

Artículo Original

Impacto del tratamiento con antibiótico sobre la calidad seminal y los marcadores químicos de glándulas accesorias sexuales masculinas en presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*.

Impact of antibiotic treatment on semen quality and chemical markers of male accessory glands in the presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*.

Lozano-Hernández Ricardo, Vivas-Acevedo Giovanny

Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG), Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida – República Bolivariana de Venezuela.

Recibido diciembre 2011 - Aceptado junio 2012

RESUMEN

Las infecciones genitales se han asociado con infertilidad masculina. Entre los microorganismos responsables de estas se han destacado *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* cuyos efectos sobre la calidad espermática son controversiales, y sobre la función de las glándulas accesorias masculinas existen pocas evidencias. En la primera etapa de este estudio se evaluaron 300 muestras de semen de hombres que asistían a la consulta de infertilidad, de acuerdo al cultivo microbiológico y a la detección de anticuerpos se agruparon en *M. hominis* (n=24) y *U. urealyticum* (n=18), y se compararon con el grupo sin infección (n=159). El grupo con *M. hominis* mostró descenso del test hiposmótico (HOST) ($p < 0,05$) y de α -glucosidasa neutra (AGN) ($p < 0,05$). El grupo con *U. urealyticum* mostró descenso de HOST, AGN ($p < 0,001$); aumento de los leucocitos ($p < 0,001$) y del pH en semen ($p < 0,05$). En la segunda etapa del estudio se evaluaron los pacientes que cumplieron tres ciclos de tratamiento con doxiciclina (n=28) y se compararon los datos pre vs post tratamiento. Se observó aumento de la movilidad espermática y AGN con descenso del ácido cítrico ($p < 0,001$). Al erradicarse *U. urealyticum* se observó aumento de movilidad espermática ($p < 0,001$), HOST ($p < 0,001$), AGN ($p < 0,001$) con descenso de leucocitos ($p < 0,05$) y pH seminal ($p < 0,05$). La movilidad espermática y la concentración de ácido cítrico en los dos grupos post-tratamiento fueron superiores al grupo sin infección ($p < 0,05$). Se considera importante diagnosticar y tratar

la infección seminal por *M. hominis* y *U. urealyticum* para evitar el efecto negativo de estas bacterias sobre el espermatozoide y las glándulas accesorias masculinas.

PALABRAS CLAVE

Espermograma, α -glucosidasa neutra, ácido cítrico, glándulas accesorias masculinas.

ABSTRACT

Genital infections have been associated with male infertility. Among the microorganisms responsible for these have been highlighted *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* whose effects on sperm quality are controversial, and the role of male accessory glands have very little evidence. In the first stage of this study, we evaluated 300 semen samples from men attending infertility consulting. According to microbiological culture and detection of antibodies they were grouped into *M. hominis* (n = 24) and *U. urealyticum* (n = 18), and compared with the uninfected group (n = 159). The group *M. hominis* showed hyposmotic (HOST) ($p < 0.05$) and neutral α -glucosidase (AGN) ($p < 0.05$) decreased. The group *U. urealyticum* HOST and AGN ($p < 0.001$) were lower; but leukocytes ($p < 0.001$) and pH in semen ($p < 0.05$) increased. In the second stage of the study data of patients who completed three cycles of treatment with doxycycline were compared vs pre-treatment. It was observed increasing in sperm motility and AGN with decreasing of citric acid ($p < 0.001$). At

eradicated *U. urealyticum* sperm motility ($p < 0.001$), HOST ($p < 0.001$), AGN ($p < 0.001$) was increased; with decreasing of leukocytes ($p < 0.05$) and seminal pH ($p < 0.05$). Sperm motility and concentration of citric acid in the two groups after treatment were higher than the group without infection ($p < 0.05$). It is considered important to diagnose and treat seminal infection by *M. hominis* and *U. urealyticum* to prevent the negative effect of these bacteria on the sperm and male accessory glands.

KEY WORDS

Semen analysis, neutral α -glucosidase, citric acid, male accessory glands.

INTRODUCCIÓN

El impacto de la infección genital sobre la fertilidad masculina ha sido debatido durante varias décadas sin que se hayan logrado conclusiones definitivas [1-3]. Por una parte, se ha considerado la dificultad de aislar algunos patógenos en semen [4], los resultados negativos a los cultivos *in vitro* probablemente se asocian a la acción bacteriostática de algunos componentes presentes en el plasma seminal que limitan el crecimiento microbiano [5]. Por otra parte, los síntomas de muchas infecciones genitales a menudo pasan desapercibidos, aun cuando se propaga la infección [4]. Contribuye también a este problema el uso frecuente de antibióticos de manera inadecuada e indiscriminada, sin que se realice un diagnóstico microbiológico previo, por lo que no se identifica el microorganismo causal, no se administra la terapéutica específica, ni se controla posteriormente la efectividad de la misma [6].

La Organización Mundial de la Salud [7] define infección del tracto masculino cuando se demuestra una concentración de bacterias superior a 10^3 UFC/ml, la presencia de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*; o si la concentración de leucocitos en semen es $\geq 10^6$ /ml (leucocitospermia). Diversos microorganismos se han identificado en el semen de hombres infértiles donde se destacan: *U. urealyticum*, *C. trachomatis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *N. gonorrhoeae* entre otros [8-10]. Sin embargo, la presencia de *Staphylococcus* o *Streptococcus* sigue generando dudas en relación a la patogenicidad, ya que su presencia en semen puede deberse también a contaminación o colonización [11].

Al Sweih y col. (2011) señalan que la frecuencia de *M. hominis* y *U. urealyticum* en el semen de hombres

infértiles es superior a la de hombres fértiles. En relación a la calidad seminal de hombres infértiles con *M. hominis* se ha observado aumento del pH seminal y la leucocitospermia sin presentarse otros cambios en los demás parámetros seminales [12]. En cuanto a la presencia de *U. urealyticum*, se ha asociado con disminución en concentración, movilidad [13,14], y formas normales espermáticas, pero no con leucocitospermia [16]. Por otra parte, Zeng y col. (2008) encontraron que en presencia de *M. hominis* y *U. urealyticum* los parámetros seminales clásicos no se alteraban, aunque observaron que otras pruebas de funcionalidad espermática como la prueba de penetrabilidad en moco cervical, el test hiposmótico (HOST) y la prueba de recuperación del *swim up* se encontraban anormalmente disminuidas [15].

Entre las especies de micoplasmas patógenos al humano se han resaltado *M. hominis* y *U. urealyticum*, los cuales colonizan el tracto genital del varón y entre sus manifestaciones clínicas se ha destacado la uretritis [16]. En relación a las uretritis, si no se tratan adecuadamente se hacen crónicas, generando inflamación silente del aparato genital que con el tiempo conduce al deterioro en la calidad seminal [17] e infección en las glándulas sexuales accesorias masculinas (IGAM) [18]. La IGAM ha sido localizada en epidídimo, vesículas seminales y próstata, unilateral y bilateralmente [18].

Los cambios seminales destacados en las epididimitis son astenozoospermia y baja secreción de los productos del epidídimo [19] pudiendo persistir aun después de la erradicación bacteriológica [16,17]. En infección de vesículas seminales se ha encontrado disminución del volumen seminal, como también de la concentración, la movilidad espermática, y la fructosa [20,21]; y en infección prostática se han encontrado niveles de ácido cítrico disminuidos [22] con aumento de la elastasa leucocitaria [23]. En relación a la presencia de leucocitos seminales, esta se asocia con infección genital cuando su concentración es $\geq 1 \times 10^6$ /ml [24]. No obstante, en ausencia de infección la concentración de leucocitos seminales tiende a ser mayor en hombres infértiles que en fértiles [25]; y no se observan elevados en presencia de *M. hominis* y *U. urealyticum* [9], por lo que la infección por *M. hominis* y *U. urealyticum* tiende a pasar desapercibida sin alterar los parámetros seminales clásicos.

Este estudio se realizó en dos etapas, en la primera se determinó la frecuencia de infección por *M. hominis* y *U. urealyticum* en muestras de semen de hombres que acudían a la consulta de infertilidad. En ellos se compararon los parámetros seminales, el HOST

y los marcadores químicos glandulares con los de hombres que resultaron negativos para *M. hominis*, *U. urealyticum* y demás microorganismos patógenos. En la segunda etapa en los sujetos que cumplieron el tratamiento con doxiciclina se les evaluaron los mismos parámetros antes y después del tratamiento. Los parámetros post-tratamiento se compararon con los del grupo sin infección.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 300 muestras de semen de hombres (20-57 años) que asistieron a la consulta de infertilidad al Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-República Bolivariana de Venezuela. Cada participante fue informado sobre la naturaleza, importancia, objetivos y alcances de la investigación, aquellos que decidieron participar voluntariamente, se les solicitó el consentimiento informado por escrito. Para el estudio se excluyeron pacientes clínicamente evaluados con hipogonadismo, varicocele, hidrocele o diabetes, o que estuvieran recibiendo tratamiento con antimicrobianos. El estudio fue realizado siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki para investigación en humanos reseñados en el Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT [26].

En la primera etapa del estudio, los individuos con cultivos positivos para *M. hominis* y *U. urealyticum* se compararon los parámetros seminales clásicos, el test hiposmótico y los marcadores químicos de glándulas accesorias con los de hombres que resultaron negativos para *M. hominis*, *U. urealyticum*, anticuerpos anti *C. trachomatis* y otros microorganismos patógenos, denominado grupo sin infección. En la segunda etapa del estudio a los sujetos con cultivos positivos para *M. hominis* y *U. urealyticum* se les indicó el tratamiento con 100 mg de doxiciclina/día vía oral sugerido por Vicari [19] para tratar la IGAM en tres ciclos de 14 días c/u con un intervalo de catorce días de reposo entre ciclo y ciclo. Previo a la indicación del tratamiento se verificó la susceptibilidad indicada en el antibiograma. De los pacientes seleccionados, 15 con *M. hominis* y 13 con *U. urealyticum*, cumplieron los tres ciclos de tratamiento y fueron evaluados de nuevo 7 a 15 días de haber cumplido el último ciclo.

Obtención y procesamiento de las muestras

A. Espermograma: Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación siguiendo las pautas establecidas por el quinto manual de la Organización Mundial de la Salud para los parámetros seminales clásicos, volumen, concentración, movilidad y morfología [24]. Para el test hiposmótico se incubó

semen en solución hipotónica de citrato de sodio y fructosa (145 mOsm/L) durante 30 minutos a 37°C, luego de la incubación se observaron las formas de espermatozoides hinchadas (positivos) con microscopio de contraste de fase [7].

B. Marcadores de glándulas accesorias masculinas

B.1. Fructosa: se determinó mediante la prueba de Seliwanoff, para lo cual empleamos resorcinol al 0,5% con HCl concentrado y se expresó en $\mu\text{mol/eyaculado}$ con un límite de referencia inferior (L.R.I.) de 13 $\mu\text{mol/eyaculado}$ [28,29].

B.2. Ácido cítrico: se determinó mediante reacción colorimétrica establecida en el método de Chambón y Roe que consistió en incubar el plasma seminal con anhídrido acético al 82% y piridina al 18% al frío. El producto de condensación de citrato en medio anhídrido se midió espectrofotométricamente y la concentración se expresó en $\mu\text{mol/eyaculado}$ como indicador de la función prostática [27,30]. Los valores de referencia para el ácido cítrico presentan discrepancias entre diversos autores. No se ha establecido un valor de referencia actual al mismo.

B.3. 1,4- α -glucosidasa neutra (AGN): se midió de acuerdo al método fotométrico descrito por Guérin y col. [31-33]. La actividad de AGN se calculó midiendo el producto de hidrólisis paranitrofenol tras 2 horas de incubación a 37°C y pH 6,8 con un límite de referencia inferior (L.R.I.) de 20 UI/eyaculado.

C. Evaluación microbiológica: Seguida la licuefacción se tomaron 1,5 mL de cada muestra de semen donde se destinaron 0,5 mL del mismo para cultivo en placa de bacterias aeróbicas y microaerófilas facultativas, y para el cultivo en pozos para *M. hominis*, *U. urealyticum*, *Candida albicans* y *Trichomonas vaginalis* (Mycoplasma System Plus, Diagnostici Liofilchem, Italy). Luego 1,0 mL de semen se sometió a centrifugación 1500 g durante 10 minutos para obtener plasma seminal y se conservaron en dos alícuotas de 200 μL c/u a -20°C, una para fructosa, ácido cítrico y AGN y otra para la determinación de anticuerpos IgA anti-Chlamydia (Sero ELISA, El Diagnóstico de Savyon, Beer-Sheva, Israel).

Las muestras de semen con volúmenes <0,5 mL se evaluaron en dos fases, primero análisis seminal y marcadores glandulares, en la segunda fase se solicitó una nueva muestra para el análisis microbiológico y detección de anticuerpos anti-Chlamydia IgA en un transcurso <15 días.

C.1. Cultivos en pozos de *M. hominis* y *U. urealyticum*: El semen fue diluido 1:10 con solución salina fisiológica estéril y sembrado en pozos con medio enriquecido A7 (Mycoplasma System Plus, Diagnostici Liofilchem, Italy). Las muestras diluidas

fueron incubadas a 37°C cubiertas con parafina líquida estéril durante dos días, con revisión cada 24 horas, el crecimiento fue verificado con un viraje de color de amarillo a rojo (tests de arginina y de urea, respectivamente) para concentraciones de 10^3 , 10^4 y 10^5 unidades formadoras de colonia (UFC/mL). El kit contenía pozos de identificación para *M. hominis* y *U. urealyticum*; con pozos individuales para los antibióticos doxiciclina, clindamicina, tetraciclina, eritromicina, claritromicina, azitromicina, pefloxacina, minociclina y ofloxacina que indicaban resistencia o susceptibilidad microbiana. La identificación, cuantificación de colonias y susceptibilidad se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes del kit de diagnóstico. La susceptibilidad a los antibióticos fue registrada para *M. hominis* y para *U. urealyticum*.

C.2. Cultivos en placas: para determinar la presencia de cocos, bacilos aeróbicos y microaerófilos facultativos se realizaron cultivos del sedimento seminal en placas de agar para el descarte de Enterobacterias, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus* sp. y *Staphylococcus* sp. Para ello se utilizaron 0,2 mL de semen en 1,8 mL de solución salina fisiológica estéril, cada muestra fue mezclada se centrifugó a 1.500 g durante diez minutos para descartar 1,8 mL del sobrenadante y 0,2 mL del sedimento obtenido fue resuspendido para el cultivo en placa con asa calibrada [5]. Los sedimentos se sembraron en 4 placas de agar: sangre 5% (5%CO₂), chocolate (5%CO₂), Thayer-Martin (5%CO₂), manitol salado y Mac Conkey, y se incubaron a 37°C durante 48 horas. A los cultivos positivos se les realizó su antibiograma específico de acuerdo al microorganismo aislado [34].

C.3. Determinación de anticuerpos chlamydiales:

C.3.1. Anticuerpos IgA (en semen) anti-Chlamydia: Se usó un kit comercial (Sero ELISA; El Diagnóstico de Savyon, Beer-Sheva, Israel). El procedimiento se realizó según las instrucciones del fabricante, previamente se diluyeron 10 µL de plasma seminal en 200 µL Buffer fosfato salino (1:21). Los controles positivos y negativos fueron incluidos en cada ensayo.

C.3.2. Anticuerpos IgG (en suero) anti-Chlamydia: Adicionalmente, a cada paciente el mismo día se le extrajeron 3 mL de sangre venosa con el fin de determinar anticuerpos asociados a infección crónica o pasada por *C. trachomatis*. Post coagulación, los sueros se obtuvieron por centrifugación a 1500 g durante 15 minutos y se guardaron a -20°C hasta el momento del análisis, siguiendo las mismas pautas sugeridas por el kit comercial para IgG anti-Chlamydia (Sero ELISA; El Diagnóstico de Savyon, Beer-Sheva, Israel) con el mismo procedimiento que

para el isotipo IgA. Para la interpretación de esta prueba, los valores de absorbancia por encima del cut-off para anticuerpos IgG: 0,832 (séricos) e IgA: 0,321 (seminales) se consideraron positivos para *C. trachomatis*.

D. Análisis estadístico: El análisis descriptivo de las variables categóricas se realizó a través de frecuencias simples y porcentajes simples. Se empleó la prueba de T-student para el análisis comparativo, tomando en cuenta un valor de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 10.0.

RESULTADOS

La evaluación microbiológica e inmunológica de los pacientes mostró que el 21,3% tenían presentes los anticuerpos anti-Chlamydia IgA y/o IgG. Se identificaron además 8 especies de microorganismos, de los cuales los más frecuentes fueron el *M. hominis* (8%) y *U. urealyticum* (6%) como se observa en la tabla 1. En el 3,3% de los pacientes se identificaron más de dos gérmenes (≥ 2) simultáneamente. Los individuos que se agruparon como *M. hominis* y *U. urealyticum* no tenían presente otro microorganismo ni anticuerpos anti-*C. trachomatis*.

Al compararse las características seminales de los grupos *M. hominis* y *U. urealyticum* con respecto al grupo sin infección no se encontraron diferencias significativas en el volumen seminal, morfología ni movilidad espermática, pero en hombres *M. hominis* HOST se observó disminuido ($p < 0,05$). En hombres con *U. urealyticum* se observó un aumento en la concentración de leucocitos ($p < 0,001$) con reducción del HOST ($p < 0,001$) (Tabla 2).

En la valoración química de los marcadores glandulares y del pH seminal se observó que el marcador de vesículas seminales (fructosa) no se alteró en presencia de *M. hominis* ni de *U. urealyticum*; el marcador de función prostática (ácido cítrico) disminuyó en presencia de *U. urealyticum* ($p < 0,05$) pero estaba elevado en el grupo con *M. hominis* ($p < 0,05$); el marcador epididimario (AGN) se encontró disminuido en los grupos *M. hominis* ($p < 0,05$) y *U. urealyticum* ($p < 0,001$). El valor del pH seminal se observó aumentado en el grupo *U. urealyticum* ($p < 0,05$) (Tabla 3).

La susceptibilidad de *M. hominis* y *U. urealyticum* a los diferentes antimicrobianos se muestra en la tabla 4. *M. hominis* y *U. urealyticum* fueron respectivamente más sensibles a doxiciclina (88,9% y 95,8%), pefloxacina (88,9% y 87,5%) y

minociclina (88,9% y 87,5%).

La tabla 5 muestra las características espermáticas, HOST, marcadores glandulares y pH de las muestras de los pacientes con cultivos positivos para *M. hominis* y *U. urealyticum* antes y después del tratamiento con doxiciclina, los resultados revelaron que el tratamiento con este antimicrobiano erradicó el microorganismo *M. hominis*; además, se observó aumento de la movilidad ($p<0,001$) y la AGN ($p<0,001$), y descendió el ácido cítrico ($p<0,001$), al comparar los valores de éstos parámetros con los reportados antes del tratamiento. Igualmente en los hombres a quienes se les erradicó *U. urealyticum* aumentó la movilidad espermática ($p<0,001$), HOST ($p<0,001$) y AGN ($p<0,0001$) y disminuyeron los leucocitos ($p<0,05$) y el pH ($p<0,05$) en semen. Dentro de los cambios post-tratamiento en los grupos con *M. hominis* y *U. urealyticum*, se observó que la movilidad espermática y el ácido cítrico fueron superiores a los de los individuos que consultaban por infertilidad sin infección ($p<0,05$).

TABLA 1
Frecuencia de las bacterias y anticuerpos anti-chlamydias identificados en los pacientes.

| | Nº de pacientes (n=300) | Porcentaje(%) |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------|
| Sin infección | 159 | 53,1 |
| Infección | 141 | 46,9 |
| <i>C. trachomatis</i> (IgG y/o IgA) | 64 | 21,3 |
| <i>M. hominis</i> | 24 | 8,0 |
| <i>U. urealyticum</i> | 18 | 6,0 |
| <i>Staphylococcus</i> sp. | 10 | 3,3 |
| <i>Streptococcus</i> sp. | 7 | 2,3 |
| <i>E. coli</i> | 3 | 1,0 |
| <i>Klebsiella</i> sp. | 3 | 1,0 |
| <i>Enterobacter</i> sp. | 1 | 0,3 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | 1 | 0,3 |
| ≥ 2 gérmenes | 10 | 3,3 |
| Total | 300 | 100 |

TABLA 2
Características seminales en hombres positivos para *M. hominis*, *U. urealyticum* y sin infección.

| | <i>M. hominis</i> n=24 | <i>U. urealyticum</i> n=18 | Sin infección n=159 |
|--|---------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Volumen seminal (mL) | 3,3±1,3 | 3,0±1,5 | 3,1±1,6 |
| Concentración espermática (10 ⁶ /eyaculado) | 218,6±225,7 | 157,7±141,1 | 196,5±166,6 |
| Morfología (% de normales) | 26,2±11,1 | 29,5±15,0 | 28,4±12,2 |
| Móviles progresivos (%) | 40,2±23,9 | 42,6±23,9 | 40,4±21,8 |
| HOST (%) | 49,6±16,2 ^a | 46,3±17,9 ^b | 56,7±22,6 |
| Leucocitos (10 ⁹ /mL) | 0,7±0,3 | 1,4±1,1 ^b | 0,6±0,5 |

Valores promedio ± desviación estándar. Móviles progresivos (rápidos + lentos), test hiposmótico HOST (%) ^a $p<0,05$; ^b $p<0,001$; T-student no pareado de una cola. Comparación de *M. hominis* y *U. urealyticum* vs grupo sin infección.

TABLA 3
Marcadores glandulares y pH en hombres positivos para *M. hominis*, *U. urealyticum* y sin infección.

| Marcador | <i>M. hominis</i> n=24 | <i>U. urealyticum</i> n=18 | Sin infección n=159 |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Fructosa (µmol/eyac) | 35,5±23,1 | 39,9±16,5 | 44,4±25,2 |
| Ac. cítrico (µmol/eyac) | 92,8±44,1 ^a | 61,6,9±12,0 ^a | 75,86±38,0 |
| α-glucosidasa (U/eyac) | 58,8±18,1 ^a | 46,5±9,7 ^b | 69,1±25,5 |
| pH | 7,8±0,3 | 8,1±0,4 ^a | 7,8±0,3 |

Comparación en muestras positivas para *M. hominis* y *U. urealyticum* vs grupo sin infección. ^a $p<0,05$; ^b $p<0,001$; T-student no pareado de una cola.

TABLA 4
Patrón de susceptibilidad de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* a los antimicrobianos

| | <i>Mycoplasma hominis</i> % Sensibilidad (n=24) | <i>Ureaplasma urealyticum</i> % Sensibilidad (n=18) |
|----------------|--|--|
| Doxiciclina | 88,9 | 95,8 |
| Clindamicina | 72,2 | 70,8 |
| Azitromicina | 61,1 | 58,3 |
| Pefloxacina | 88,9 | 87,5 |
| Minociclina | 88,9 | 87,5 |
| Ofloxacina | 77,8 | 58,3 |
| Eritromicina | 72,2 | 87,5 |
| Tetraciclina | 66,7 | 58,3 |
| Claritromicina | 61,1 | 79,2 |

TABLA 5
Características seminales y marcadores químicos glandulares de individuos antes y después del tratamiento con doxiciclina y de individuos sin infección.

| | <i>Mycoplasma hominis</i> | | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | | Sin infección n=159 |
|--|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|
| | Antes | Después | Antes | Después | |
| | n=15 | N=15 | N=13 | n=13 | |
| Volumen seminal (mL) | 3,4 ± 1,2 | 3,1 ± 1,5 | 3,2 ± 1,4 | 3,6 ± 2,0 | 3,0 ± 1,5 |
| Concentración (10 ⁶ /eyaculado) | 222,6±217,1 | 237,1±215,5 ^d | 150,7±152,5 | 144,7±131,8 | 154,7±141,1 |
| Morfología (% de normales) | 25,8±11,5 | 24,3±17,1 | 29,0±14,60 | 29,5±15,0 | 28,4±12,2 |
| Móviles progresivos (%) | 41,1±20,9 | 49,7±18,4 ^{b,c} | 44,9±23,7 | 49,6±13,1 ^{b,c} | 40,4±21,8 |
| HOST (%) | 49,6±16,2 | 50,1±15,0 | 48,1±19,2 | 53,1±15,6 ^a | 56,7±22,6 |
| Leucocitos (10 ⁹ /mL) | 0,7±0,4 | 0,6±0,4 | 1,5±1,1 | 0,8±1,0 ^a | 0,6±0,5 |
| Fructosa (µmol/eyac) | 36,7±21,8 | 37,1±26,6 | 38,9±17,1 | 40,0±20,7 | 41,0±19,0 |
| Ac. cítrico (µmol/eyac) | 95,7±41,0 | 80,7±27,7 ^{b,c} | 65,6±14,4 | 65,5±28,7 ^d | 44,4±25,2 |
| α-glucosidasa (U/eyac) | 54,8±11,2 | 69,1±29,9 ^b | 46,2±17,9 | 63,3±27,1 ^c | 61,9±25,5 |
| pH | 7,8±0,2 | 7,7±0,5 | 8,1±0,3 | 7,8±0,9 ^a | 7,8±0,3 |

Valores promedio ± desviación estándar. Concentración espermática en millones/eyaculado (10⁶/eyac). Grupos *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. pre-tratamiento vs post-tratamiento (erradicado) ^a $p<0,05$; ^b $p<0,001$; ^c $p<0,0001$ T-student pareado de una cola. Comparación de los grupos post-tratamiento *M. hominis* y *U. urealyticum* vs grupo sin infección ^p $p<0,05$; ^d $p<0,001$; T-student no pareado de una cola.

DISCUSIÓN

Los pacientes atendidos en la consulta de infertilidad tienen la presencia de *M. hominis* (8%), *U. urealyticum* (6%) o anticuerpos anti-*C. trachomatis* (21,3%), como microorganismos patógenos que alcanzan un tercio de los individuos que consultan por falla reproductiva.

El diagnóstico de *M. hominis*, *U. urealyticum* y *C. trachomatis* no se realiza mediante siembras en placas de agar como son los métodos usuales de identificación de bacterias en los análisis clínicos, por lo que requieren otras metodologías de identificación. La solicitud del espermocultivo por parte de los clínicos debería destacar la búsqueda de estos importantes gérmenes y los laboratorios ofrecer los métodos diagnósticos que cubran esta demanda para evitar que estas infecciones sigan pasando desapercibidas.

La frecuencia de estos tres microorganismos fue similar a la observada en otros estudios reportados [9,12]. Las muestras seminales positivas para *M. hominis* y *U. urealyticum* no mostraron diferencias significativas en cuanto a concentración espermática, volumen, morfología y movilidad con respecto a los sujetos infértiles sin infección antes del tratamiento, lo que coincide con el estudio de Al Sweih y col. (2011) [12]; sin embargo, el valor disminuido de HOST se observó en las muestras donde estaba presente *U. urealyticum* tal como lo observaron Zheng y col. (2008) [15]. HOST pone en evidencia el efecto negativo de la infección sobre la integridad de la membrana espermática.

Es importante considerar que si se realiza un espermograma y no se valoran los marcadores químicos de glándulas accesorias masculinas ni se procede al despistaje de *M. hominis*, *U. urealyticum* y de anticuerpos anti-*C. trachomatis*, estas infecciones tienden a pasar desapercibidas en estos sujetos considerados como infértiles sin causa aparente, dicha infección no solo afecta la calidad seminal sino tiene efectos negativos en el tracto genital de ambos miembros de la pareja [6].

El tratamiento con doxiciclina basado en el antibiograma reduce la infección de las glándulas accesorias masculinas, la cual se ha destacado en el hombre infértil [3,4,6,8]. Luego del tratamiento se observó aumento del marcador químico de función epididimaria, dicho órgano se asocia con la maduración y la adquisición de la morfología del espermatozoide [32-33]. Se observó a la vez el efecto positivo del tratamiento antimicrobiano sobre HOST, la reducción de los leucocitos y el aumento de la movilidad espermática al erradicarse *U. urealyticum*.

Aunque se han considerado los posibles efectos negativos de *U. urealyticum* sobre el espermatozoide, este puede relacionarse con infección del epidídimo y aumento del pH seminal. Aunque en el plasma seminal no se hallan definidos los factores absolutamente esenciales para la fecundación, está claramente establecido que la calidad de la secreción de las glándulas accesorias masculinas optimiza las condiciones para que el espermatozoide alcance buena movilidad, se transporte y sobreviva tanto en el plasma seminal como en el tracto genital femenino [35].

La IGAM se ha asociado con el descenso de sus marcadores específicos; paradójicamente se encontró en los hombres con *M. hominis* descenso de AGN y niveles aumentados del ácido cítrico. La mayoría de estos estudios apuntan a que *U. urealyticum* guarda asociación con la IGAM más que *M. hominis* [18,36,37]. Sin embargo, llama la atención un estudio reciente donde se demuestra la frecuencia elevada de *M. hominis* en hombres con cáncer prostático y se destaca la importancia de detectar *M. hominis* en el estudio de esta enfermedad [38].

Según los datos del antibiograma obtenidos en este trabajo, el tratamiento con doxiciclina, minociclina o pefloxacina ofrecería las principales opciones terapéuticas para erradicar *M. hominis* y *U. urealyticum* asociados a infertilidad si se tratan adecuadamente. Un estudio reciente demostró la alta susceptibilidad en ambas de las especies estudiadas a la doxiciclina [39]. Vicari [40] demostró la eficiencia de doxiciclina y ofloxacina para tratar la IGAM como causa importante de infertilidad. El resultado obtenido es estos pacientes sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *U. urealyticum* fue similar a la reportada por Farkas y col. (2011) [39].

Un aspecto de interés clínico es que la infección de las glándulas accesorias masculinas debería ser tratada de modo diferente a la uretritis no gonocócica, por lo que el tratamiento de las glándulas accesorias masculinas requeriría más tiempo de aplicación. Los marcadores químicos glandulares medidos en este estudio mostraron que la AGN por parte del epidídimo desciende significativamente ante la presencia de *M. hominis* y *U. urealyticum*, pero la selección del antibiótico debe hacerse en base al antibiograma para aumentar su eficiencia. Aun así, debe considerarse la limitada eficacia que pueden tener los antimicrobianos sobre las glándulas accesorias masculinas porque se trata de compartimientos anatómicos con barreras que pueden limitar su alcance como por ejemplo la hemato-prostática [40]; y las lesiones tisulares inflamatorias son mayores a medida que avanza el tiempo, por ejemplo las prostatitis responden más rápido al tratamiento

que las prostatitis y prostatitis-vesículo-epididimitis, es decir, se comprometen más glándulas accesorias masculinas a medida que avanza el tiempo [19]. Cabe destacar que algunos microorganismos tienden a encapsularse o que se adhieren con más fuerza al glicocálix de la matriz extracelular de la glándula, o probablemente los cambios del pH local de vesículas seminales (alcalino) o próstata (ácido), entre otros [41-46] limitan la eficacia antimicrobiana.

Estos hallazgos justifican plenamente la necesidad de incluir en la evaluación del hombre infértil el despistaje de *M. hominis*, *U. urealyticum* y *C. trachomatis*, como también la medición de marcadores químicos específicos de las glándulas accesorias masculinas, lo que permitirá aplicar la terapia más adecuada y eficiente.

CONCLUSIONES

Se concluye que *M. hominis* y *U. urealyticum* no alteran los parámetros seminales clásicos, pero el valor bajo de AGN y HOST permiten estimar los efectos negativos de estos microorganismos como posible causa de la IGAM en hombres que asisten a la consulta de infertilidad.

AGRADECIMIENTO

A los Ginecólogos Antonio Villavicencio y Adriana Rodríguez en la selección y terapéutica de los pacientes de este estudio, a la Licenciada Carmen Lozano por los análisis de Inmunoensayos y a los asistentes del CEDIEG Marilú Albarrán, Zonia Paredes y Héctor Picón.

RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Comhaire F, Mahmoud A, Depuydt C, Zalata A, Christophe A. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update*. 1999; 5 (5): 393-398.

[2] Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1995; 63 (6): 1143-1157.

[3] Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update*. 1998; 4 (6): 891-903.

[4] Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and

without leukocytospermia. *Fertil Steril*. 2007; 87 (5): 1087-1097.

[5] Alexander M, Cole E, Sørensen A, Martellini, Giwerzman A, Mörgelin M, Anneli M, Malm J, Birgitta J. The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins. *J Immunol*. 2008; 181 (5): 3413-3421.

[6] Center of Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guideline. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2006; 55 (RR-11): 37-42.

[7] Manual de procedimientos para el estudio del líquido seminal y moco cervical. Ginebra: OMS, 1992.

[8] Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *Infect Dis*. 2007; 8 (7): 129.

[9] Toth A, Lesser ML. Asymptomatic bacteriospermia in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 1981; 36 (1): 88-91.

[10] Villanueva C, Echavarría M, Juárez A. Bacteriospermia asintomática y esterilidad masculina. *Col Mex Urol*. 2003; 18 (4): 145-148.

[11] Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update*. 1998; 4 (6): 891-903.

[12] Al Sweih NA, Al Fadli AH, Omu AE, Rotimi VO. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* infections and seminal quality in infertile and fertile men in Kuwait. *J Androl*. 2011; 3. [Epub ahead of print]

[13] Shalika S, Dugan K, Smith R, Padilla S. The effect of positive semen bacterial and *Ureaplasma* cultures on in-vitro fertilization success. *Hum Reprod*. 1996; 11 (12): 2789-2792.

[14] Upadhyaya M, Hibbard B, Walker S. The effect of *Ureaplasma urealyticum* on semen characteristics. *Fertil Steril*. 1984; 41 (2): 304-308.

[15] Zheng J, Yu SY, Jia DS, Yao B, Ge YF, Shang XJ, Huang YF. *Ureaplasma urealyticum* infection in the genital tract reduces seminal quality in infertile men. *Zhonghua Nan KeXue*. 2008; 14 (6): 507-512.

[16] Zhang ZH, Zhang HG, Dong Y, Han RR, Dai RL, Liu RZ. *Ureaplasma urealyticum* in male infertility in Jilin Province, North-east China, and its relationship with sperm morphology. *J Int Med Res*. 2011; 39 (1): 33-40.

[17] Rusz A, Pilatz A, Wagenlehner F, Linn T,

Diemer T, Schuppe HC, Lohmeyer J, Hossain H, Weidner W. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol.* 2012; 30 (1): 23-30.

[18] Weidner W, Krause W, Ludwig M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update.* 1999; 5 (5): 421-432.

[19] Vicari E. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Hum Reprod.* 1999; 14: 2025-2030.

[20] Comhaire F, Vermeulen L, Pieters O. Study of the accuracy of physical and biochemical markers in semen to detect infectious dysfunction of the accessory sex glands. *J Androl.* 1989; 10 (1): 50-53.

[21] Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Viscosity-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *Int J Androl.* 2004; 27 (2): 94-100.

[22] Chen J, Xu Z, Zhao H, Jiang X. Citrate in expressed prostatic secretions has the feasibility to be used as a useful indicator for the diagnosis of category IIIB prostatitis. *Urol Int.* 2007; 78 (3): 230-234.

[23] Videla E., Blanco A., Galli M., Fernández-Collazo E. Human seminal biochemistry: fructose, ascorbic acid, citric acid, acid phosphatase and their relationship with sperm count. *Andrologia.* 1981; (13) 3: 212-214.

[24] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

[25] Barraud-Lange V, Pont JC, Pocate K, Kunstmann JM, Chalas-Boissonas C, Ducot B, Wolf JP. Seminal leukocytes and clinical outcomes with donor sperm insemination. *Fertil Steril.* 2011; 96 (6): 1320-1324.

[26] Briceño E, Suárez E, Michelangi C, Feliciangeli D, Ptaiza E, Mendible J. Código de bioética y bioseguridad 2002. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2da Edición. Venezuela.

[27] Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernandez R, Camejo MI. Markers of accessory sex glands function in men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Can J Urol.* 2011; 18 (5): 5884-5889.

[28] Al-Daghistani H, Hamad A, Abdel-Dayem M, Al-Swaifi M, Abu Zaid M. Evaluation of serum testosterone, progesterone, seminal antisperm antibody, and fructose levels among Jordanian males with a history of infertility. *Biochem Res Int.* 2010. Article ID 409640, 8 pages, 2010. doi:10.1155/2010/409640

[29] Lozano J, Vivas G, Muñoz M. Relationship between *Chlamydia trachomatis* infection and

biomarkers of accessory glands in infertile men. Reprinted from: papers Contributed to the 9th International Congress of Andrology. Barcelona (Spain), March 7-10, 2009. 187-190. Editors Ballescà J.L Lagarda and Oliva Virgil R. Medimond. International Proceedings.

[30] Jathar V, Hirwe R, Desai S, Satoskar R. Seminal fructose, citric acid and phosphatase levels and their relation to the sperm count in man. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1977; 21 (3): 186-190.

[31] Guérin J, Ali H, Rollet J, Souchier C, Czyba J. Alpha-glucosidase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J Androl.* 1986; 7 (3): 156-162.

[32] Fourie M, Du Toit D, Bornman M, Van Der M, Du Plessis D. Alpha-Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Syst Biol Reprod Med.* 1991; 26 (3): 139-141.

[33] Fourie M, du Toit D, Bornman MS, Wolmarans L, du Plessis D. Epididymal markers in an andrology clinic. *Arch Androl.* 1993; 31 (3): 209-215.

[34] Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009; 49 (11): 1749-1755.

[35] Abdelmula M, Al-Fadhil E, Badruldeen H. Biochemical markers in semen and their correlation with fertility hormones and semen quality among Sudanese infertile patients. *Afric Jour Bioch Res.* 2010; 4 (11): 255-260.

[36] Gallegos A. Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* sp. Su relación con la infertilidad masculina. *Bol Coleg Mex Urol.* 2003; 18 (3): 106-112.

[37] Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl.* 1993; 16 (1): 1-13.

[38] Barykova YA, Logunov DY, Shmarov MM, Vinarov AZ, Fiev DN, Vinarova NA, Rakovskaya IV, Baker PS, Shyshynova I, Stephenson AJ, Klein EA, Naroditsky BS, Gintsburg AL, Gudkov AV. Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. *Oncotarget.* 2012; (4): 289-297.

[39] Farkas B, Ostorházi E, Pónyai K, Tóth B, Adlan E, Párducz L, Marschalkó M, Kárpáti S, Rozgonyi F. Frequency and antibiotic resistance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in genital samples of sexually active individuals. *OrvHetil.* 2011; 152 (42): 1698-1702.

[41] Skerk V, Krhen I, Lisić M, Begovac J, Roglić S, Skerk V, Sternak SL, Banaszak A, Strugar-Suica J, Vuković J. Comparative randomized pilot study of

azithromycin and doxycycline efficacy in the treatment of prostate infection caused by *Chlamydia trachomatis*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24 (2): 188-191.

[42] Jameson, M. Clinical aspects of infections associated with male infertility: a review. *J R Soc Med*. 1981; 74 (5): 371-373.

[43] Comhaire FH. Concentration of pefloxacin in split ejaculates of patients with chronic male accessory glands infection. *J Urol*. 1987; 138: 828-830.

[44] Nickel JC, Costerton JW. Bacterial localization

in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate*. 1993; 23 (2):107-14.

[45] Jaiyeoba O, Lazenby G, Soper DE. Recommendations and rationale for the treatment of pelvic inflammatory disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9 (1): 61-70.

[46] Mahmoud A, J Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, Comhaire F. Seminal plasma alpha-glucosidase activity and male infertility. *Hum. Reprod*. 1998; 13 (3): 591-595.