

ORIGINALES

Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad

Rocío Núñez Calonge, Susana Cortés Gallego, Marta Gago García, Ángel Pueyo Cañero, Braulio Peramo Moya y Pedro Caballero Peregrín

Laboratorio de Andrología. Clínica Tambre. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: La bacteriospermia se encuentra frecuentemente asociada a muestras de semen de varones en estudio de infertilidad, aun en ausencia de síntomas clínicos de infección de las glándulas sexuales accesorias. Los leucocitos también se encuentran a menudo en el semen de estos varones, aunque hay controversia acerca de la relación entre leucospermia y bacteriospermia, particularmente en pacientes asintomáticos, y acerca de si la presencia de bacterias representa únicamente contaminación. El objetivo de este estudio es analizar los hallazgos microbiológicos del semen de pacientes en estudio de esterilidad y conocer la presencia de microorganismos patógenos.

Métodos: Se han analizado los resultados de los cultivos de 1.376 varones (primera fracción de orina, fracción media y semen) en estudio de esterilidad en el período de 2 años.

Resultados: En el 26% de los varones se detectó algún microorganismo patógeno en el semen, el más frecuente de ellos *Escherichia coli* (24%). También se ha hallado un 26% de pacientes con *Ureaplasma urealyticum*.

Conclusiones: La presencia de un porcentaje mayor del 25% de pacientes con gérmenes patógenos, en una muestra de varones tan alta, indica la necesidad de realizar un cultivo fraccionado de orina y semen en estos pacientes.

Palabras clave: Semen. Microorganismos. Leucocitos. Infección.

ABSTRACT

Microbiological analysis of semen cultures in men undergoing evaluation for infertility

Introduction: Bacteriospermia is frequently found in semen samples from men undergoing evaluation for infertility, even when clinical symptoms of infection of the accessory sex glands are absent. Leukocytes are also frequently found in the semen of these men, although there is controversy on the relationship between leukospermia and bacteriospermia –especially in asymptomatic patients – and on whether the presence of bacteria is simply due to contamination. The aim of the present study was to analyze the microbiological findings in semen from patients undergoing infertility evaluation and to determine the presence of pathogenic microorganisms.

Methods: The results of cultures from 1,376 men (first and midstream urine fractions, and semen) undergoing infertility evaluation during a 2-year period were analyzed.

Results: In 26% of the men studied, at least one pathogenic microorganism was detected in semen, the most frequent being *Escherichia coli* (24%). *Ureaplasma urealyticum* was found in 26% of the men.

Conclusions: Pathogenic microorganisms were found in more than 25% of a large sample of men. This finding indicates the need to perform urine and semen culture in these patients.

Key words: Semen. Microorganisms. Leukocytes. Infection.

Correspondencia: Dra. R. Núñez Calonge.
Laboratorio de Andrología. Clínica Tambre.
Tambre, 8. 28002 Madrid. España.
Correo electrónico: rocio@clinicatambre.com

INTRODUCCIÓN

La infertilidad masculina es una alteración que afecta aproximadamente a un 15% de las parejas cada año en Europa¹. Se acepta comúnmente que una de las causas potenciales de infertilidad masculina es la infección asintomática y sintomática del tracto urogenital. La infección genital puede afectar no sólo a la función espermática, sino a la espermatogénesis². Los microorganismos podrían afectar la función reproductiva causando aglutinación de los espermatozoides móviles³, reduciendo la capacidad de presentar reacción acrosómica⁴ y también causando alteraciones de la morfología espermática.

La prevalencia de la bacteriospermia en varones, tanto fértiles como infértils, oscila del 10 al 100% en la bibliografía publicada⁵. Este amplio rango refleja la variedad de protocolos empleados para la recogida de semen. La Organización Mundial de la Salud⁶ (OMS) aconseja que se debe tener especial precaución en la recogida de semen para evitar contaminación. También se recomienda una higiene estricta y la conveniencia de orinar antes de recoger el eyaculado. Boucher et al⁷ publicaron una significativa reducción en el recuento bacteriano y número de especies, y un incremento en el porcentaje de cultivos estériles cuando se explicaba verbalmente a los pacientes el método de recogida, y no sólo por escrito.

La presencia de leucocitos en el eyaculado de varones infértils y su relación con la presencia de microorganismos está ampliamente documentada. Según criterios de la OMS, valores $> 10^6$ leucocitos/ml se considera patológico. Sin embargo, hay controversia acerca de la relación entre leucospermia y bacteriospermia, así como si la presencia de bacterias representa únicamente contaminación, sobre todo en varones asintomáticos⁸.

El objetivo de este trabajo es analizar los hallazgos microbiológicos encontrados en la población masculina con leucospermia que ha acudido para realizar un estudio de esterilidad.

MÉTODOS

Pacientes

Este estudio se ha realizado en 1.376 pacientes que han acudido a la consulta de esterilidad de la Clínica Tambre desde los años 2003 a 2005, a los cuales se les ha realizado un cultivo microbiológico de la primera fracción de la orina, fracción media y semen, para conocer el origen de la contaminación o infección si la hubiere⁹.

Los varones incluidos en este estudio fueron instruidos verbalmente y por escrito para una correcta higiene de manos y genitales antes de la recogida de las muestras de orina y semen.

El criterio por el cual se realizó un cultivo microbiológico a un paciente en estudio de esterilidad es, principalmente, el hallazgo de más de 6 leucocitos por campo de 40X en el estudio inicial de semen. Los leucocitos se identificaron utilizando la tinción de May-Grunwald-Giemsa.

Los patrones microbiológicos de infección son:

- No se valoran como infección los casos con menos de 50 UFC (unidades formadoras de colonias) de microorganismos no patógenos.

- Se consideran como casos con infección los que tienen más de 10^3 UFC de cualquier tipo de microorganismo, o cuando hay cualquier número de colonias de un agente infeccioso.

En los casos en que haya infección, se realiza antibiograma.

Diseño experimental

El estudio microbiológico se ha realizado en primera parte de la micción, micción media y semen, en los cuales se ha analizado:

- Porcentaje de casos con hallazgo de 1 microorganismo.
- Porcentaje de casos con hallazgo de 2 microorganismos.
- Porcentaje de casos con hallazgo de 3 microorganismos.
- Recuento de colonias en cada uno de los casos.
- Microorganismos hallados más frecuentemente.

Se analiza el porcentaje de muestras a las que se les ha indicado antibiograma (por considerar, como antes se ha comentado, que hay un microorganismo patógeno o un título bacteriano alto).

Se ha estudiado también la incidencia de micoplasmas (*Ureaplasma urealyticum*) y el título de UCC (unidades cambiadoras de color) de éstos.

Estudio microbiológico

El análisis bacteriológico se realizó utilizando un método cuantitativo en fase sólida. Las placas se cultivaron en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Después de la incubación a 37 °C se realizó el recuento de colonias utilizando los siguientes test de Bio-Merieux: *Staphylococcus*, ID32 Staph test; *Streptococcus*, AP120

TABLA 1. Número de casos y porcentajes de aislamiento de 1, 2 o 3 microorganismos en la primera fracción de orina y recuento de colonias de 1.376 varones en estudio de esterilidad en la Clínica Tambre

Número de microorganismos	Número de casos (%)	51-3.000 (%)	> 3.000 (%)
1	457 (33,2)	361 (26,2)	96 (6,9)
2	124 (9)	98 (7,1)	26 (1,8)
3	6 (0,4)	1 (0,07)	5 (0,3)
Total	587 (42,6)	460 (33,3)	127 (9)

TABLA 2. Número de casos y porcentajes de aislamiento de 1, 2 o 3 microorganismos en la micción media de orina y recuento de colonias de 1.376 varones en estudio de esterilidad en la Clínica Tambre

Número de microorganismos	Número de casos (%)	51-3.000 (%)	> 3.000 (%)
1	268 (19,6)	214 (15,5)	54 (3,9)
2	72 (5,2)	61 (4,4)	11 (0,8)
3	3 (0,2)	0	3 (0,2)
Total	343 (25)	275 (19,9)	68 (4,9)

Strep test; Bacteriaceae gramnegativos, K32E test; Bacteriaceae anaeróbicos, ID 32C test, y Mycoplasmaceae, Mycoplasmic IST test.

RESULTADOS

Primera parte de la micción

Se ha encontrado un total de 587 casos con presencia bacteriana (42,6% de los incluidos en el estudio). De éstos, 457 muestras (33,2%) presentaban 1 único microorganismo, 124 (9%) 2 microorganismos y 6 (0,4%) 3 microorganismos. En la tabla 1 se muestra el número de casos y porcentajes de aislamiento de 1, 2 o 3 microorganismos en la primera parte de la micción y el número de colonias.

Micción media

Se ha encontrado un total de 343 casos con presencia bacteriana (25% de los incluidos en el estudio). De éstos, 268 casos (19,6%) presentaron 1 único microorganismo, 72 (5,2%) 2 microorganismos y 3 (0,2%) 3 microorganismos. En la tabla 2 se muestra el número de casos y porcentajes con 1, 2 o 3 microorganismos presentes en la micción media y el número de colonias.

Estudio microbiológico del semen

Se ha encontrado un total de 1.095 casos con presencia bacteriana (79,5% de los incluidos en el estudio). De éstos, 763 muestras (55,4%) presentaron 1 único microorganismo, 305 (22,1%) 2 microorganismos y 27 (2%) 3 microorganismos. En la tabla 3 se muestra el número de casos y porcentajes con 1, 2 o 3 microorganismos presentes en el semen y número de colonias.

En la tabla 4 se presenta el número de casos y porcentajes de aislamiento de microorganismos, con título > 10³ y con microorganismos patógenos en la pri-

TABLA 3. Número de casos y porcentajes de aislamiento de 1, 2 o 3 microorganismos en el semen y recuento de colonias de 1.376 varones en estudio de esterilidad en la Clínica Tambre

Número de microorganismos	Número de casos (%)	51-3.000 (%)	> 3.000 (%)
1	763 (55,4)	528 (38,3)	235 (17)
2	305 (22,1)	188 (13,6)	117 (8,5)
3	27 (2)	15 (1,1)	12 (0,9)
Total	1.095 (79,5)	731 (53)	364 (26,4)

TABLA 4. Número de casos y porcentajes de aislamiento de microorganismos, con título > 10³, y con microorganismos patógenos en la primera fracción de orina, fracción media y semen de 1.376 varones en estudio de esterilidad en la Clínica Tambre

	Primer fracción	Fracción media	Semen
Número de casos con microorganismos (%)	593 (43)	343 (25)	1.095 (79,5)
Número de casos con > 10 ³ UFC/ml (%)	120 (9)	68 (5)	364 (26,4)
Número de casos con microorganismos patógenos (%)	257 (18,6)	203 (14,7)	461 (33,5)

mera fracción de orina, fracción media y semen de 1.376 varones en estudio de esterilidad en la Clínica Tambre.

Microorganismos más frecuentes en las distintas fracciones

En la tabla 5 se muestran los microorganismos hallados con mayor frecuencia en las distintas fracciones estudiadas: primera micción, micción media y semen. Los microorganismos hallados con mayor frecuencia en la primera fracción de la orina han sido: *Staphylococcus epidermidis* (48%) y *Escherichia coli* (28%). Los microorganismos hallados con mayor frecuencia en la fracción media de orina han sido *S. epidermidis* (35%) y *E. coli* (37%). Los microorganismos hallados con

TABLA 5. Microorganismos más frecuentes en las distintas fracciones

	Primera fracción	Fracción media	Semen
Microorganismos patógenos (%)	<i>Escherichia coli</i> (28)	<i>E. coli</i> (37)	<i>E. coli</i> (24)
Microorganismos no patógenos (%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (48)	<i>S. epidermidis</i> (35)	<i>S. epidermidis</i> (44,5)

mayor frecuencia en el semen han sido *S. epidermidis* (44,5%), *E. coli* (24%) y *Streptococcus* sp. (10,4%).

En la tabla 6 se muestra el total de microorganismos hallados en el análisis microbiológico del semen de 1.376 varones en estudio de infertilidad.

Antibiograma

Se ha realizado antibiograma a 299 pacientes (21,7% del total).

Estudio de micoplasmas

Se ha hallado la presencia de *U. urealyticum* en 340 casos (24,7% del total analizado) (tabla 7). Sin embargo, *Ureaplasma* se considera como patógeno cuando hay más de 10^3 UCC. Con este título se han hallado 169 casos (12,2%).

DISCUSIÓN

El semen está compuesto de espermatozoides almacenados en el epidídimo y las secreciones de las vesículas seminales, próstata, y glándulas bulbouretrales, y cada región es normalmente estéril. Por eso es probable que los microorganismos hallados en el semen provengan principalmente de contaminación de la flora uretral o sean comensales de la piel. Aunque los comensales pueden no tener ningún significado en la concepción natural, la contaminación de un cultivo en reproducción asistida puede limitar en gran medida el éxito del proceso. Este hecho da un nuevo impulso al problema. Si la contaminación uretral contribuye significativamente a la bacteriospermia, la fracción media de la orina tendría menos concentraciones de microorganismos que la primera fracción, y la recogida del semen tras la orina puede ser un modo efectivo de reducir la concentración de microorganismos previo a un proceso de reproducción asistida.

Las diferentes especies y cepas bacterianas encontradas en el semen de varones infértilles se describieron hace más de 20 años por Swenson et al¹⁰. Desde

TABLA 6. Microorganismos hallados en el análisis microbiológico de 1.376 varones en estudio de infertilidad

Microorganismo	Número de microorganismos		
	1	2	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	360	131	7
<i>Escherichia coli</i>	184	13	2
<i>Proteus mirabilis</i>	51	27	1
<i>Streptococcus</i> sp.	80	83	4
<i>Streptococcus faecalis</i>	5	2	0
<i>Streptococcus b-hemolítico grupo B</i>	7	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	5	0
<i>Corinebacterium</i> sp.	25	36	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	5	1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	2	2	0
<i>Morganella morganii</i>	5	4	0
<i>Neisseria</i> sp.	3	1	0
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	0	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2	0
<i>Serratia marcescens</i>	2	0	0
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	1	0
<i>Flavobacterium</i> sp.	1	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	0	0
<i>Streptococcus epidermidis</i>	1	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	0
<i>Staphylococcus vulgaris</i>	1	1	0
Total	763	314	25

entonces, se sabe que alrededor del 70% de las muestras de semen están contaminadas por bacterias, la mayoría de ellas no son patógenas y sin significado sobre la función espermática. Con la aparición de los métodos de amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, se ha llegado a la conclusión de que los métodos microbiológicos de detección utilizados en el pasado han sobreestimado la incidencia de bacteriospermia significativa¹¹. Generalmente, se pueden cultivar varios microorganismos del tracto genital de varones infértilres, con más de una cepa bacteriana en la mayoría de los casos¹².

En controles sanos ($n = 42$) y pacientes con síntomas de prostatitis ($n = 142$), en los cuales se ha ex-

TABLA 7. Presencia de micoplasmas (*Ureaplasma urealyticum*) en el análisis microbiológico de 1.376 varones en estudio de infertilidad

	Número de casos
10	46
10^2	125
10^3	71
10^4	42
10^5	56
Total	340 (24,7%)

UCC: unidades cambiadoras de color.

cluido la prostatitis bacteriana tras 4 tomas para cultivo, no se halló una bacteriospermia significativa. Sin embargo, en prostatitis bacteriana probada, utilizando la misma técnica, la bacteriospermia era valorable en más de la mitad de los pacientes, lo que demuestra la excelente correlación entre la bacteriología del eyaculado y los resultados de la técnica¹³.

Con respecto a los microorganismos localizados con más repetición, en un trabajo realizado por Giarmarellou et al¹⁴, que estudió a 30 varones con prostatitis crónica, se encontró que las bacterias más frecuentemente halladas en la secreción prostática eran *E. coli* y *Staphylococcus*.

Como se ha comentado con anterioridad, el eyaculado puede estar contaminado con flora uretral o comensales de la piel. Cottel et al¹⁵ realizaron un estudio para determinar la contribución de la flora comensal al fluido seminal y conocer, además, la relación entre bacteriospermia y leucocitos en semen. Para ello, realizaron cultivos de la primera fracción y fracción media de orina y semen, y evaluaron el número de leucocitos en 60 varones en estudio de infertilidad. Se detectaron microorganismos en el 37% de los casos en la primera fracción de orina, en el 27% de la media, y en el 51% de las muestras de semen. No había correlación entre los microorganismos hallados en semen y el aumento de leucocitos, o entre leucospermia y bacteriospermia y gestación. Estos autores concluyen que la bacteriospermia generalmente representa contaminación. En otros trabajos más recientes¹⁶ tampoco se ha demostrado relación entre la presencia de leucocitos, presencia o ausencia de bacteriospermia y parámetros seminales, sobre todo si no hay signos clínicos de infección¹⁷.

Sin embargo, estos datos difieren de los que hemos encontrado en nuestra experiencia, probablemente debido a algunas diferencias de metodología. Los resultados obtenidos en nuestro estudio han demostrado presencia de bacterias en semen en casi un 80% de los casos, de los cuales el 33% presentaba microorganismos patógenos y el 26% presentaba un título mayor de 10^3 UFC/ml, lo que es algo superior a los datos encontrados en la bibliografía. Los microorganismos hallados con mayor frecuencia, coincidiendo con otros autores¹⁴, son *S. epidermidis* y *E. coli*.

Por otra parte, nuestro estudio es el que aporta mayor número de pacientes de todos los publicados hasta ahora en la bibliografía, así como es el único, exceptuando el de Cottel et al¹⁵, en el que se analizan los hallazgos bacteriológicos según los criterios de Meares y Stamey⁹, lo que da mucha más validez a los resultados. Aunque la contaminación uretral se pudiera eliminar, el origen exacto de los microorganismos en semen no podría ser determinado, dadas las dife-

rentes fuentes de los componentes del fluido seminal. Por eso, el papel de la infección en infertilidad debería analizarse mejor con respecto al microorganismo hallado que al lugar del que se sospecha la infección.

El papel de *U. urealyticum* en la infertilidad masculina y su patogenicidad ha generado controversia, y se han mostrado resultados contradictorios en la bibliografía. Por una parte, Andrade-Rocha¹⁸ investigó el valor clínico de *U. urealyticum* en el análisis de semen de rutina, y afirmó que, dada la baja frecuencia de presentación no es relevante. Sin embargo, en el mismo año, Knox et al¹⁹ publicaron que se encontró un 22% de pacientes tratados por infertilidad con cultivos de *Ureaplasma* positivos, en los cuales, una vez procesado el semen, seguían unidos a los espermatozoides en un 8,5% de los casos. Nuestro grupo publicó en 1998²⁰ un trabajo en el cual se contaminaban experimentalmente eyaculados de donantes con distintas concentraciones de *Ureaplasma*, y se analizaron a distintos tiempos variaciones en los parámetros espermáticos. Se comprobó que tenía lugar un descenso significativo de la movilidad espermática en función del tiempo de incubación y título de *Ureaplasma*. Asimismo, se evidenció por estudio a microscopía electrónica que *Ureaplasma* se une a los espermatozoides en la cabeza y segmento intermedio y que así puede transportarse con ellos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este análisis, en el cual ha intervenido una población de 1.376 varones en estudio de esterilidad, sugieren que el papel de la leucospermia en varones asintomáticos debe ser reevaluada. Así, la presencia de un porcentaje mayor al 25% de pacientes con gérmenes patógenos indica la necesidad de realizar un cultivo fraccionado de orina y semen como parte del estudio de esterilidad. Aunque el resultado de fertilidad de estos pacientes no se ha incluido en este estudio, un análisis futuro de estos resultados podría completar los hallazgos mostrados con este trabajo.

Bibliografía

- Weidner W, Krause W, Ludwig W. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. Hum Reprod Update. 1999;5:421-32.
- Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska D, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol. 2005;62: 111-24.
- Monga M, Roberts JA. Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. J. Androl. 1994;15:151-6.
- Kohn FM, Erdmann I, Oeda T, Mulla KF, Cchiefer HG, Schill WB. Influence of urogenital infections on sperm functions. Andrologia. 1998;30:73-80.

5. Fowler J.E. Infections of the male reproductive tract and infertility: a selected review. *J Androl.* 1981;3:121-31.
6. World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 2003.
7. Boucher P, Lejeune H, Pinatel MC, Gilles Y. Spermiculture: improvement of bacteriological quality of samples by direct verbal countselling before semen collection. *Fertil Steril.* 1995; 64:657-9.
8. Lackner J, Schatzl G, Horvath S, Lratizik C, Marberrger M. Value of counting white blood cells (WBC) in semen samples to predict the presence of bacteria. *Eur Urol.* 2006;49: 148-53.
9. Meares EM, Stamey TA. The diagnosis and management of bacterial prostatitis. *Br J Urol.* 1972;44:175-9.
10. Swenson CE, Toth A, Toth DI. Asymptomatic bacteriospermia in infertile men. *Andrologia.* 1980;12:7-11.
11. Jarvi K, Lacroix J, Jain A. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertil Steril.* 1996;66:463-7.
12. Dahlberg B. Asymptomatic bacteriospermia. En: Keith LG, Berger GS, Edelmann DA, editors. Infections in reproductive health common infections. 8th ed. Lancaster: MTP Press; 1985. p. 297-311.
13. Weidner W, Krause W. Orchitis. En: Knobil E, Neill JD, editors. Encyclopedia of Reproduction. Vol. 3. San Diego: Academic Press; 1999. p. 92-5.
14. Giamarellou H, Tympanidis K, Bitos NA, Leonidas E, Daikos GD. Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia.* 1984;16: 417-22.
15. Cottell E, Harrison RF, McCaffrey M, Walsh T, Mallon E, Barry-Kinsella C. Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertil Steril.* 2000;74:465-70.
16. Rodin DM, Larone D, Goldstein M. Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril.* 2003;79:555-8.
17. Lackner JE, Herwig R, Schmidbauer J, Schatzl G, Kratzik C, Marberrger M. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflamatory treatment on semen quality. *Fertil Steril.* 2006;86:601-4.
18. Andrade-Rocha FT. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship either the leuckocyte count and clinical value. *Urol Int.* 2003;71:377-81.
19. Knox DL, Allan JA, Allan JM, Edirisinghe ER, Stenzel D, Purdie L, et al. *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detect in semen after washing before assisted reproductive technologies procedures. *Fertil Steril.* 2003;80:921-9.
20. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer M. *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13:2756-61.