküler sıvı, vaginal ve servikal sekresyonlarda saptanabilir ve IgA, IgG ve IgM yapısında olabilirler (3).

Testisler, vücutta çok iyi korunmuş organlardır. Spermatozoal antijenlerin dışarı çıkmasına ya da dolaşımdaki immünglobulinlerin veya immünolojik aktif hücrelerin içeri girmelerini önleyecek bir yapıya sahiptirler. Bu yapı, testiste bazal membrana oturmuş olan Sertoli hücrelerinin hem kendi aralarında hem de komşu germ hücreleriyle yapmış olduğu kan-testis bariyeridir (4). Ayrıca matür spermatozoa ilk defa pubertede ortaya çıktığı için o zamana kadar immün sistem tarafından tanınmaz (4, 5). Yapılan çalışmalar, spermin vücuda verilmesiyle erkekte şiddetli bir immün yanıtın ortaya çıktığını, bu yanıtın da üreme fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini göstermiştir (6). Bu nedenle erkeğin üreme fonksiyonlarının düzenli işleyebilmesi, bu zararlı immün cevabın önlenmesine bağlıdır. Kan-testis bariyerinin bozulmasına neden olan bir olay (vazektomi, genital sistemdeki obstrüktif olaylar, inmemiş testis, varikosel, testis biyopsisi, travma, torsiyon, kanser, eşcinsellik, genetik yatkınlık) ASA oluşumuna neden olabilir (7-9). Antisperm antikorlar; kadında peritoneal kavite, gastro-intestinal kanal ve genital kanalda epitelial bariyerin yıkılmasıyla (pelvik inflamatuvar hastalık, cinsel yolla geçen klamidya ve kandidaların yol açtığı infeksiyonlar gibi nedenlerle) gelişebilir ve sperm antijenleri genital kanal sekresyonlarında spesifik sekretuar IgA'nın üretimine neden olabilirler. Böylece serumda (daha çok IgG) ve genital kanal sekresyonlarında (daha çok IgA) ASA bulunabilir (6, 10). Bunlar, sperm transportunun inhibisyonunda ve fertilizasyon yeteneğinin azalmasında rol oynarlar. Antikor ile kaplı spermin servikal mukusta penetrasyon yapamadığı düşünülmektedir (11). Ayrıca, bu antikorlar, embriyo implantasyonunun engellenmesine, implante olmuş embriyonun mortalitesine ve spontan abortuslara neden olabilirler (12). Antisperm antikorlar erkekte spermatogonia evresinden itibaren spermatogenezise etki edebilir ve aspermatogenezis veya oligospermatogenezise yol açabilirler (11).

Antisperm antikor tanısında bugüne kadar birçok test kullanılmıştır. Ancak günümüze kadar uluslararası kabul görmüş standart bir test oluşturulamamıştır. Bugün hala kullanılan testler, serumda, semende, vajinal-servikal sekresyonlarda ASA saptayan ELISA, immünobead test (IBT), mikst antiglobulin testi (MAR), tray aglütinasyon testi (TAT), sperm immobilizasyon testi (SIT), sperm aglütinasyon testi (SAT), pasif hemaglütinasyon testi (PHT), immunofloresan (IFA) testleridir (3,13-15).

Bu çalışmada Eylül 1997-Kasım 1999 tarihleri arasında infertil olgulardan serum toplanarak, mikrobiyoloji laboratuvarında IFA ve ELISA yöntemleriyle ASA araştırılmış, iki yöntem arasındaki duyarlılık karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1997-1999 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji, Kadın Hastalıkları ve Doğum servisine başvuran ve özel muayenehanelerde izlenen 46'sı erkek ve 25'i kadın toplam 71 nedeni bilinmeyen infertil hastadan çalışma grubu oluşturuldu. Çalışmaya alınan hastaların yaşları 24-38 arasında olup, erkeklerin yaş ortalaması 27.5 kadınlarınki ise 24 olarak bulundu. Çiftler en az iki yıldır çocuk sahibi olmayı beklemekte ve evlilik süreleri 2-14 yıl arasında değişmekteydi. Hastaların, yaşları, evlilik süreleri, kaç yıldır çocuk istedikleri soruldu. Erkeklerde varikosel, inmemiş testis, travma, testis torsiyonu ve geçirilmiş operasyonlar araştırıldı. Çalışma grubuna alınan kadınlar normal ovulatuvar siklusları olan, infertilite için belirli bir neden saptanamamış olgulardı. Çalışma grubundaki erkeklerin sperm sayıları ve sperm motilite indeksleri normal sınırlar içerisindeydi. Çalışmaya, son bir yıl içerisinde çocuk sahibi olmuş 19'u erkek ve sekizi kadın toplam 27 kişi kontrol grubu olarak alındı. Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örnekleri santrifüj edilerek çalışılincaya kadar -20 °C'de saklandı. Alınan tüm serum örnekleri üretici firmanın önerisi doğrultusunda 1/50 sulandırılarak ELISA (SEROTEC, Almanya) ve 1/16 sulandırılarak IFA (SCIMEDX, Kanada) yöntemleriyle ASA yönünden araştırıldı (13-15). ELISA yöntemiyle yapılan çalışmada cut-off'un üzeri, IFA'da floresans saptanması pozitif olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Hastalardan alınan serum örnekleriyle yapılan ELISA testinde, 14'ü erkek (% 30,4), üçü kadın (% 12) toplam 17 kişide (% 23.9) ASA pozitifliği saptandı. Kontrol grubunda ise sadece üç erkekte (% 15.7) antisperm antikor gösterildi (Tablo 1). Kontrol grubundaki kadınlarda antisperm antikor saptanmadı.

Immunofloresans testi ile yapılan çalışmada infertil grupta 10'u erkek (% 21.7), üçü kadın (% 12) toplam 13 kişide (% 28.2) antisperm antikor saptandı. Kontrol grubunda ise sadece iki erkekte (%10.5) antisperm antikor saptandı (Tablo 2). ELISA testinde olduğu gibi kontrol grubundaki kadınlarda yine antisperm antikor saptanamadı.

Kan-testis bariyerinin bozulmasının ASA'nın oluşumunda önemli bir etken olması nedeniyle hastalar bu açıdan da değerlendirildi. Kırkaltı erkek hastanın, sekizinde varikosel, ikisinde testis torsiyonu, birinde inmemiş testis, birinde travma olmak üzere toplam 12 kişide kan-testis bariyerinin bozulmasına neden olabilecek durumlar vardı (Tablo 3). Bu hastaların beşinde (% 41.6) ASA pozitif bulundu. Böylece kan-testis bariyerini bozan durumlarda ASA daha yüksek olarak saptandı.

Çalışmada ASA saptanmasında ELISA ve IFA testleri karşılaştırıldı. İnfertil olan 46 erkek ve 25 kadın toplam 71 kişilik çalışma grubunda ELISA yöntemiyle 17, IFA yöntemi ile de 13 kişide ASA saptandı. On hastada ELISA ve IFA testleri birlikte pozitif bulunurken yedi hasta sadece ELISA ile, üç hasta da sadece IFA ile pozitif bulundu. İlk bakışta istatistiksel olarak ELISA testinde pozitiflik daha fazla görünmekte ise de bağımlı gruplarda chi-kare testi kullanılarak yapılan değerlendirmede ELISA ve IFA testleri arasında duyarlılık açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Antisperm antikor konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Düzey zaptaması, farklı dokularda farklı antikorların (IgG, IgM, IgA) saptanması, çalışılan popülasyonların sınırlı sayıda kalması ASA tanısında aşılması gereken engeller olarak görülmektedir. Nedeni belirlenememiş infertil olgularda ASA pozitifliği değerli bulursa da hala altın standart bir test oluşturulamamıştır. Ancak infertilitede başka bir neden bulunmadığı sürece ASA varlığını araştırmak önemlidir (16, 17). Çeşitli araştırmalar, korunmayan çiftlerin % 80'inin bir yıl içerisinde gebe kaldığını gösterdiğinden (18), iki yıl ve daha fazla süredir korunmayan çiftler infertil olarak kabul edilerek çalışmaya alındı. Bu çiftlerin evlilik süreleri 2-14 yıl arasında değişmekteydi. Yine yaş faktörünün fertilitte üzerinde olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar bulunduğundan hastalar genç yaş gruplarından seçildi (7).

Türkiye'de ASA sıklığını araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Güngör ve ark. (1), 1985 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde yaptıkları 2000 olgulu bir çalışmada IFA testi ile infertil erkeklerde %59.1, kadınlarda ise %35.4 oranında ASA pozitifliği saptamışlardır. Yergök ve ark. (2), 1990 yılında Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nde IFA yöntemi ile infertil erkeklerin %31.4'ünde, kadınların ise %27.5'inde ASA pozitifliğini göstermişlerdir. Kerse ve ark. (10), 1991'de infertil çiftlerde IFA yöntemi ile yaptıkları çalışmada, erkeklerde %30, kadınlarda %44.4 ASA saptamışlardır (10). Yurt dışında

Tablo 1. ELISA ile incelenen grubun antisperm antikor (ASA) sonuçları

Gruplar	ASA pozitifliği				ASA negatifliği				Toplam		Genel toplam
	Erkek		Kadın		Erkek		Kadın		E	K	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	N	n
İnfertil	14	30.4	3	12	32	69.6	22	88	46	25	71
Kontrol	3	15.7	0	0	16	84.3	8	100	19	8	27

Tablo 2. IFA ile incelenen grubun antisperm antikor (ASA) sonuçları

Gruplar	ASA pozitifliği				ASA negatifliği				Toplam		Genel toplam
	Erkek		Kadın		Erkek		Kadın		E	K	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	N	n
İnfertil	10	21.7	3	12	36	78.3	22	88	46	25	71
Kontrol	2	10.5	0	0	17	89.5	8	100	19	8	27

Tablo 3. Kan-testis bariyeri bozulmuş olguların antisperm antikor (ASA) dağılımı

ASA	Varikosel	Testis torsiyonu	İnmemiş testis	Travma	Toplam	
					N	%
Pozitif	3	1	1	-	5	41.6
Negatif	5	1	-	1	7	58.4
Toplam	8	2	1	1	12	100

yapılan çalışmalarda ise; 1999 yılında Yeni Delhi'de Kapoor ve ark. (19), infertil çiftlerde ELISA yöntemi ile kadınların %58.4'ünde, erkeklerin %33'ünde ASA saptamışlardır. Witkin ve ark. (9) infertil erkeklerde ELISA yöntemi ile ASA oranını %15 olarak bulmuşlardır. Mandelbaum ve ark. (20) yine ELISA yöntemini kullanarak infertil erkeklerde %10, infertil kadınlarda da %15 oranında ASA saptamışlardır. Haas ve ark. (21) ise IFA tekniğini kullanarak infertil erkeklerde %7, infertil kadınlarda ise %13 oranında ASA pozitifliği saptamışlardır. Görüldüğü gibi, farklı bölge ve farklı yöntemlerle yurt içi ve yurt dışında ASA pozitifliği kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu oranlar bu çalışmanın kiler ile uyumludur.

Çalışmada 46 erkek hastanın 12'sinde kan-testis bariyerinin bozulmasına neden olabilecek durum saptandı. Bu erkeklerin beşinde ASA pozitif bulundu (% 41.6). Bu oran, diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. 1992 yılında Bronson ve ark. (15)'nin yaptığı çalışmada vazektomi geçiren kişilerin serumlarında ASA pozitiflik oranlarının %70'e varabildiği belirtilmektedir. Witkin ve Toth (9) varikoseli olan ve olmayan iki grupta ELISA yöntemiyle ASA saptaması yapmış, varikoseli olmayan grupta ELISA yöntemiyle %15'inde ASA saptarken bu oran varikoselli grupta %32 olarak bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde Gubin ve ark. (22) tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada; varikosel, epididimit, orşit

gibi nedenlerle operasyon geçirenlerde kontrol grubuna göre %60'ın üzerinde ASA pozitifliği saptanmıştır (22).

Kontrol gruplarında erkeklerde IFA ile %10.5, ELISA ile %15.7 ASA pozitifliği saptanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda sağlıklı fertil kişilerde ASA pozitifliğine rastlamanın mümkün olduğu belirtilmektedir (21). Bu durumda infertilite araştırmalarında saptanan ASA pozitifliğinin ancak tek bulgu olduğunda daha değerli olduğu kabul edilmelidir.

Yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi, ASA infertil olgularda önemini yıllardır kaybetmemiştir. Çocuk sahibi olmak isteyen çiftler geniş kapsamlı bir araştırmaya alındıklarında antisperm antikor yönünden de sorgulanmaları gerekir. Sadece erkekte değil kadınlarda da antisperm antikor varlığı tek başına infertilite nedeni olabilmektedir. İnfertil olguların üçte birinde ASA pozitifliği saptanması nedeniyle, yapılan araştırmalarda ASA üzerinde durulmalıdır. Antisperm antikor incelemesi yapılmadan infertilite araştırmaları tamamlanmış sayılmamalıdır.

Çalışmada ELISA ve IFA testleri arasında duyarlılık yönünden anlamlı bir fark bulunmamasına karşın, IFA yöntemi için özel laboratuvar koşulları ve floresan mikroskoba ihtiyaç olması, bu testin uygulanmasında zorluklar yaratabilmektedir. ELISA'nın uygulama kolaylığı, ucuzluğu ve kantitatif sonuç vermeye olanaklı bir test olması, bu tür araştırmalarda tercih nedeni olarak görülmelidir.

KAYNAKLAR

1. Güngör S, Sağlam M, Gümrükçü E, Aşar G, Kerse M. İnfertilitede nedeni açıklanamayan erkek ve kadınlarda antisperm antikor sıklığı. *GATA Bülteni* 1983; 1201-10.
2. Yergök YZ, Ülgenalp I, Pabuçcu, Aşar G. İnfertil olguda antisperm antikor sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1990; 20: 40-5.
3. Mazumdar S, Levine A. Antisperm antibodies: Etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril*, 1998; 70: 799-810.
4. Jones WR. Immunologic infertility, fact or fiction. *Fertil Steril* 1980; 33: 577-86.
5. Bilgehan H. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. Ankara: Şafak Kitabevi, 1994: 343-56, 449-56.
6. Dündar I, Ekerbiçer N. İnfertilitede antisperm antikorların oluşum mekanizmaları. *Arşiv* 1997; 11-9.
7. Hass GG. Antibody mediated causes of male infertility. *Urol Clin North Am* 1987; 14: 539-50.
8. Yaman LS, Müftüoğlu YZ, Anafarta K, Beduk Y. *Erkek İnfertilitesi*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1990: 483-508.
9. Witkin SS, Toth A. Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid and infertility. *Fertil Steril* 1983; 40: 805-8.
10. Kerse I, Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G, Yücel N. Erkek ve kadın infertilitesinde ASA sıklığı. *Türk Hij Deney Biyol Derg* 1991; 48: 217-24.
11. Isojima S. *Sperm Antibodies Detected by Immobilization*. Washington, DC: Hemisphere Publishing Co, 1988.
12. Naz RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod* 1992; 46: 130-9.
13. Naz RK, Menge AC. Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility (review). *Fertil Steril* 1994; 61: 1001-13.
14. Eggert-Kruse W, Huber K, Rohr G, Runnebaum B. Determination of antisperm antibodies in serum samples by means of ELISA. *Hum Reprod* 1993; 8: 1405-13.
15. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D. Sperm antibodies: Their role in infertility. *Fertil Steril* 1984; 42: 171-83.
16. Helmerhorst FM, Finken MJJ, Erwich JJ. Detection assays for antisperm antibodies: What do they test? *Hum Reprod* 1999; 14: 1669-71.
17. Krapez JA, Hayden CJ, Rutherford AJ, Balen AH. Survey of the diagnosis and management of antisperm antibodies. *Hum Reprod* 1998; 13: 3363-67.
18. Güngör S, Sağlam M, Sağlam R, Aşar G. İnfertil çiftlerde antisperm antikor sıklığı. *Türk Üroloji Dergisi* 1985; 4: 365-74.
19. Kapoor A, Talib VH, Verma SK. Immunological assessment of infertility by estimation of ASA in infertile couples. *Indian J Pathol Microbiol* 1999; 4: 37-43.
20. Mandelbaum SI, Diamond MP, De Cherney AH. The impact of ASA on human infertility. *J Urol* 1987; 138: 1-8.
21. Haas GG Jr, Cines DB, Schreiber AD. Immunologic infertility: Identification of patients with ASA. *N Engl J Med* 1980; 303: 722.
22. Gubin D, Dmochowski R, Kutteh WH. Multivariate analysis of men from infertile couples with and without antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 157-60.