
Mycoplasmas y anticuerpos anti-*Chlamydia* en semen de hombres infértiles y su relación con la calidad seminal y los marcadores de glándulas sexuales accesorias masculinas.

Ricardo Lozano-Hernández¹, Giovanny Vivas-Acevedo¹ y María Gladys Muñoz de Vera².

¹Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG), Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

²Departamento de Biología de los Organismos, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: infección, espermograma, marcadores bioquímicos de glándulas accesorias sexuales masculinas.

Resumen. La infertilidad masculina puede deberse a inflamación o infección del tracto genital entre otras causas. En el problema de la infertilidad masculina pueden estar implicadas las glándulas sexuales accesorias y la función espermática. En este trabajo se trata de asociar los gérmenes más frecuentes en semen de hombres infértiles incluyendo *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* con las características seminales, y los niveles de fructosa, ácido cítrico y α -glucosidasa neutra como marcadores de las glándulas sexuales accesorias masculinas. La detección de los anticuerpos indicó que *C. trachomatis* fue el germen de mayor prevalencia. Los anticuerpos (Acs) anti-*Chlamydia*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* se asociaron con descenso de los marcadores glandulares fructosa y α -glucosidasa. Por otra parte se observó aumento del pH y leucocitospermia en los pacientes con Acs anti-*Chlamydia*. La evaluación microbiológica y la bioquímica del semen orientarían más sobre la propagación de la infección y permitiría seleccionar la terapia más efectiva. Se observó que es importante la evaluación microbiológica y de los marcadores de glándulas accesorias sexuales masculinas en el semen para diagnosticar y tratar las infecciones masculinas.

Mycoplasmas and antibodies anti-*Chlamydia* in semen of infertile men and their relationship with seminal quality and markers of male accessory sex glands.

Invest Clin 2012; 53(2): 138 - 147

Keywords: infection, semen analysis, biochemical markers, male accessory sex glands.

Abstract. Male infertility may be due to inflammation or infection of the genital tract among other causes. Male accessory sex glands and sperm function may also be involved in the problem of infertility. This study tries to associate the most frequent bacteria in semen of infertile men including *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with the seminal characteristics and levels of fructose, citric acid and α -neutral glucosidase as markers of the accessory glands. Detection of antibodies anti *Chlamydia trachomatis* indicated that it was the most prevalent germ. Antibodies (Ab) anti-*Chlamydia*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* were associated with a decrease of the glandular markers fructose and α -neutral glucosidase. On the other hand, there were increased pH and leukocytospermia in men positive for antibodies anti-*Chlamydia*. Microbiological and biochemical evaluation of semen could orient more about the spread of infection and allow for the selection of the most effective therapy. We find that microbiological and glandular accessory markers assessments in semen are important to diagnose and to treat infections.

Recibido: 20-09-2011. Aceptado: 17-05-2012

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la infección de las glándulas sexuales accesorias masculinas ha tomado importancia en las últimas décadas, aunque sus efectos sobre los parámetros seminales clásicos y sobre el tracto reproductor femenino ha sido también tema de discusión (1-4).

La infección puede localizarse en una o más de las glándulas sexuales accesorias masculinas a nivel de epidídimo, vesículas seminales o próstata, tanto unilateral como bilateralmente (5). La infección masculina se ha asociado con cambios seminales como descenso en el volumen, la concentración y la movilidad espermática; además de cambios en los marcadores químicos de glándu-

las sexuales accesorias e incremento de las especies oxígeno reactivas (EROS) (6).

La infección de vesículas seminales se ha relacionado con: alteración de los niveles de fructosa, volumen seminal, y movilidad espermática (7, 8). Se ha demostrado que en infección prostática los niveles de ácido cítrico disminuyen (9) y guardan relación inversa con la elastasa leucocitaria (10). Por otra parte se ha asociado descenso de marcadores prostáticos con oligoastenoatozoospermia (10, 11). La epididimitis puede producir astenoatozoospermia y los productos secretados por esta glándula tienden a ser bajos, sin mostrar cambios en la concentración de leucocitos (11). El descenso de un importante marcador epididimario como la actividad de α -glucosidasa

neutra (AGN) se ha asociado con obstrucción del transporte espermático entre epidídimo y conducto eyaculatorio, en hipoandrogenismo, y durante o después de un estado de infección/inflamación (12, 13).

Se han encontrado diversos microorganismos en los cultivos seminales de hombres infértiles con y sin leucocitospermia donde se destacan *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Neisseria gonorrhoeae* entre otros (14-16).

A menudo las infecciones causadas *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son asintomáticas e inespecíficas (17-20). Se ha considerado a *Chlamydia trachomatis* (Cht) el microorganismo más común en las enfermedades de transmisión sexual hasta en un 40% de las parejas infértiles (21-22). Los anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* (Ac-antiCht) del iso-tipo IgA se han asociado con una respuesta inflamatoria del tracto genital masculino, pero no con alteraciones de los parámetros seminales (23). Se han encontrado títulos altos de IgA (Ac-antiCht) en suero de hombres infértiles; la IgG (Ac-antiCht) se ha correlacionado con baja movilidad, baja concentración espermática, teratozoospermia, y leucocitospermia (24-25).

Entre las especies de *Mycoplasma* se considera que *Ureaplasma urealyticum* afecta el contaje espermático y la movilidad, generando infertilidad (14, 26, 27), mientras que el impacto del *Mycoplasma hominis* sobre los parámetros seminales y la fertilidad han sido tema de discusión (14, 27).

U. urealyticum se ha detectado en el 33,7% de las muestras de semen de hombres infértiles, en las cuales se observó descenso de la α -glucosidasa neutra y de la calidad espermática, sin cambios en el volumen seminal, la fructosa ni la fosfatasa áci-

da (28). En otro estudio se observó teratozoospermia con aumento en la concentración de leucocitos y de especies oxígeno reactivas asociados a la presencia de *U. urealyticum* (29).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la calidad seminal y los niveles de marcadores químicos de glándulas sexuales accesorias en hombres infértiles positivos y negativos para la presencia de *Mycoplasmas*, otros gérmenes y anticuerpos anti-*Chlamydia*.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 300 hombres infértiles de edades comprendidas entre 20 y 57 años. Se consideraron infértiles porque no habían logrado concebir durante el transcurso de un año manteniendo relaciones sexuales frecuentes (2 a 3 veces por semana) sin el uso de métodos anticonceptivos. Los individuos asistieron por infertilidad primaria o secundaria al Centro de Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, para ser evaluados. Cada participante fue informado sobre la naturaleza, importancia, objetivos y alcances de la investigación. A 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. 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 (30).

Tanto las muestras de semen como de suero sanguíneo de los 300 hombres fueron muestras individuales de cada paciente. Se determinó la frecuencia de los microorganismos en semen y su relación con los pará-

metros seminales. Se compararon los marcadores químicos glandulares en los grupos con Ac-antiCh.t, *M. hominis*, *U. urealyticum* y sin infección.

Obtención y procesamiento de las muestras

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 el análisis de semen (31).

Seguida la licuefacción del semen se tomaron 1,5 mL de cada muestra, 1,0 mL se sometió a centrifugación 1500 g durante 10 minutos para obtener plasma seminal y se guardaron en dos alícuotas de 200 μ L c/u a -20°C para (A) la determinación de fructosa, ácido cítrico y 1,4 α -glicosidasa neutra. (B) Los 0,5 mL de semen restante se destinaron para cultivo en placa de bacterias aeróbicas y microaerófilas facultativas, cultivo en pozos para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans* y *Trichomonas* sp y (C) medición de los anticuerpos (Ac) IgA.

Los pacientes con volúmenes seminales muy bajos ($<0,5$ mL) se evaluaron en dos fases, primero el análisis seminal y los marcadores glandulares, y en la segunda fase se solicitó una nueva muestra para el análisis microbiológico y detección de Ac IgA antiCh.t en un transcurso <15 días.

Marcadores de glándulas sexuales accesorias masculinas

Fructosa: se determinó mediante la prueba de Seliwanoff, para lo cual empleamos resorcinol al 0,5% y HCL concentrado y se expresó en $\mu\text{mol/eyaculado}$ (32, 33).

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 (34).

1,4- α glicosidasa neutra (AGN): se midió de acuerdo al método fotométrico (35, 36). La actividad de AGN se calculó midiendo el producto de hidrólisis paranitrofenol tras 2 horas de incubación a 37°C pH 6,8 y se expresó en UI/eyaculado.

Evaluación microbiológica

Cultivos en placas: a fin de determinar la presencia de cocos y bacilos aeróbicos y microaerófilos facultativos se realizaron cultivos del sedimento seminal en placas de agar para el descarte de Enterobacterias, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus* sp y *Staphylococcus* sp. Se utilizaron 0,2 mL de semen fresco en 1,8 mL de solución salina fisiológica estéril, cada muestra fue mezclada se centrifugó a 1.500 g por diez minutos para remover el plasma seminal, se descartaron 1,8 mL del sobrenadante y 0,2 mL del sedimento obtenido fue resuspendido para el cultivo en placa con asa calibrada. El sedimento libre de plasma seminal fue empleado con el objeto de remover sustancias bacteriostáticas propias del semen (37). Los sedimentos se sembraron en 4 placas de agar: sangre 5% (5%CO₂), chocolate (5%CO₂), Thayer-Martin, manitol salado y Mc Conckey, y se incubaron a 37°C durante 48 horas. A los cultivos positivos se les realizó su antibiograma específico (38).

Cultivos en pozos de Mycoplasmas *M. hominis* y *U. urealyticum*: El semen fue diluido 1:10 en solución salina fisiológica estéril (0,2 mL+1,8 mL) y sembrado en pozos con medio enriquecido A7 (Mycoplasma System Plus, Diagnostici Liofilchem). El estuche contenía pozos de identificación para *M. hominis* y *U. urealyticum*; con pozos individuales. La identificación, cuantificación de colonias y susceptibilidad se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabrican-

tes del estuche de diagnóstico. El estuche comercial contenía adicionalmente un pozo TR/Y con medio de cultivo para el descarte de *Candida albicans* y *Trichomonas sp.*, mediante la observación microscópica de clamydiosporas, hifas o trofozoitos a las 48 h de incubación.

Determinación de anticuerpos (Acs) anti *Chlamydia*

Anticuerpos locales IgA Ac-antiCht: Se usó un estuche comercial (Sero ELISA; El Diagnóstico de Savyon, Beer-Sheva, Israel). El procedimiento se realizó según las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos fueron incluidos en cada ensayo.

Anticuerpos en sangre periférica IgG Ac-antiCht: A cada paciente se le extrajeron 3 mL de sangre venosa. 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 estuche comercial para IgG Ac-antiCht (Sero ELISA; El diagnóstico de Savyon, Beer-Sheva, Israel).

Valores de absorbancia por encima del límite para anticuerpos IgG (periféricos) e IgA (locales) se consideraron positivos para *C. trachomatis*.

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 inferencial, 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

El estudio de las muestras obtenidas de los 300 pacientes determinó que 141 de ellos (46,9%) tenían cultivos positivos o la

presencia de Ac-antiCht IgA y/o IgG. Los Ac-antiCht estaban presentes en un 21,3% de los 300 pacientes. De los 64 pacientes positivos para Ac-antiCht 42,3% presentaron las isoformas IgA, 18,7% la forma IgG y ambas un 39%. En los cultivos de semen se identificaron 8 microorganismos diferentes cuya distribución se encuentra en la Tabla I. Diez de estos 300 pacientes fueron positivos para dos o más gérmenes (≥ 2) simultáneamente mientras que cinco presentaron Ac-antiCht simultáneamente con otro microorganismo.

Al comparar las características seminales de los grupos Ac-antiCht, Mycoplasmas (*M. hominis* + *U. urealyticum*) y el grupo denominado positivo para otros patógenos (*Staphylococcus sp* + *Streptococcus sp* + *E. coli* + *Klebsiella sp* + *Enterobacter sp*) con el grupo sin infección, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al valor promedio de volumen, producción espermática, morfología ni movilidad. En el grupo positivo para Ac-antiCht la concentración de leucocitos fue significativamente más alta ($p < 0,001$). Los pacientes con infección por dos o más gérmenes no se incluyeron en este estudio (Tabla II).

La valoración bioquímica de los marcadores glandulares reveló que el marcador de vesículas seminales (fructosa) se encontró disminuido cuando estaban presentes los Ac-antiCht ($p < 0,001$) y los Mycoplasmas ($p < 0,01$); el marcador prostático (ac. cítrico) no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos; el marcador epidimario (α -glucosidasa) estaba significativamente reducido en el grupo con Ac-antiCht ($p < 0,001$) y Mycoplasmas ($p < 0,005$); y se observó aumento significativo del pH en el grupo con Ac-anti Cht al ser comparados con el grupo sin infección. Los pacientes con ≥ 2 gérmenes no se incluyeron en estos grupos (Tabla III).

TABLA I
FRECUENCIA DE BACTERIAS Y DE ANTICUERPOS ANTI-*Chlamydia* IDENTIFICADOS EN LOS PACIENTES

	n	%
Sin infección	159	53,1
Infección	141	46,9
<i>C. trachomatis</i>	64	21,3
<i>U. urealyticum</i>	24	8,0
<i>M. hominis</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	

TABLA II
CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN HOMBRES INFÉRTILES SIN INFECCIÓN Y POSITIVOS PARA MYCOPLASMAS, OTROS PATÓGENOS Y ANTICUERPOS ANTI-*Chlamydia trachomatis*

	Sin infección n=159	Positivos para <i>M. hominis</i> y <i>U. urealyticum</i> n=42	Otros patógenos n=25	Con Ac-antiCht IgA y/o IgG n=64
Volumen seminal (mL)	3,1±0,13	2,8±0,22	3,3±0,26	3,0±0,13
Producción espermática (10 ⁶ /eyaculado)	196,5±13,21	186,4±22,54	218,6±45,14	157,7±17,64
Morfología(% de normales)	28,4±0,97	24,4±1,49	26,2±2,22	29,5±1,88
Esp. Móviles Progresivos (%)	40,4±1,72	41,1±3,41	44,2±4,78	42,6±2,29
Leucocitos (10 ⁶ /mL)	0,6±0,04	0,7±0,06	0,7±0,06	1,4±0,14

^a P<0,001. Valores promedio ± error estándar (EE). Morfología (% de formas normales); espermatozoides móviles progresivos: rápidos + lentos. Pacientes positivos para *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* [Pos(+)] Mh y Uu]; otros patógenos y con Anticuerpos anti-*Chlamydia* (Ac-antiCht) IgA y/o IgG comparados con pacientes sin infección: a p<0,001 t-student no pareado de una cola.

DISCUSIÓN

La determinación de anticuerpos IgG e IgA Ac-anti Cht como indicador de que los pacientes han estado o están expuestos a este patógeno, y la detección de otros pató-

genos por cultivo de semen, demostró que la mayor incidencia en pacientes infértiles positivos para infección correspondía a la presencia de anticuerpos anti Ch.t (64/141), coincidiendo con otras investigaciones con similares resultados. Cht no fue

TABLA III
 MARCADORES GLANDULARES Y pH EN HOMBRES INFÉRTILES SIN INFECCIÓN Y POSITIVOS PARA MYCOPLASMAS, OTROS PATOGENOS Y ANTICUERPOS ANTI-*Chlamydia trachomatis*

Marcador	Sin infección n=159	Positivos para <i>M. hominis</i> y <i>U. urealyticum</i> n=42	Otros patógenos n=25	Con Ac-antiCht IgA y/o IgG n=64
Fructosa $\mu\text{mol/eyac}$	44,4 \pm 2,79	38,0 \pm 2,23 ^a	63,5 \pm 10,6	17,3 \pm 0,8 ^c
Ac.cítrico $\mu\text{mol/eyac}$	75,86 \pm 3,01	80,1 \pm 7,85	73,0 \pm 6,8	64,9 \pm 4,0
α -glucosidasa U/eyac	69,1 \pm 2,02	21,2 \pm 1,37 ^b	58,8 \pm 3,6	16,5 \pm 9,7 ^c
pH	7,8 \pm 0,02	7,9 \pm 0,04	7,8 \pm 0,06	8,1 \pm 0,05 ^c

Valores promedio \pm error estándar (EE). Concentración de fructosa y ácido cítrico en $\mu\text{mol/eyaculado}$, actividad de α -glucosidasa en Unidades/eyaculado (U/eyac). Pacientes positivos para *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, otros patógenos y con Anticuerpos anti-*Chlamydia* (Ac-antiCht) IgA y/o IgG comparados con pacientes sin infección: ^ap<0,01; ^bp<0,005; ^cp<0,001 t-student no pareado de una cola.

detectada directamente sino por la determinación de sus anticuerpos, considerando su importancia diagnóstica porque demuestran si el paciente ha estado en contacto reciente o pasado con Cht. Especialmente la exposición pasada al patógeno (IgG antiCht) se ha asociado con efectos negativos en el tracto genital masculino (24, 25).

De los 64 pacientes positivos para Ac-antiCht, 52 presentaron el isotipo IgA, lo que indicaría una respuesta inmunológica activa a nivel local, tal como lo han señalado otros autores en poblaciones de hombres infértiles (21, 22). Los Ac-anti Cht tipo IgA se han asociado con una respuesta inflamatoria del tracto genital masculino, pero no con los parámetros seminales (23, 24, 39), lo que se confirma con lo observado en este estudio. La evaluación seminal en este grupo reveló diferencias significativas en lo que se refiere a leucocitospermia y alteraciones de pH; ambos parámetros se asocian a presencia de infecciones en el tracto genital masculino y a una activación de la respuesta inmunológica (36). Por otra parte los grupos de pacientes positivo para Ac-anti Cht y para Mycoplasmas demostraron tener valores significativamente más bajos en los marcadores químicos de las

glándulas accesorias correspondientes a fructosa y α -glucosidasa, lo que indicaría alteraciones sobre las secreciones provenientes de vesículas seminales y el epidídimo. El daño tisular causado por infección o por inflamación puede alterar la función secretora de las glándulas accesorias que a su vez repercutirían en la fisiología espermática (39, 40).

La incidencia de *M. hominis* y *U. urealyticum* alcanzaron un 8 y 6% respectivamente. Este grupo analizado en conjunto y en comparación con el grupo negativo para infección, demostró que no existían diferencias significativas en sus parámetros seminales, lo que coincide con los resultados obtenidos por Sweih en 2011 (41); sin embargo, al igual que en los pacientes positivos para Ac-anti Cht los valores de fructosa y α -glucosidasa fueron significativamente más bajos que en el grupo negativo para infección, los cuales se asocian con baja función glandular, en particular epidídimo y vesículas seminales. Si los parámetros seminales: volumen, concentración, morfología, movilidad resultan ser normales, existe el riesgo de que la infección pase desapercibida si no se miden los valores de marcadores de glándulas accesorias y no se procede de

rutina al despistaje de infecciones en el tracto genital masculino, tal como se realizó en este estudio.

La secreción de las glándulas accesorias y probablemente la función espermática pueden verse afectadas por la presencia de *M. hominis*, *U. urealyticum* y la presencia Ac-anti Cht.

El diagnóstico junto al antibiograma permitiría controlar la resistencia a los antibióticos. Adicionalmente, en muchos de estos casos los antimicrobianos han tenido limitada eficacia porque se trata de compartimientos anatómicos con barreras que pueden limitar su alcance como por ejemplo la hemato-prostática (42); las lesiones tisulares son mayores a medida que avanza el tiempo, por ejemplo las prostatitis responden más rápido al tratamiento que las prostato-vesiculitis y prostato-vesículo-epididimitis, es decir, se comprometen más glándulas a medida que avanza el tiempo (6). Además, algunos microorganismos tienden a encapsularse o se adhieren con más fuerza al glicocálix de la matriz extracelular de la glándula, o probablemente los cambios de pH local de vesículas seminales (alcalino) o próstata (ácido) (43-45) limitan la eficacia antimicrobiana.

Se demostró que el 42,3% de las muestras seminales de pacientes infértiles eran positivas para diferentes patógenos en el tracto genital masculino. Este hallazgo justifica plenamente la necesidad de incluir en la evaluación del hombre infértil el despistaje de infecciones y la determinación de marcadores químicos de las glándulas sexuales accesorias masculinas para aplicar la terapia más adecuada y eficiente.

En conclusión, los cambios seminales sugestivos de infección sugieren la necesidad de un protocolo de diagnóstico de espermograma, marcadores químicos de glándulas sexuales masculinas, con un cultivo microbiológico adecuado, donde se descarten *M. hominis*, *U. urealyticum* y anticuer-

pos anti-*Chlamydia trachomatis* como gérmenes frecuentes asociados a infertilidad.

REFERENCIAS

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* 1999; 5:393-398.
2. **Elzanaty S, Malm J, Giwereman A.** Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. *Hum Reprod* 2005; 20(1):221-225.
3. **Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, Saâd A.** Relationship between semen quality and seminal plasma components: alpha-glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men. *Andrologia* 2009; 41(3):150-156.
4. **Purvis K, Christiansen E.** The impact of infection on sperm quality. *J Br Fertil Soc* 1995; 1(1): 31-41.
5. **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.
6. **Vicari E.** Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. *Hum Reprod.* 2000; 15(12):2536-2544.
7. **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.
8. **Elzanaty S, Malm J, Giwereman A.** Visco-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.
9. **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.
10. 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.
 11. Wolff H, Bezold G, Zebhauser M, Meurer M. Impact of clinically silent inflammation on male genital tract organs as reflected by biochemical markers in semen. *J Androl* 1991; 12(5): 331-334.
 12. 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.
 13. Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 1990; 13(5):329-336.
 14. 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.
 15. Toth A, Lesser ML. Asymptomatic bacteriospermia in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1981; 36(1): 88-91.
 16. Villanueva C, Echavarría M, Juárez A. Bacteriospermia asintomática y esterilidad masculina. *Col Mex Urol* 2003; 18(4): 145-817.
 17. Hellstrom W, Neal D. Diagnosis and therapy of male genital tract infections. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America* 1992; 3: 399-427.
 18. Marconi M, Pilatz A, Wagenlehner F, Diemer T, Weidner W. Impact of infection on the secretory capacity of the male accessory glands. *Int Braz J Urol* 2009; 35(3):299-308; discussion 308-309.
 19. Zeighami H, Peerayeh S, Yazdi R, Sorouri R. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. *Int J STD AIDS* 2009; 20(6):387-390.
 20. 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.
 21. Vigíl P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado A. *Chlamydia trachomatis* infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 2002; 34(3):155-261.
 22. Eggert-Kruse W, Rohr G, Demirakca T, Rusu R, Näher H, Petzoldt D, Runnebaum B. Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. *Hum Reprod* 1997; 12(7):1464-1475.
 23. Oehsendorf F, Ozdemir K, Rabenau H, Fenner T, Doer H. *Chlamydia*- IgA antibodies in seminal plasma are *Chlamydia trachomatis* specific and associated with an inflammatory response. *Jour Eur Acad Dermat Venereol* 1999; 12. 143-152.
 24. Idahl A, Abramsson L, Kumlin U, Liljeqvist J, Olofsson J. Male serum *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates with negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. *Int J Androl* 2007; 30(2):99-107.
 25. Weström L. *Chlamydia trachomatis*-clinical significance and strategies of intervention. *Semin Dermatol* 1990; 9(2):117-125.
 26. 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.
 27. Upadhyaya M, Hibbard B, Walker S. The effect of *Ureaplasma urealyticum* on semen characteristics. *Fertil Steril* 1984; 41(2):304-308.
 28. 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 Ke Xue*. 2008; 14(6):507-512.
 29. 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.
30. **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.
 31. **World Health Organization.** WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
 32. **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; 2010:409640. Epub 2010.
 33. **Lozano J, Vivas G, Muñoz M.** Relationship between *Chlamydia trachomatis* infection and biomarkers of accessory glands in infertile men. International Proceedings. 9th International Congress of Andrology. Barcelona (Spain), March 7-10, 2009. 187-190. Ballesecà J. L Lagarda and Oliva Virgil R. Medimond, Eds.
 34. **Jathar VS, Hirwe R, Desai S, Satoskar RS.** 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.
 35. **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.
 36. **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.
 37. **Alexander M, Cole E, Sørensen A, Martellini, Giwereman 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; 181:3413-3421.
 38. **Jorgensen J, Ferraro M.** Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009; 49(11):1749-1755.
 39. **Muñoz M, Witkin S.** Autoimmunity to spermatozoa, asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and gamma delta T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 1995; 10(5):1070-1074.
 40. **Maeda S, Deguchi T, Ishiko H, Matsumoto T, Naito S, Kumon H, Tsukamoto T, Onodera S, Kamidono S.** Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma 342 hominis*, *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in 343 patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter 344 plate hybridization. *Int J Urol.* 2004; 11(9): 750-754.
 41. **Al-Sweih N, Al Fadli A, Omu A, Rotimi V.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* Infections and seminal quality in infertile and fertile men in Kuwait. *J Androl.* Nov. 3 2011. [Epub ahead of print].
 42. **Comhaire FH.** Concentration of pefloxacin in split ejaculates of patients with chronic male accessory glands infection. *J Urol* 1987; 138:828-830.
 43. **Jameson, M.** Clinical aspects of infections associated with male infertility: a review. *J R Soc Med.* 1981; 74:371-373.
 44. **Nickel JC, Costerton JW.** Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate.* 1993; 23(2):107-114.
 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. **Schlossberg D.** Clinical approach to antibiotic failure. *Med Clin North Am.* 2006; 90(6):1265-1277.