

3

Interazione tra spermatozoi e muco cervicale

3.1 Introduzione

La cervice uterina umana è una struttura cilindrica formata da pareti spesse, che si restringe verso l'orifizio uterino esterno. La mucosa endocervicale è costituita da un intricato sistema di cripte che, nel loro insieme, danno la falsa impressione di ghiandole. Queste cripte, formate da tasche di epitelio colonnare della mucosa cervicale, possono essere dirette in maniera obliqua, trasversa, o longitudinale; esse non si incontrano mai, sebbene possano essere biforcute o estese verso il basso. La struttura delle cripte cervicali varia con l'età, la fase del ciclo mestruale e gli stati patologici.

L'epitelio cervicale comprende differenti tipi di cellule secretorie che, nelle diverse parti della cervice, variano nella natura e nel numero di granuli secretori. Le secrezioni di queste cellule contribuiscono alla formazione del muco cervicale. Il ritmo della secrezione mucosa è funzione della attività secretoria e della responsività delle cellule secretorie agli ormoni circolanti.

Gli ormoni ovarici regolano la secrezione di muco cervicale; il 17 β -estradiolo (estrogeni) stimola la produzione di abbondanti quantità di muco acquoso, mentre il progesterone (progestinici) inibisce l'attività secretoria delle cellule epiteliali. La quantità di muco cervicale secreto mostra variazioni cicliche. Nelle donne normali in età fertile la produzione di muco varia dai 500 μ l a metà ciclo, a meno di 100 μ l durante tutti gli altri periodi del ciclo. Una piccola quantità di fluidi provenienti dall'endometrio, dalle tube e, talora, dal contenuto follicolare possono contribuire al pool del muco cervicale. Sono inoltre presenti leucociti e detriti cellulari provenienti dall'utero e dall'epitelio cervicale.

Il muco cervicale è, perciò, una secrezione eterogenea che contiene più del 90% di acqua. Esso presenta alcune caratteristiche reologiche: consistenza, *spinnbarkeit* (filanza) e *ferning* (cristallizzazione).

La consistenza è influenzata dalla situazione molecolare e dalla concentrazione di proteine e di ioni del muco cervicale. La consistenza del muco varia durante il ciclo: dal muco premenstruale altamente "viscoso" (che spesso è cellulato), si passa alla consistenza acquosa nella fase centrale del ciclo appena prima della ovulazione. La viscosità del muco ricomincia ad aumentare di nuovo dal momento in cui è avvenuta l'ovulazione.

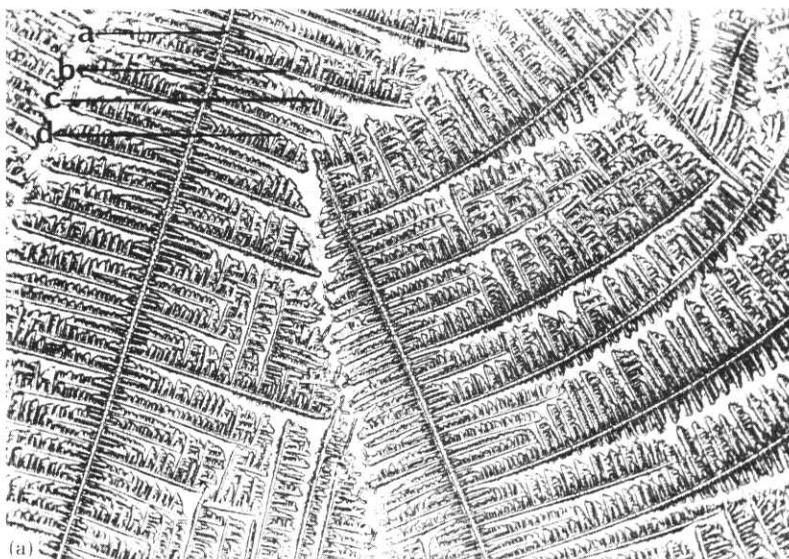
Lo *spinnbarkeit* (filanza) è il termine utilizzato per descrivere le caratteristiche di fibrosità, di filanza e di elasticità del muco cervicale.

Il *ferning* [cristallizzazione caratteristica del muco cervicale secondo una simmetria a forma di felce, *n.d.t.*] si riferisce al grado e alle caratteristiche di cristallizzazione osservati quando il muco viene essiccato su una superficie di vetro (Fig. 3.1).

Il muco cervicale è un idrogel, formato da una componente ad alta "viscosità" e da una componente a bassa "viscosità" che comprende elettroliti, composti organici e proteine solubili. La componente ad alta "viscosità" è costituita da una rete macromolecolare di mucina che è la principale responsabile delle proprietà reologiche del muco. La mucina cervicale è un sistema fibrillare formato da subunità che sono costituite da un *core* peptidico e da catene laterali di oligosaccaridi. Le alterazioni cicliche dei costituenti del muco cervicale possono influenzare la capacità penetrativa degli spermatozoi e la loro sopravvivenza. La penetrabilità agli spermatozoi del muco cervicale umano

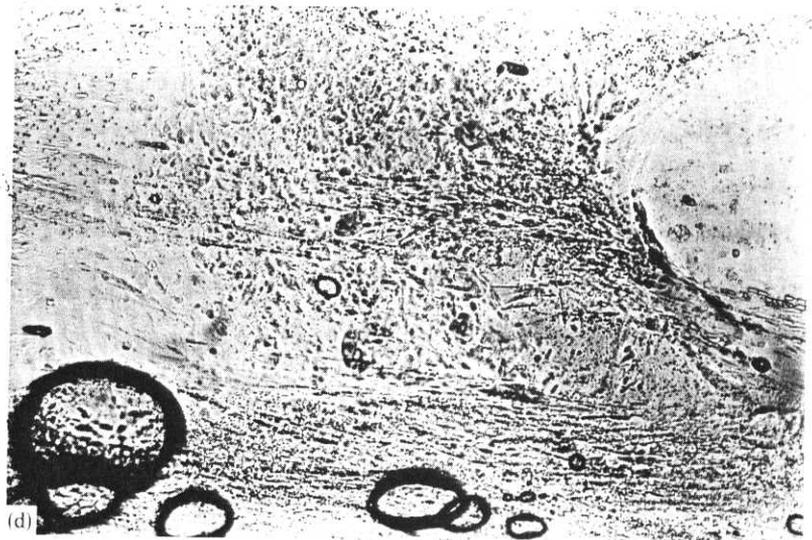
Fig. 3.1. Esempi di cristallizzazione con simmetria a felce del muco cervicale essiccato all'aria su un vetrino da microscopio (scala: 100 x). Il tipo di cristallizzazione può essere molto variabile, essendo legato, per esempio, allo spessore del preparato o al numero di cellule presenti. Inoltre un preparato può mostrare più di uno stadio di cristallizzazione: talora tutti gli stadi di cristallizzazione possono essere presenti nello stesso preparato.

(a) Cristallizzazione con punteggio 3; a, ramificazione primaria; b, ramificazione secondaria; c, ramificazione terziaria; d, ramificazione quaternaria. (b) Ramificazioni in prevalenza primarie e secondarie (punteggio 2) sono parzialmente presenti anche ramificazioni terziarie. (c) Cristallizzazione atipica (punteggio 1). (d) Assenza di cristallizzazione (punteggio 0). Le strutture tonde sono bolle d'aria.



inizia approssimativamente alla nona giornata di un normale ciclo e aumenta gradualmente per raggiungere un massimo in corrispondenza dell'ovulazione. La penetrazione degli spermatozoi in seguito inizia a diminuire ancora prima che siano evidenti dei cambiamenti delle caratteristiche del muco. Sono frequenti variazioni individuali per quanto riguarda il tempo e il grado di penetrabilità agli spermatozoi. Gli spermatozoi mobili *in vivo* possono essere guidati dalle linee di forza del muco cervicale alle cripte cervicali, dove possono essere trattenuti e rilasciati a ritmo lento nell'utero e nelle tube di Fallopio.

Alla cervice e alle sue secrezioni si possono attribuire le seguenti proprietà: (a) recettività alla penetrazione degli spermatozoi in corrispondenza dell'ovulazione e interferenza a tale ingresso negli altri periodi del ciclo, (b) protezione degli spermatozoi nei confronti dell'ambiente ostile della vagina e contro i rischi di fagocitosi, (c) completamento delle richieste energetiche degli spermatozoi, (d) effetto filtro (per es. selezione degli spermatozoi in base alle differenti



motilità: si veda Mortimer *et al.*, 1982; Katz *et al.*, 1990), (e) serbatoio a breve termine per gli spermatozoi, e (f) luogo di inizio della capacitazione degli spermatozoi.

Gli spermatozoi, quando sono nel muco, sono sospesi in ogni momento in un medium fluido. L'interazione degli spermatozoi con le secrezioni del tratto riproduttivo femminile è di importanza critica per la sopravvivenza e per la capacità funzionale degli spermatozoi. Al momento non esiste un metodo pratico per la valutazione degli effetti dei fluidi uterini e tubarici sugli spermatozoi, si può però facilmente raccogliere e studiare il muco cervicale. La valutazione dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale è perciò un importante criterio che deve essere incluso in ogni studio completo sull'infertilità.

3.2 Raccolta e conservazione del muco cervicale

3.2.1 Procedura per la raccolta

La cervice va evidenziata con uno speculum e l'orifizio esterno va delicatamente pulito con un tampone di cotone per rimuovere il pool esterno di contaminanti vaginali. Il muco cervicale va prelevato dall'endocervice con uno dei seguenti metodi. Si può aspirare il muco con una siringa da tuberculina (senza ago), una siringa da muco, una pipetta o un tubo di polietilene. Quando possibile, la qualità del muco dovrebbe essere valutata immediatamente dopo il prelievo, se ciò non è possibile, il campione dovrebbe essere conservato con cura fino a quando non sarà esaminato (Sezione 3.2.2).

Quando il muco viene raccolto per aspirazione, è importante standardizzare il modo con cui si applica la pressione di aspirazione agli strumenti per la raccolta (siringhe, cateteri, ecc.). L'aspirazione deve essere iniziata dopo che la punta dello strumento sia stata introdotta di circa 1 cm nel canale cervicale. L'aspirazione va poi continuata fino a quando si estrae lo strumento. Solamente prima di estrarre lo strumento dalla bocca esterna della cervice bisogna interrompere l'azione di aspirazione. Mentre si estrae lo strumento dal canale cervicale è consigliabile clampare il catetere per evitare l'accumulo di bolle d'aria o di materiale vaginale.

Quando la quantità o la qualità del muco cervicale siano insoddisfacenti, può esserne aumentata la produzione con la somministrazione, per 10 giorni, di 20-50 µg giornalieri di etinil estradiolo, iniziando dalla quinta giornata del ciclo. Il muco può essere raccolto in qualunque momento, 7-10 giorni dopo la somministrazione dell'etinil estradiolo. Questa procedura renderà più idratata, e quindi meno viscosa, la secrezione mucosa. Per quanto tale approccio possa essere utile per lo studio *in vitro* delle interazioni tra spermatozoi e muco cervicale, non rifletterà necessariamente la situazione della coppia *in vivo*, in cui non vengono somministrati ormoni.

3.2.2 Conservazione e mantenimento

Il muco può essere conservato all'interno della stessa siringa per tuberculina, in tubi di polietilene o in piccole provette, sigillate con un tappo o con carta paraffinata per impedirne la disidratazione. Si dovrà fare attenzione a ridurre al minimo la quantità di aria nel contenitore

per la conservazione. I campioni dovranno essere conservati in frigorifero a 4 °C per un periodo che non superi i 5 giorni. I campioni di muco andranno utilizzati, se possibile, entro due giorni dalla raccolta e andrà sempre registrato il tempo trascorso tra la raccolta e l'utilizzo. Non si devono eseguire test di penetrazione agli spermatozoi o prove reologiche su campioni di muco che siano stati congelati e scongelati.

3.3 Valutazione del muco cervicale

La valutazione delle caratteristiche del muco cervicale comprende la determinazione del valore di *spinnbarkeit* (filanza), del *ferning* (cristallizzazione), della consistenza e del pH. L'Appendice XXI mostra un modulo per la registrazione dei dati del post-coital test nel quale queste caratteristiche del muco cervicale sono registrate secondo lo schema ideato da Moghissi (1976), basato su quello proposto inizialmente da Insler *et al.* (1972). Il massimo punteggio per il muco cervicale è 15. Un punteggio superiore a 10, normalmente è indicativo di un buon muco cervicale capace di favorire la penetrazione degli spermatozoi. Mentre un punteggio inferiore a 10 può indicare un muco sfavorevole. Il punteggio è desunto dal volume del muco cervicale (Sezione 3.3.1) e da altre quattro variabili (da Sezione 3.3.2 a 3.3.5) che descrivono le sue caratteristiche. Il pH del muco non viene incluso nel punteggio totale del muco cervicale.

3.3.1 Volume

Alla quantità di muco cervicale viene assegnato il seguente punteggio:

- 0 = 0 ml,
- 1 = 0,1 ml,
- 2 = 0,2 ml,
- 3 = 0,3 ml o più.

3.3.2 Consistenza

La consistenza del muco cervicale è il fattore più importante che influenza la penetrazione degli spermatozoi. Durante la fase ovulatoria, a metà ciclo, non c'è resistenza alla progressione degli spermatozoi attraverso il muco cervicale, mentre il muco "viscoso", come quello che si osserva nella fase luteinica, forma una barriera impenetrabile. Detriti cellulari e leucociti presenti nel muco cervicale impediscono la migrazione degli spermatozoi. Si pensa che estese endocervicitis si associno ad una ridotta fertilità.

Alla consistenza del muco cervicale si attribuisce il seguente punteggio:

- 0 = muco premenstruale, compatto, altamente "viscoso",
- 1 = muco con viscosità intermedia,
- 2 = muco mediamente "viscoso",
- 3 = muco pre-ovulatorio (metà ciclo), acquoso, con "viscosità" minima.

3.3.3 Ferning (cristallizzazione)

Il *ferning* (Fig 3.1) viene valutato esaminando vari campi del preparato e viene espresso come il più alto grado di cristallizzazione che è tipico del campione secondo il seguente punteggio:

- 0 = mancanza di cristallizzazione,
- 1 = cristallizzazione atipica,
- 2 = cristallizzazione con ramificazioni primarie e secondarie,
- 3 = cristallizzazione con ramificazioni terziarie e quaternarie.

3.3.4 *Spinnbarkeit (filanza)*

Un vetrino coprioggetti o un secondo vetrino viene appoggiato, tenendolo trasversalmente, sul campione di muco e poi sollevato delicatamente. La lunghezza del filamento di muco cervicale costituito viene misurata in centimetri e classificata come segue:

- 0 = < 1 cm,
- 1 = da 1 a 4 cm,
- 2 = da 5 a 8 cm,
- 3 = 9 cm o più.

3.3.5 *Cellularità*

Una valutazione del numero di leucociti e di altre cellule presenti nel muco cervicale viene eseguita a 400 ingrandimenti (a volte chiamati "high power field" o HPF). I valori dell'area di un HPF standard sono spiegati nell'Appendice XXIII. Per uno spessore standard del campione di 100 micron, il fattore di conversione è 10 cellule/HPF uguale 500 cellule/mm³ (per es., per µl). Questi valori sono calcolati per l'uso di una lente oculare ad ampio campo con un diametro di 20 mm.

I valori per la classificazione delle cellule sono :

- | | |
|----------------------------|---|
| 0 = > di 20 cellule/HPF | o > 1000 cellule/mm ³ |
| 1 = da 11 a 20 cellule/HPF | o da 501 a 1000 cellule/mm ³ |
| 2 = da 1 a 10 cellule/HPF | o da 1 a 500 cellule/mm ³ |
| 3 = 0 cellule | |

3.3.6 *pH*

Il pH del muco cervicale dovrebbe essere misurato, *in situ* o immediatamente dopo la raccolta, con le cartine misuratrici di pH. Se il pH viene misurato *in situ*, si dovrà porre particolare cura nel misurare il pH correttamente, dato che il pH del muco esocervicale è sempre più basso di quello del muco del canale endocervicale. Si dovrà anche porre particolare cura per evitare contaminazioni con i secreti vaginali che hanno un pH acido.

Gli spermatozoi sono sensibili ai cambiamenti di pH del muco cervicale. Il muco acido immobilizza gli spermatozoi, mentre quello alcalino ne aumenta la motilità. L'eccessiva basicità del muco cervicale (pH superiore a 8,5) può, comunque, influire negativamente sulla vitalità degli spermatozoi. Il pH ottimale per la progressione e la sopravvivenza degli spermatozoi nel muco cervicale è tra 7,0 e 8,5 e rappresenta il range di pH del normale muco endocervicale nel periodo ovulatorio (metà ciclo). Un pH compreso tra 6,0 e 7,0 non è comunque incompatibile con la penetrazione degli spermatozoi.

In alcuni casi il muco cervicale può essere notevolmente più acido. Questo può essere dovuto sia ad una anomalia delle secrezioni, sia alla presenza di una infezione batterica (per es. *Lactobacillus*). Tale reperto non deve essere considerato essere un artefatto.

3.4 Interazione tra spermatozoi e muco cervicale

Il muco cervicale è idoneo alla penetrazione degli spermatozoi solo per un tempo limitato durante il ciclo mestruale. Il muco sottoposto all'azione degli estrogeni favorisce la migrazione spermatica. Il periodo di tempo durante il quale gli spermatozoi possono penetrare nel muco cervicale varia considerevolmente da una donna ad un'altra, e può variare nello stesso soggetto da un ciclo all'altro. Per ogni soggetto si dovrebbe perciò valutare tale variabilità per determinare il momento migliore in cui effettuare il test di penetrazione.

3.4.1 *Test in vivo (post-coital test)*

3.4.1.1 *Scelta del momento in cui effettuare il test*

I post-coital test dovrebbero essere effettuati il più possibile vicino al momento ovulatorio, che viene determinato in base ai tradizionali criteri clinici (per es. la lunghezza usuale del ciclo, la temperatura basale, le variazioni del muco cervicale, la citologia vaginale, e quando possibile il dosaggio plasmatico o urinario degli estrogeni e l'esame ecografico delle ovaie). Ogni coppia dovrà essere informata della necessità di astenersi dai rapporti sessuali nei due giorni precedenti a quello in cui si effettua il test. E' importante che ogni laboratorio esegua la valutazione del muco dopo un periodo di tempo standard dopo il coito. Questo periodo di tempo dovrà essere da 9 a 24 ore dopo il coito (Appendice XXI).

3.4.1.2 *Tecnica del post-coital test*

Introdotta in vagina uno speculum non lubrificato, viene poi aspirato un campione del pool del fornice vaginale posteriore utilizzando una siringa da tuberculina (senza ago), o una pipetta o un tubo di polietilene. Usando le varie siringhe o il catetere, si può raccogliere il campione di muco dal canale endocervicale (Sezione 3.2.1), il campione viene poi posto su un vetrino, coperto con un vetrino coprioggetti, ed esaminato con un microscopio a contrasto di fase. Si può ottenere uno spessore standard del campione utilizzando come supporto per il coprioggetti un grasso al silicone impregnato con microsferi di vetro di 100 μm di diametro. E' così possibile una valutazione standard della concentrazione degli spermatozoi nel muco (Appendice XXII).

3.4.1.3 *Campione proveniente dal pool vaginale*

Normalmente gli spermatozoi in vagina vengono uccisi entro due ore. Lo scopo dell'esame del campione vaginale è quello di assicurarsi che il liquido seminale sia stato realmente depositato in vagina.

3.4.1.4 *Campione dal canale cervicale*

Il numero di spermatozoi presenti nella parte inferiore del canale cervicale varia con il tempo trascorso dal rapporto. Entro 2-3 ore dopo il coito c'è un notevole accumulo di spermatozoi nella parte inferiore del canale cervicale.

Si raccomanda di esprimere la concentrazione di spermatozoi nel muco in valore standard (numero di spermatozoi/ mm^3), che è analogo al modo in cui si definisce la cellularità del muco (Sezione 3.3.5). Per questo è necessario calibrare il campo visivo del microscopio (Appendice XXII).

La motilità degli spermatozoi nel muco cervicale è classificata come segue: (a) motilità progressiva rapida; (b) motilità progressiva lenta lineare o non lineare; (c) motilità non progressiva; (d) spermatozoi immobili (Sezione 2.4.2).

In una coppia in cui la partner femminile sia normale e il partner maschile presenti buone caratteristiche del liquido seminale, dopo 9-24 ore dal rapporto si osservano comunemente più di 50 spermatozoi mobili (motilità di tipo "a" e "b") per HPF (400 x) (Moghissi, 1976, 1986). Questo valore equivale a più di 2500 spermatozoi/mm³. Un numero di 20 o più spermatozoi/HPF (> 1000/mm³) con motilità "a" può essere considerato soddisfacente. La presenza di meno di 10 spermatozoi/HPF (< 500/mm³), soprattutto quando si associa con movimenti lenti o circolari di tipo "b" è indicativa di una riduzione della capacità di penetrazione degli spermatozoi o di anomalie del muco cervicale.

3.4.1.5 Interpretazione

Lo scopo di un post-coital test non è solo quello di determinare il numero di spermatozoi attivi nel muco cervicale ma anche quello di valutare la sopravvivenza e il comportamento degli spermatozoi molte ore dopo il coito (ruolo di serbatoio). Quindi il modo migliore per valutare la longevità e la sopravvivenza degli spermatozoi è eseguire un test 9-24 ore dopo il coito.

Dopo tale intervallo di tempo la presenza di un adeguato numero di spermatozoi mobili esclude i fattori cervicali come possibile causa di infertilità.

Il post-coital test andrà ripetuto se il primo risultato è stato negativo o anormale. Se non si trovano spermatozoi, andrà chiesto alla coppia di confermare che siano realmente avvenute nella vagina l'ejaculazione e la deposizione di spermatozoi. Un test negativo può anche essere dovuto ad un calcolo impreciso del momento in cui effettuare il test. Un test condotto in anticipo o in ritardo rispetto al momento ovulatorio può dare risultati negativi anche in una donna fertile. In alcune donne il test può risultare positivo soltanto per 1 o 2 giorni durante l'intero ciclo mestruale. Quando non si possa determinare con un ragionevole grado di precisione il momento dell'ovulazione, può essere allora necessario ripetere alcune volte il post-coital test durante il ciclo o eseguire ripetuti test *in vitro*. Avendo presenti questi dati, il post-coital test può essere interpretato correttamente (Appendice XXI).

3.4.2 Test in vitro

Una valutazione dettagliata dell'interazione tra gli spermatozoi e il muco cervicale può essere ottenuta usando i test di penetrazione *in vitro*. Questi test si possono suddividere in tre categorie principali: (1) il test su vetrino, (2) il test di contatto tra spermatozoi e muco cervicale e (3) il test in tubo capillare. Le prime due tecniche sono semplici da eseguire, forniscono utili informazioni e sono descritte di seguito come aspetti routinari per la valutazione qualitativa del liquido seminale. Il test con tubo capillare è un tipo di analisi più sofisticata che fornisce una misura semi quantitativa del livello di penetrazione degli spermatozoi nel muco. Un protocollo per questo tipo di test è descritto in Appendice XXII.

I test *in vitro* devono essere eseguiti entro un'ora dalla raccolta del liquido seminale.

Quando esistano difficoltà nell'ottenere muco cervicale peri-ovulatorio (a metà ciclo) umano, in alternativa, per studi non direttamente connessi a diagnosi di infertilità, si possono utilizzare dei surrogati in gel. Il muco cervicale di bovino in estro presenta proprietà fisiche simili al muco cervicale peri-ovulatorio umano, e, gli spermatozoi umani possono facilmente penetrare in tale muco *in vitro*. Comunque, le caratteristiche qualitative di questa penetrazione differiscono da quelle che si osservano quando si utilizza muco umano. Il muco di bovino non è standardizzabile, e non è quindi un'affidabile alternativa al muco umano.

In alternativa al muco cervicale umano, per i test di penetrazione, sono stati sviluppati dei gel di sintesi. Due di tali gel utilizzano come componente macromolecolare ialuronato (Wikland *et al.*, 1987; Mortimer *et al.*, 1990b) o poliacrilamide (Lorton *et al.*, 1981). Questi gel non riescono a replicare tutte le caratteristiche della interazione tra spermatozoi umani e muco cervicale umano. Per esempio, la penetrabilità degli spermatozoi non è influenzata dalla presenza di anticorpi adesi allo spermatozoo, tale problema è presente anche nel muco di bovino. Quando tali gel sono inseriti in un tubo capillare la loro microstruttura non è sufficientemente lineare da fare progredire gli spermatozoi lungo l'asse maggiore del tubo. Di conseguenza gli standard qualitativi per interpretare la penetrazione degli spermatozoi differiranno da quelli rilevati nel muco umano.

3.4.2.1 *Test su vetrino semplificato*

Una goccia di muco cervicale va posta su un vetrino ed appiattita con il coprioggetti (22 mm x 22 mm). Si può standardizzare lo spessore del preparato utilizzando del grasso al silicone con sfere di vetro di 100 µm di diametro come supporto del coprioggetti (Sezione 3.4.1.2.; Appendice XXIII). Si depone una goccia di liquido seminale su ciascun lato, a contatto col bordo del vetrino coprioggetti in maniera che il liquido seminale penetri sotto il coprioggetti per capillarità. In questo modo si ottiene una evidente interfaccia tra liquido seminale e muco cervicale.

Il vetrino così preparato va incubato per 30 minuti a 37 °C in termostato umidificato.

All'interfaccia si sviluppano in pochi minuti delle proiezioni di liquido seminale digitiformi o falangi che penetrano nel muco. La maggior parte degli spermatozoi percorre questi canali digitiformi prima di entrare nel muco. In molti casi, un unico spermatozoo sembra guidare una colonna di spermatozoi nel muco. Una volta all'interno del muco cervicale gli spermatozoi si disperdono e iniziano a muoversi a caso. Alcuni ritornano verso l'interfaccia col liquido seminale, mentre la maggior parte migra profondamente nel muco cervicale fino a che non incontra la resistenza offerta da detriti cellulari o da leucociti.

3.4.2.2 *Interpretazione*

L'interpretazione di questo test è soggettiva perché è impossibile standardizzare le dimensioni e la forma dell'interfaccia tra liquido seminale e muco di un preparato su di un comune vetrino. Di

conseguenza si raccomanda che tale test sia utilizzato come valutazione qualitativa delle interazioni tra spermatozoi e muco.

Utili informazioni ricavabili da questo test sono le seguenti:

- (a) Gli spermatozoi penetrano nel muco e più del 90% sono mobili con un avanzamento evidente (risultato normale).
- (b) Gli spermatozoi penetrano nel muco ma non avanzano più di 500 μm (per es. la lunghezza di 10 spermatozoi) dall'interfacies tra liquido seminale e muco (risultato insufficiente).
- (c) Gli spermatozoi penetrano nel muco ma rapidamente si immobilizzano o presentano un tipo di movimento *shaking* (scuotente) (risultato anomalo).
- (d) Non avviene nessuna penetrazione di spermatozoi attraverso l'interfacies tra muco e spermatozoi. Le falangi possono formarsi o non formarsi, ma gli spermatozoi si aggregano lungo l'interfacies dal lato del liquido seminale (risultato anomalo).

Quando lo scopo del test è quello di comparare la qualità di diversi campioni di muco, si dovrà utilizzare un unico campione di liquido seminale con ottima concentrazione, motilità e morfologia. D'altro canto, quando si voglia valutare la qualità di diversi campioni di liquido seminale, si dovrà utilizzare uno stesso campione di muco cervicale per valutare la capacità degli spermatozoi di penetrare in esso.

3.4.2.3 *Il test di contatto tra spermatozoi e muco cervicale (SCMC test)*

Lo scopo di questo test è quello di individuare la presenza di anticorpi anti-spermatozoo adesi agli spermatozoi e/o nel muco cervicale. Il risultato di questo test indica anche fino a che punto gli anticorpi inibiscono la penetrazione e la migrazione degli spermatozoi.

Il SCMC si effettua ponendo una piccola quantità (da 10 a 50 μl) di muco cervicale pre-ovulatorio e una quantità approssimativamente uguale di liquido seminale ad una estremità di un vetrino da microscopio. I due campioni vanno poi accuratamente mescolati. Un'altra goccia dello stesso campione di liquido seminale viene posta all'altra estremità del vetrino. La miscela muco-liquido seminale e la goccia di liquido seminale vengono poi coperti con i coprioggetti. Il preparato viene conservato a temperatura ambiente in una capsula di Petri umida. Dopo 30 minuti si conta la percentuale di spermatozoi che si muovono con rapidi movimenti di *shaking* (scuotenti). Il campione di solo liquido seminale serve come controllo dell'attività degli spermatozoi. Gli spermatozoi immobili o con deboli movimenti di *shaking* non vengono contati. Vengono considerati far parte della frazione con movimenti *shaking* gli spermatozoi che si muovono anche lentamente in avanti o che mostrino una progressione con movimenti intermittenti in avanti.

3.4.2.4 *Interpretazione*

Un elevato numero di spermatozoi con movimenti di *shaking* indica che la maggior parte degli spermatozoi non riesce ad attraversare il muco cervicale e di conseguenza non riesce ad arrivare all'ovocita.

I risultati si classificano nella seguente maniera:

- (a) Negativo: 0-25% di *shaking*.
- (b) Debolmente positivo: 26-50% di *shaking* (il test andrà ripetuto).
- (c) Positivo: 51-75% di *shaking*.
- (d) Fortemente positivo: 76-100% di *shaking*.

Quando si ha un SCMC test fortemente positivo utilizzando il liquido seminale del marito ed il muco cervicale della moglie, andrà eseguito un test di controllo, utilizzando un liquido seminale e un muco cervicale di donatori, per stabilire se gli anticorpi coinvolti sono presenti nel liquido seminale o nel muco cervicale.

Un elevato numero di spermatozoi con movimenti di *shaking* è, nella maggior parte dei casi, dovuto agli anticorpi adesi agli spermatozoi e solo raramente è dovuto agli anticorpi anti-spermatozoo presenti nel muco cervicale.

Quando si esegue un SCMC test, si dovrà riportare anche il numero di spermatozoi immobili allo scopo di identificare altre cause di immobilizzazione degli spermatozoi diverse dallo *shaking*. Queste possono includere la presenza di anticorpi specifici anti-spermatozoi con citotossicità mediata dal complemento sia sulla superficie degli spermatozoi sia nel muco cervicale o, più comunemente, un effetto diretto dell'acidità del muco sugli spermatozoi.

3.4.2.5 *Il test del tubo capillare*

Si veda Appendice XXII.