

ORIGINAL

## Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras de semen: efectos sobre la calidad espermática



Jenniffer Puerta Suárez y Walter D. Cardona Maya\*

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 5 de enero de 2016; aceptado el 19 de febrero de 2016

Disponible en Internet el 22 de marzo de 2016

### PALABRAS CLAVE

*Chlamydia trachomatis*;  
*Neisseria gonorrhoeae*;  
*Ureaplasma urealyticum*;  
Reacción en cadena de la polimerasa;  
Calidad seminal

### Resumen

**Objetivo:** Las infecciones del tracto genitourinario están relacionadas con un alto porcentaje de casos de infertilidad masculina, sin embargo, en la gran mayoría estas infecciones suelen ser asintomáticas y los microorganismos responsables no siempre son identificados. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de las bacterias *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) y *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) en el semen de voluntarios aparentemente sanos.

**Materiales y métodos:** Muestras de semen de 84 voluntarios aparentemente sanos fueron colectadas y analizadas siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. Además, se realizó la extracción de ADN empleando la técnica de fenol-cloroformo y se detectó el ADN de los microorganismos usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

**Resultados:** En las 84 muestras evaluadas se detectó ADN de alguno de los microorganismos en 8 muestras (9,5%), 6 de ellas positivas para *U. urealyticum* (7,1%) y 3 muestras fueron positivas para la detección *N. gonorrhoeae* (3,6%). Una muestra (1,0%) presentó coinfección por *U. urealyticum* y *N. gonorrhoeae*. No se detectó ADN de *C. trachomatis* en ninguna muestra evaluada. No se observó relación entre la presencia del ADN de alguno de los microorganismos con la calidad seminal.

**Conclusión:** El semen de los individuos de población general asintomática puede albergar microorganismos como *N. gonorrhoeae* y *U. urealyticum* sin que su presencia afecte la calidad seminal.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: [wcdmaya@gmail.com](mailto:wcdmaya@gmail.com), [wdario.cardona@udea.edu.co](mailto:wdario.cardona@udea.edu.co) (W.D. Cardona Maya).

**KEYWORDS**

*Chlamydia trachomatis*;  
*Neisseria gonorrhoeae*;  
*Ureaplasma urealyticum*;  
 Polymerase chain reaction;  
 Semen quality

## Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma urealyticum* in semen samples: Effects on sperm quality

**Abstract**

**Aim:** Genitourinary tract infections are associated with a high percentage of cases of male infertility, but these infections are usually asymptomatic and microorganisms responsible are not always identified. The objective of this study was to detect the presence of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and *U. urealyticum* in the semen of healthy volunteers.

**Materials and methods:** Semen samples from 84 healthy volunteers were collected. Seminal analysis was performed according to the WHO guidelines, and DNA was extracted using the phenol/chloroform technique. The polymerase chain reaction was employed to detect bacterial DNA.

**Results:** Bacterial DNA was detected in 8 (9.5%) of the 84 samples, six of them positive for *U. urealyticum* (7.1%), and 3 samples were positive for *N. gonorrhoeae* (3.6%). Only one sample (1.0%) had a co-infection with *U. urealyticum* and *N. gonorrhoeae*. None of the samples was positive for *C. trachomatis*. The presence of bacterial DNA was not related to semen quality.

**Conclusion:** The semen of asymptomatic individuals from the general population may harbour microorganisms such as *N. gonorrhoeae* and *U. urealyticum*, without affecting semen quality.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

Los procesos inflamatorios e infecciosos del tracto urogenital masculino se han asociado con el 8 al 35% de los casos de infertilidad<sup>1</sup>. Dentro de este grupo se encuentran las infecciones de transmisión sexual (ITS), con una estimación de 19 millones de nuevos casos cada año y casi la mitad de ellos en jóvenes de 15 a 24 años<sup>2</sup>.

Tanto las ITS como las demás infecciones del tracto urogenital masculino continúan presentando una alta prevalencia en la población mundial a pesar de ser fácilmente tratables y prevenibles<sup>3</sup>; de estas infecciones, la prostatitis crónica es el problema urológico más común<sup>4</sup> y responsable de un gran número de casos de infertilidad, aún mayores que los reportados por la bacteriospermia asintomática, las infecciones de las glándulas sexuales o del epidídimo<sup>1</sup>.

Se estima que entre el 9 y el 11% de los hombres en edad reproductiva han tenido síntomas de prostatitis en algún momento de su vida y la mayoría son medicados con antimicrobianos<sup>5,6</sup>. El panorama de diagnóstico clínico de estas infecciones se complica aún más debido a que en muchos casos las infecciones prostáticas son raramente documentadas, aun cuando cerca del 7% de los pacientes con prostatitis tienen infecciones bacterianas crónicas<sup>5</sup>. Por este motivo, metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se convierten en un método altamente sensible y versátil para detectar bacterias en el tracto urogenital masculino no diagnosticadas por los métodos de cultivo tradicionales<sup>7</sup>.

La infección de los órganos que contribuyen al eyaculado (testículo, epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales, próstata y uretra) aportan un alto número de enfermedades masculinas entre las que se encuentra la infertilidad<sup>8</sup>. Los microorganismos más prevalentes son *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*), *Neisseria gonorrhoeae*

(*N. gonorrhoeae*) y otros micoplasmas, pero su efecto sobre la calidad seminal aún no es claro<sup>6,7</sup>.

El papel de *U. urealyticum* en la infertilidad femenina está bien documentado en los casos de complicaciones y secuelas durante el embarazo<sup>9</sup>, pero el efecto de la infección masculina aún es controversial; su presencia en el semen se ha asociado con una disminución de la concentración espermática, la movilidad y la morfología<sup>10</sup>. En 2003, Knox et al.<sup>9</sup> reportaron una prevalencia de *U. urealyticum* del 22 y el 8,5% en muestras antes y después de realizar lavados de semen, como los usados en las técnicas de reproducción asistida. De otro lado, *C. trachomatis* es una de las bacterias de transmisión sexual más prevalente en el mundo<sup>1</sup> y causa serias secuelas en las mujeres, como la enfermedad pélvica inflamatoria, el embarazo ectópico y la infertilidad<sup>11</sup>. En hombres se describe como un agente causal de uretritis, epididimitis y epidídimo-orquitis, y desde hace algunos años es reconocida como un agente etiológico de prostatitis<sup>12,13</sup>, sin tener un papel claro en la infertilidad masculina. Por su parte, *N. gonorrhoeae* está catalogada como la responsable de la gran mayoría de casos de uretritis<sup>14</sup> y, aunque la incidencia de gonorrea está disminuyendo en los países industrializados, esta infección sigue siendo la ITS más importante en las ciudades en vía de desarrollo<sup>15</sup>.

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de las bacterias *U. urealyticum*, *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en el semen de voluntarios aparentemente sanos y correlacionarla con la calidad seminal.

**Materiales y métodos****Muestras de semen**

Ochenta y cuatro muestras de semen de voluntarios aparentemente sanos, mayores de edad, sin signos ni síntomas de infección urogenital o alteraciones del tracto reproductivo

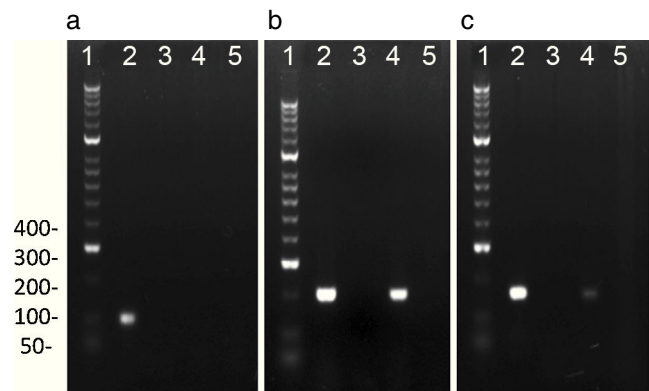
fueron obtenidas mediante masturbación y colectadas en un recipiente estéril después de una abstinencia sexual de 2 a 5 días, entre agosto del 2014 y septiembre del 2015. Se evaluaron los parámetros seminales de acuerdo con lo establecido por la Organización Mundial de la Salud<sup>16</sup> y la concentración espermática se determinó empleando la cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Israel)<sup>17</sup>.

### Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN de los espermatozoides usando el protocolo de fenol-cloroformo previamente estandarizado en nuestro grupo. Brevemente, las muestras de semen fueron centrifugadas a 200g/10 min y se les adicionaron 0,5 ml de solución de lisis (Tris 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS 10% y Tritón 0,1%) y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Thermo-Scientific, MA, USA) durante 12 h a 54 °C. Posteriormente, se adicionó 1 ml de fenol-cloroformo-isoamílico (Amresco, Ohio, EE. UU.) y se centrifugó a 5.000 g/10 min; al sobrenadante recuperado se le adicionó 1 ml de etanol absoluto (-20 °C), 50 µL de acetato de sodio 3 M y se dejó a -20 °C toda la noche para precipitar el ADN. Finalmente, se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se dejó secar el etanol, el ADN fue diluido en agua libre de DNasa/RNasa (Gibco, Life Technologies, EE. UU.) y cuantificado en Nanodrop (ND1000 Spectrophotometer, Thermo-Scientific, EE. UU.).

### Reacción en cadena de la polimerasa para detectar el ADN de cada bacteria en semen

Se empleó un volumen final de reacción de 25 µl que contenía 12,5 µl de Master Mix (Thermo-Scientific, EE. UU.), solución que contiene 0,025 U/µl de Taq DNA polimerasa, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) diluidos en solución tampón de reacción. A cada reacción se le adicionó 1 µM de cada cebador (tabla 1), 6 µL de ADN (200 ng) y 5,5 µL de agua. La PCR se realizó en un termociclador (T3000, Whatman, Biometra, Goettingen, Alemania) bajo las condiciones descritas en la tabla 1. Como control positivo, se empleó el ADN extraído de las cepas *C. trachomatis* serovar E (donada por el Dr. Rubén Motrich, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología-CIBICI, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y *N. gonorrhoeae* ATCC 43069. Como control positivo de *U. urealyticum* se empleó ADN de muestras de semen positivas para este microorganismo (donadas por el Dr. Pedro Martínez, Centro Latinoamericano de Diagnóstico Genético Molecular-CELAGEN, Bogotá, Colombia). El control negativo consistió en la mezcla de reacción sin ADN (fig. 1). Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybr Safe (Invitrogen Life Technologies, EE. UU.) en solución tampón TAE durante 23 min a 135 V. Los productos de la reacción fueron comparados con el marcador de peso molecular de 100pb (Hyperladder II 100 lines, Biotline, Life Science Company, Londres, Reino Unido) y fueron visualizados en un fotodocumentador Molecular Image Gel Doc TM XR (Bio-Rad, CA, EE. UU.) bajo iluminación ultravioleta con el programa Image Lab 5.1 (Bio-Rad, CA, EE. UU.).



**Figura 1** PCR representativa para la amplificación de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *U. urealyticum*: El análisis electroforético de los productos de amplificación de: a) *C. trachomatis* (100pb), obtenido con los cebadores OMP1; b) *N. gonorrhoeae* (200pb) obtenido con los cebadores Ngu3 y Ngu4; c) *U. urealyticum* (167 pb) obtenido de los cebadores U8 y U9. Línea 1: Marcador de peso molecular de ADN de 100pb; Línea 2: control positivo; Línea 3: control negativo; Línea 4 y 5: Muestras voluntarios.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la mediana y el rango. Para comparar los parámetros seminales de las muestras positivas versus las negativas para la detección de alguno de los microorganismos; se empleó estadística no paramétrica utilizando la prueba de Mann-Whitney, considerando significación estadística de  $p < 0,05$ , usando el programa GraphPad Prism 6 (Graphpad, CA, EE. UU.).

### Resultados

De las 84 muestras evaluadas se detectó el ADN de alguno de los microorganismos en 8 muestras (9,5%), 6 (7,1%) fueron positivas para *U. urealyticum* y 3 muestras (3,6%) fueron positivas para *N. gonorrhoeae*. Además, una muestra (1,0%) presentó coinfección por *U. urealyticum* y *N. gonorrhoeae*, y ninguna muestra fue positiva para el ADN de *C. trachomatis*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros seminales de las muestras positivas y negativas para la presencia de alguno de los microorganismos estudiados; el volumen, la viabilidad y la movilidad es menor (el 20,0, el 13,1 y el 12,9%, respectivamente) en las muestras positivas para la detección de ADN de cualquiera de los microorganismos comparadas con las muestras negativas (tabla 2).

### Discusión

El semen es un medio de transmisión de bacterias<sup>18-20</sup>, parásitos<sup>21</sup> y virus<sup>22-26</sup> entre hombres y mujeres, siendo su calidad un indicativo de la fertilidad<sup>27</sup>. Durante el estudio de los procesos infecciosos del tracto urogenital masculino se ha determinado que la presencia de microorganismos en este fluido está asociada a un alto porcentaje de casos de infertilidad<sup>1,10,27,28</sup>.

**Tabla 1** Cebadores y condiciones de la PCR

| Microorganismo        | Cebadores                                      | Fragmento | Condiciones PCR                            |           |                  |
|-----------------------|--|-----------|--|-----------|------------------|
|                       |  |           | Desnaturalización inicial                  | Ciclos    | Elongación final |
| <i>C. trachomatis</i> | OMP1   | 100 pb    | 95 °C                                      | 35 ciclos | 72 °C            |
|                       | 5'-GCT CGG ATG CCT<br>TGT TAA CAC-3'           |           | 5 min                                      |           |                  |
|                       | 5'-TCC AAA ATG TGC<br>TCC GGA TT-3'            |           | 94 °C: 30 s<br>55 °C: 30 s<br>72 °C: 30 s  |           |                  |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Ngu3 y Ngu4                                    | 200 pb    | 94 °C                                      | 40 ciclos | 72 °C            |
|                       | 5'-CGT TCA TCG GCG<br>TAG GGT AA-3'            |           | 5 min                                      |           |                  |
|                       | 5'-CAC TTC TCG GTG<br>TTA AGA AA-3'            |           | 94 °C: 30 s<br>52 °C: 30 s<br>72 °C: 1 min |           |                  |
| <i>U. urealyticum</i> | U9 y U8  | 167 pb    | 94 °C                                      | 35 ciclos | 72 °C            |
|                       | 5'-GAG ATA ATG ATT<br>ATA TGT CAG GAT<br>CA-3' |           | 5 min                                      |           |                  |
|                       | 5'-GAT CCA ACT TGG<br>ATA GGA CGG-3'           |           | 95 °C: 45 s 50 °C:<br>30 s<br>72 °C: 45 s  |           |                  |

**Tabla 2** Parámetros seminales y detección por PCR de *Ureaplasma urealyticum* y *Neisseria gonorrhoeae* (mediana y rango)

| Microorganismo                                   | Espermograma                  |                  |  |                     |                               |
|--|-------------------------------|------------------|--|---------------------|-------------------------------|
|  | Parámetro                     | Volumen, ml      | Concentración<br>10 <sup>6</sup> esperm/ml | Viabilidad<br>%     | Movilidad<br>tipo I + II<br>% |
| Muestra positiva<br>para algún<br>microorganismo | Valor de<br>referencia<br>OMS | 1,5              | 15   | 58                  | 40                            |
|  | Positivo<br>n = 8 (9,5%)      | 2,5<br>(1,2-3,5) | 60,0<br>(40,0-250,0)                       | 71,6<br>(55,0-91,3) | 57,8<br>(40,0-71,0)           |
|  | Negativo<br>n = 59<br>(90,5%) | 3,0<br>(1,0-7,6) | 64,0<br>(0,0-567,0)                        | 81,3<br>(59,5-99,0) | 65,0<br>(14,0-94,0)           |
| <i>N. gonorrhoeae</i>                            | n = 3 (3,6%)                  | 1,6<br>(1,2-3,0) | 61,0<br>(50,0-250,0)                       | 84,0<br>(61,0-90,5) | 64,5<br>(40,0-71,0)           |
| <i>U. urealyticum</i>                            | n = 6 (7,1%)                  | 3,0<br>(2,5-3,5) | 55,0<br>(40,0-176,0)                       | 71,5<br>(55,0-91,0) | 57,8<br>(50,0-67,0)           |

Movilidad tipo I: espermatozoides móviles progresivos. Movilidad tipo II: espermatozoides móviles no progresivos.

En este estudio se logró detectar ADN bacteriano en el 9,5% de las muestras de semen de hombres sin síntomas de infecciones urogenitales, realizando búsqueda de 3 de las principales bacterias (*U. urealyticum*, *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*) responsables de un alto número de infecciones del tracto urogenital masculino usualmente asintomáticas<sup>1</sup>, las cuales pueden afectar la calidad seminal; sin embargo, aunque se observaron reducciones de hasta el 20% en los valores de los parámetros seminales, estas cifras no fueron estadísticamente significativas, por lo que no se logró evidenciar una relación clara entre la detección mediante PCR de estos microorganismos y los parámetros espermáticos. Golshani et al.<sup>1</sup> encontraron una prevalencia del 33% de ADN de los microorganismos *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *U. urealyticum*, y la

correlacionaron con un menor porcentaje de espermatozoides móviles, menor concentración y alteración en la morfología, empleando una metodología similar en 200 muestras de semen de pacientes infértiles asintomáticos para la infección del tracto urogenital.

El microorganismo más prevalente en este estudio fue *U. urealyticum* (7,1%). Otros autores reportan prevalencias del 12 al 25% en hombres asintomáticos<sup>29</sup>, del 76% en los individuos infértiles y del 19% en los fértiles<sup>9</sup>, siendo aún controversial el papel de este microorganismo en la fertilidad<sup>10</sup>. Las diferencias entre las prevalencias reportadas por otros autores en cuanto a las infecciones causadas por este microorganismo pueden estar relacionadas con el tipo de población evaluada<sup>1</sup> y se sugiere que la evaluación cuantitativa de *U. urealyticum* en muestras de

semen permitiría establecer la patogenicidad de este microorganismo en el tracto urogenital<sup>14</sup>.

La presencia de *U. urealyticum* en el semen puede estar relacionada con su papel de colonizador frecuente del tracto genital de hombres y mujeres<sup>11,29,30</sup>, aunque puede incrementar el porcentaje de espermatozoides inmóviles por su capacidad de unión a la célula espermática, sin ser eliminado con técnicas como la selección espermática por gradiente o el swim-up<sup>9</sup>.

Aunque en este estudio no se logró detectar ADN de *C. trachomatis*, otros autores han detectado este microorganismo en el 2,2% de las muestras de semen<sup>6</sup> y su presencia se asocia a un alto número de casos de infertilidad en hombres de 20 a 30 años de edad<sup>1,6</sup>. La prevalencia de *C. trachomatis* y de *N. gonorrhoeae* en muestras urinarias y seminales en el estudio de Samra et al. fue del 11,3 y el 13,3%, respectivamente<sup>2</sup>. De otro lado, Krieger y Riley<sup>5</sup> reportan una prevalencia de estos microorganismos en semen del 8% en pacientes con prostatitis crónica, infección que ocupa el tercer lugar entre las causas de infertilidad masculina<sup>28,31</sup>. Factores como el tamaño muestral o el tipo de población evaluada pueden estar relacionados con la ausencia de casos de infección por *C. trachomatis*.

*N. gonorrhoeae* fue detectada en el 3,6% de las muestras de semen de hombres asintomáticos para esta infección, contrario a lo reportado en hombres con uretritis de una cohorte de 572 pacientes que presentó una prevalencia aproximadamente 12 veces mayor (44,6%)<sup>14</sup> que la reportada en este estudio; sin embargo, se puede concluir que el gonococo sigue siendo un factor importante en la uretritis, especialmente en países en vía de desarrollo<sup>15</sup>.

En ninguna de las muestras analizadas, inclusive las positivas para algún microorganismo, se observó leucocitospermia, resultado acorde con lo reportado por otros autores<sup>1,8,10</sup>; por lo tanto, la leucospermia e incluso la inflamación<sup>4</sup> no son los mejores indicadores de la presencia de procesos infecciosos en el tracto urogenital masculino.

Finalmente, cabe aclarar que no solo los microorganismos analizados en este estudio son responsables de procesos infecciosos del tracto urogenital; en la gran mayoría de los estudios solo se realiza cultivo de microorganismos aeróbicos de especímenes prostáticos, a pesar de que microorganismos exigentes y no cultivables también son importantes en la etiología de la prostatitis<sup>29</sup>. En 2008, Kiessling et al.<sup>8</sup>, empleando PCR para detección de microorganismos en semen, encontraron una prevalencia bacteriana del 56%, identificando tanto cocos aerobios como anaerobios que pueden influir en la fertilidad. Entre los microorganismos anaerobios no identificados por los métodos rutinarios de diagnóstico de semen se encuentran *Anaerococcus*<sup>27</sup> y *Corynebacterium*<sup>8</sup>.

En conclusión, la presencia de los microorganismos como *N. gonorrhoeae* y *U. urealyticum* en individuos de población general asintomáticos para infecciones urogenitales puede ser común sin afectar la calidad seminal.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

## Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias (111556933373) y por la Estrategia de Sostenibilidad 2014-2015, Grupo Reproducción, de la Universidad de Antioquia.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

A los profesores Pedro Martínez, Rubén Motrich y sus equipos de trabajo. JPS fue Joven Investigadora de Colciencias.

## Bibliografía

1. Golshani M, Eslami G, Ghobadloo SM, Fallah F, Goudarzi H, Rahbar AS, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by multiplex PCR in semen sample of infertile men. *Iranian Journal of Public Health*. 2007;36:50–7.
2. Samra Z, Rosenberg S, Madar-Shapiro L. Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:17–21.
3. Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex Transm Infect*. 1998;74 Suppl 1:S12–6.
4. Krieger JN, Riley DE. Bacteria in the chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: Molecular approaches to critical research questions. *J Urol*. 2002;167:2574–83.
5. Krieger JN, Riley DE. Prostatitis: What is the role of infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19:475–9.
6. Krieger J, Ross S, Riley D. Chronic prostatitis: Epidemiology and role of infection. *Urology*. 2002;60:8–12.
7. Hochreiter WW, Duncan JL, Schaeffer AJ. Evaluation of the bacterial flora of the prostate using a 16S rRNA gene based polymerase chain reaction. *J Urol*. 2000;163:127–30.
8. Kiessling AA, Desmarais BM, Yin H-Z, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril*. 2008;90:1744–56.
9. Knox CL, Allan JA, Allan JM, Edirisinghe WR, Stenzel D, Lawrence FA, et al. *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. *Fertil Steril*. 2003;80:921–9.
10. Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, et al. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect Dis*. 2007;7:129.
11. ElFeky DS, Baddour MM. Role of *Chlamydia trachomatis* and genital *Mycoplasmas* in cervical infection and infertility in women. *Egypt J Med Microbiol*. 2009;18:637–49.

12. Igietseme JU, Omosun Y, Partin J, Goldstein J, He Q, Joseph K, et al. Prevention of *Chlamydia*-induced infertility by inhibition of local caspase activity. *J Infect Dis*. 2013;207:1095–104.
13. Cai T, Wagenlehner FM, Mazzoli S, Meacci F, Mondaini N, Nesi G, et al. Semen quality in patients with *Chlamydia trachomatis* genital infection treated concurrently with prulifloxacin and a phytotherapeutic agent. *J Androl*. 2012;33:615–23.
14. Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, Yasuda M, Tamaki M, Ishiko H, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis*. 2004;31:192–5.
15. Chaudhry U, Ray K, Bala M, Saluja D. Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital specimens. *Curr Sci*. 2002;83:634–40.
16. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
17. Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urol Esp*. 2008;32:443–5.
18. Galarzo Pardo S, Cano Cháves MA, Puerta Suarez J, Giraldo M, Mayorga B, Cadavid AP, et al. Efecto de los factores solubles de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* sobre la funcionalidad espermática. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2015;80:316–23.
19. Puerta Suárez J, Villegas Castaño A, Serna Quintana GJ, Martínez A, Romero Palacio J, Giraldo M, et al. Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2015;80:33–40.
20. Puerta-Suárez J, Giraldo M, Cadavid A, Cardona-Maya W. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2014;79:209–17.
21. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, et al. Male infertility: A public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol*. 2014;11:672–87.
22. Cardona Maya W, Rugeles MT, Cadavid AP. Interacción entre espermatozoides humanos y el virus de la inmunodeficiencia humana. *Actas Urol Esp*. 2009;33:223–6.
23. Cardona-Maya W, López-Herrera A, Velilla-Hernández P, Rugeles MT, Cadavid AP. The role of mannose receptor on HIV-1 entry into human spermatozoa. *Am J Reprod Immunol*. 2006;55:241–5.
24. Cardona-Maya W, Velilla P, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT. Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: Changes in the semen parameters. *Curr HIV Res*. 2009;7:418–24.
25. Cardona-Maya W, Velilla PA, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT. In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. *J Reprod Immunol*. 2011;92:1–7.
26. Zea-Mazo J, Negrette-Mejia Y, Cardona-Maya W. Virus de transmisión sexual: relación semen y virus. *Actas Urol Esp*. 2010;34:845–53.
27. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril*. 2013;100:1261–9.e3.
28. Borovkova N, Korrovits P, Ausmees K, Türk S, Jöers K, Punab M, et al. Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe*. 2011;17:414–8.
29. Mändar R, Raukas E, Türk S, Korrovits P, Punab M. *Mycoplasmas* in semen of chronic prostatitis patients. *Scand J Urol Nephrol*. 2005;39:479–82.
30. Colaizy TT, Kuforiji T, Sklar RS, Pillers D-AM. PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: A minireview. *Mol Genet Metab*. 2003;80:389–97.
31. Krieger JN, Takahashi S, Riley DE. Chronic prostatitis: Role of uncommon organisms. *Eur Urol Suppl*. 2003;2:19–22.