

Estudio retrospectivo en el diagnóstico de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* en muestra seminal de 89 pacientes en la Ciudad de México

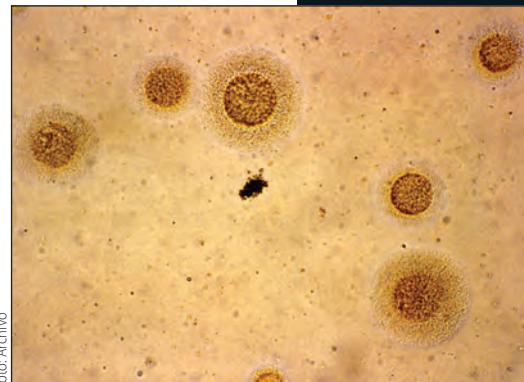


Foto: Archivo

RESUMEN

Antecedentes: El *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum* son microorganismos que se encuentran asociados a problemas reproductivos como la enfermedad pélvica inflamatoria en mujeres y la uretritis no gonocócica en hombres. Se han descrito alteraciones vinculadas a la infección por estos microorganismos, en parámetros reproductivos como la morfología espermática, el índice de infertilidad y la subfertilidad en el hombre.

Objetivos: Determinar la incidencia de *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. en pacientes del Distrito Federal (México) y evaluar las posibles correlaciones con sus resultados en la espermatozbioscopia.

^aDirector. Centro de Reproducción Humana en México (CFHM). México, DF.

^bCoordinadora. Laboratorio de Andrología del Centro de Reproducción Humana en México (CFHM). México, DF.

^cCoordinadora. Departamento de Investigación del Centro de Reproducción Humana en México (CFHM). México, DF.

Correspondencia: Centro de Reproducción Humana en México (CFHM). Tuxpan 6, Cuarto piso. Colonia Roma Sur. CP 06760.

Correo electrónico: investigación@centrodefertilidad.com

Recibido: 14/02/14. Aceptado: 30/10/14.

Alfredo Góngora Rodríguez^a, Carolina González Cortés^b, Lyda Yuliana Parra Forero^c

Material y método: Estudio retrospectivo de 89 pacientes positivos a *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Se analizaron los resultados de la espermatozbioscopia y se correlacionaron estadísticamente.

Resultados: Se obtuvo un aumento en el diagnóstico de estos 2 microorganismos en un 15% en el primer semestre del 2013 respecto al año 2012. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en la morfología espermática de pacientes positivos a alguno de los 2 agentes.

Conclusiones: El *Mycoplasma* y el *Ureaplasma* se consideran como flora normal del tracto genitourinario, aun así, debe realizarse su diagnóstico en pacientes con historial de fertilidad y subfertilidad y debe ser considerado cuando en el espermograma informe de alteraciones morfológicas y aumento del recuento de leucocitos

Palabras clave: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, espermatozoide.

Retrospective study on *ureaplasma* and *mycoplasma* detected in 89 patients semen

ABSTRACT

Background: The *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* are microorganisms associated

Foto: Cortesía del autor

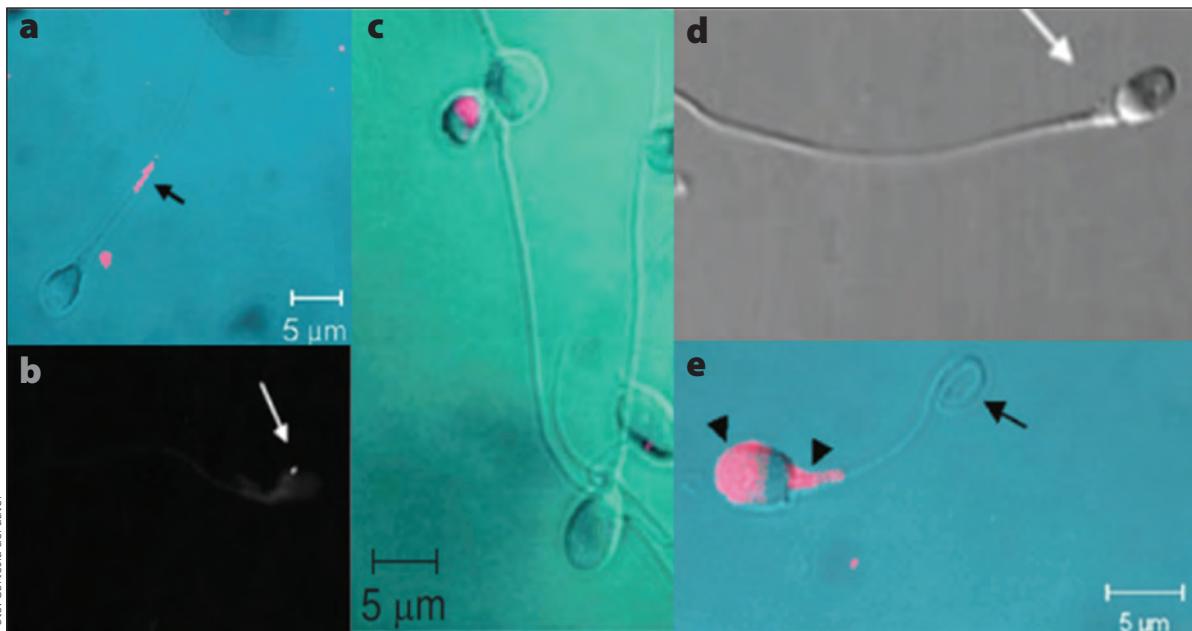


Figura 1. Detección por microscopía de adherencia de *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. en espermatozoide. a) *M. hominis* DilC18 pieza media (Díaz-García et al 2006). b) *M. genitalium* incrustado en región ecuatorial (Svenstrup et al. 2003). c) *M. hominis* fueron teñidos con el fluorocromo DilC18, microscopio cofocal (López-Hurtado et al. 2008). d) *M. genitalium* en pieza media (Svensstrup et al. 2003). e) *M. hominis* en cola de espermatozoide (Díaz-García et al. 2006).

with reproductive problems such as pelvic inflammatory disease in women and non-gonococcal urethritis in men. Alterations have been described in reproductive parameters and sperm morphology, rate of infertility and subfertility in man. **Objectives:** The aim of this study was to determine the incidence of *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp. in patients Federal District (Mexico) and to evaluate the possible correlations with the semen analysis results.

Material and methods: Retrospective study of 89 patients positive for *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, we analyzed the results of the semen analysis and correlated statistically.

Results: We obtained an increase in the diagnosis of these two microorganisms, by 15% in the first half of 2013 compared with 2012. Significant differences ($P < 0.001$) in sperm morphology in patients positive to one of the two agents, the most frequent was the *Ureaplasma*.

Conclusions: *Mycoplasma* and *Ureaplasma* are considered normal flora of the genitourinary tract, even so, the diagnosis should be performed in patients with a history of fertility and subfertility and should be considered when reporting morphological abnormalities and increased leukocyte count.

Key words: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spermatozoa*.

INTRODUCCIÓN

En los años 80 se reportó la presencia de *Mycoplasma* en el tracto genitourinario, tanto en hombres como en mujeres. Actualmente se sabe que el *M. hominis* y *M. genitalium* son los causantes de la uretritis no gonocócica en el hombre; en mujeres, se han diagnosticado como agentes patógenos de la enfermedad pélvica inflamatoria.

También se ha aislado de procesos crónicos respiratorios¹. El género de *Ureaplasma* se encuentra dentro de la familia del *Mycoplasma*. Las 2 especies con influencia en el ámbito reproductivo son *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*.

El *Mycoplasma* es un microorganismo de 0.2-1 μm de diámetro que no tiene pared celular. Pertenece a la familia de los mollicutes y posee un ADN de 500.000 pares de bases. Su virulencia se debe a su carácter parasitario y a su capacidad de invadir la célula y multiplicarse en ella². Su capacidad de metabolizar el triptófano lo hace muy selectivo para su cultivo, por lo que se han desarrollado pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa

Tabla 1. Estudios realizados con diagnóstico y correlaciones con espermograma de *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp.

Autor	Influencia en eyaculado	Parámetros evaluados	Prueba	Especies aisladas	N
Busolo et al. 1985	• Disminución capacidad de penetración en ovocitos de Hámster sin zona pelúcida	• Espermograma completo • Capacidad de penetración	Infectados <i>in vitro</i>	• <i>Ureaplasma urealyticum</i> • <i>Mycoplasma hominis</i>	35
Nuñez-Calonge et al. 1998	• Reducción en la motilidad y aumento de acrosomas anormales	• Espermograma completo • Capacidad de penetración	Infectados <i>in vitro</i>	• <i>Ureaplasma urealyticum</i> , • <i>Mycoplasma hominis</i>	6
Reichart et al. 2000	• Aumento índice de fragmentación de ADN espermático	• Espermograma completo • Fragmentación de ADN espermático	Infectados <i>in vitro</i>	• <i>Ureaplasma urealyticum</i>	8
Andrade-Rocha et al. 2003	• Ninguna	• Espermograma completo	Cultivo	• <i>Ureaplasma Urealyticum</i> , 28.8% • <i>Mycoplasma hominis</i> , 13.3%	234
Gdoura et al. 2007	• Ninguna	• Espermograma completo	PCR	• <i>Ureaplasma Urealyticum</i> , 15% • <i>Mycoplasma hominis</i> , 10.8% • <i>Ureaplasma parvum</i> , 4.2% • <i>Mycoplasma genitalium</i> , 5% • <i>Mixtas</i> , 6.7%	120
Peerayeh et al. 2008	• Reducción en la motilidad, volumen, concentración	• Espermograma completo	PCR	• <i>Ureaplasma urealyticum</i>	23
Gallegos et al. 2008	• Reducción en la motilidad, morfología y concentración • Aumento índice de fragmentación de ADN espermático y recuento de leucocitos	• Espermograma completo • Fragmentación de ADN espermático	Cultivo	• <i>Chlamydia trachomatis</i> • <i>Mycoplasma</i> spp.	143
Rodríguez et al. 2013	• Ninguna	• Espermograma completo	Cultivo (<i>Mycoplasma System Plus</i>)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , 25,7% <i>Mycoplasma hominis</i> , 1,4 %	140

ADN: ácido desoxirribonucleico; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

(PCR)³⁻⁵, la inmunofluorescencia directa (DIF)⁶, cultivos con medios selectivos y bioquímica enzimática para mejorar su diagnóstico⁷. En las clínicas de reproducción humana, se ha considerado el diagnóstico de *Mycoplasma* y su tratamiento como coadyuvantes en hombres con infertilidad. En la mayoría de los casos, es asintomático ya que se con-

sidera un habitante normal de la uretra masculina⁸. La literatura reporta que el *Mycoplasma* es capaz de adherirse al espermatozoide y de generar en la mujer alteraciones como endometriosis y trastornos en el embarazo que pueden causar pérdida embrionaria⁹.

Investigaciones realizadas con infecciones *in vitro* señalan la disminución en la viabilidad espermática

demostrando su adhesión en todas las partes del espermatozoide⁹⁻¹¹ (**figura 1**); también han reportado la disminución en todos los demás parámetros de la espermatobioscopia, entre los que cabe citar la capacidad de penetración en ovocitos de hámster sin zona pelúcida⁹ y el aumento en el índice de fragmentación del ADN espermático^{12,13}. Los estudios respecto a los hallazgos en el espermograma de pacientes asintomáticos son contradictorios ya que no reportan correlación alguna con ningún parámetro de evaluación del eyaculado^{3,14} (**tabla 1**).

Jones y cols. (2013) realizaron un metaanálisis para establecer la prevalencia y la incidencia mundial de *M. hominis*, *M. genitalium* y *Ureaplasma*. El estudio involucró 172 estudios en 53 países realizados entre 1975 y 2011 con un total de 96.361 pacientes. De estos pacientes, 27.952 fueron diagnosticados con *M. genitalium*, 23.928 con *M. hominis* y 44.481 con *Ureaplasma*. En México se han reportado prevalencias variables del 5 al 30%. El *U. urealyticum* es la más diagnosticada¹⁶.

El objetivo del estudio fue determinar la incidencia de *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. en pacientes del Distrito Federal (México) y evaluar las posibles correlaciones con sus resultados en la espermatobioscopia.

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes

Este estudio retrospectivo fue realizado con los expedientes del Centro de Fertilidad Humana en México. Fueron evaluadas 89 muestras para el diagnóstico de *M. genitalium*, *M. hominis* y *Ureaplasma*. Se contemplaron resultados desde el año 2012 hasta el segundo semestre de 2013. La edad de los pacientes fue de los 25 a los 55 años, ninguno presentó síntomas compatibles con enfermedad genitourinaria. Fueron divididos en 2 grupos según su edad: mayores y menores de 30 años. Dichos estudios fueron realizados por rutina en la selección de donantes de semen o porque se halló un aumento en la concentración de células inflamatorias en el eyaculado de pacientes que llegaron al centro por algún problema de fertilidad.

Colectión de semen

Los pacientes, donantes y no donantes, son instruidos para que mantengan abstinencia de 2 a 5

días antes de colectar la muestra. Ésta se obtiene por masturbación, y se deposita en frascos estériles manteniendo las indicaciones de la World Health Organization (WHO)^{23,24}. Las muestras se analizan después de la licuefacción total del semen que no debe exceder de 60 minutos a 37° C. Luego, son criopreservadas a -70° C en alícuotas.

Análisis del semen

Los análisis se realizan bajo las normas de la WHO (2010), se determinaron los parámetros clásicos de espermatobioscopia, y se definió como paciente normoespérmino al sujeto cuya concentración espermática está en el rango de $20 \times 10^6/\text{ml}$, su motilidad (a+b) es mayor al 50%, y morfología normal por encima del 30% de los espermatozoides evaluados. En presencia de células inflamatorias, se les realiza el conteo con la técnica que usa peroxidasa indicada por la WHO (2010).

Detección de *M. genitalium*, *M. hominis* y *Ureaplasma*

La detección de estos organismos fue realizada con el *kit* A.F. Genital System (GS- ref 74156; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Teramo, Italia). Esta prueba proporciona una identificación rápida de varios agentes patógenos del tracto genital, tanto en el hombre como en la mujer. En este caso, la muestra fue un hisopo de semen puro, el cual fue inoculado en el reactivo e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ de 18 a 24 horas. Los pozos contienen diversos tipos de reactivos químicos y antibióticos que son susceptibles a la presencia de determinada bacteria. La diferenciación de la presencia de *M. genitalium*, *M. hominis* y *Ureaplasma*²⁵⁻²⁷ es colorimétrica y semicuantitativa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros de la espermatobioscopia fueron analizados como variables categóricas. Se evaluaron con la prueba de χ^2 (chi cuadrado), con la prueba de Fisher cuando ésta es < 5 . Se consideraron diferencias significativas con $P < 0.05$. Para las pruebas de probabilidad, se realizó una regresión logística multivariada. El paquete estadístico utilizado fue SAS 9.3.

Tabla 2. Asociación de variable edad y año con pacientes diagnosticados con *Mycoplasma* y *Ureaplasma* entre los años 2012 y 2013

Variable	Positivos <i>Mycoplasma</i> N = 33 n (%)	Positivos <i>Ureaplasma</i> N = 51 n (%)	Mixtas N= 5 n (%)
<i>Año</i>			
2012	20 (35.7) ^a	35 (62.5)*	1 (1.8) ^a
2013	13 (39.4) ^b	16 (48.5) ^b	4 (12.1) ^a
<i>Edades</i>			
< 30 años	19 (37.3) ^a	27 (52.9) ^b	5 (9.8) ^a
> 30 años	14 (36.8) ^a	24 (63.2) ^b	0 ^a

^{a,b}Literales distintos muestran diferencias significativas p < 0.05 (χ^2).

* Diferencia altamente significativa p < 0.001.

Cuadro 3. Parámetros seminales de pacientes positivos a *Mycoplasma* y *Ureaplasma*

Grupo	Concentración	Motilidad (%)	Morfología (%)
Pacientes < 30 N= 51	$48.72 \times 10^6 \pm 25.41 \times 10^6$	50.31 ± 12.5	43.72 ± 18.34
Pacientes > 30 N = 38	$45.92 \times 10^6 \pm 22.46 \times 10^6$	46.39 ± 10.15	35.83 ± 15.09
P	NS	NS	< 0.001

RESULTADOS

Los pacientes de este estudio fueron divididos en 2 grupos, y se separaron por año. El *Ureaplasma* fue significativamente mayor que el *Mycoplasma* en el año 2012. Se observó la aparición de infecciones mixtas; el diagnóstico de éstas fue mayor en el primer semestre del 2013. Llamó la atención el aumento del número de casos de infección por estos 2 microorganismos en el transcurso de este año: un 15% mayor, respecto a los diagnósticos del primer semestre del año 2012. No hubo diferencias entre los diagnosticados con *Ureaplasma* y *Mycoplasma* entre los 2 grupos (**tabla 2**).

Los pacientes con diagnóstico de *Mycoplasma* o *Ureaplasma* fueron divididos en 2 grupos en razón de su edad. No hubo diferencias significativas en pH, color, viscosidad, concentración y vitalidad. Las diferencias de motilidad y concentración se describen en la **tabla 3**. Hubo diferencias significativas en morfología espermática (p < 0.001).

Los grupos fueron comparados en los parámetros del espermograma con pacientes negativos a *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, y se encontró una correlación positiva débil entre los positivos a alguno

de estos microorganismos con motilidad (r = 0.42; P < 0.001) y con morfología (r= 0.35; P < 0.001).

DISCUSIÓN

La disminución de los porcentajes de normalidad en la morfología de espermatozoides incubados con *Chlamydia* y *Mycoplasma* ha sido reportada por varios autores^{18,21}. En nuestro estudio la diferencia se hizo evidente, y aunque no hubo variaciones significativas en los otros parámetros, numerosos estudios han demostrado alteraciones en la vitalidad¹⁷, en el aumento del daño del ADN espermático^{13,19} y en las alteraciones de membrana¹⁸. Otros, en cambio, no han encontrado diferencia alguna en los parámetros evaluados^{4,20,22,28}. Aun así, el considerar a estos patógenos como flora normal del tracto genitourinario del humano y la carencia de sintomatología hacen que estos estudios dependan exclusivamente de la intensidad de la infección^{3,29}. Otro estudio reporta que la prevalencia de *Ureaplasma* fue mayor en las parejas infértiles (32%) que en las parejas fértiles (12,5%, P = 0,022)³⁰. Hay que anotar que la mayoría de estos estudios se han realizado con incubación *in vitro*, con lo cual es más probable la

El aumento de anormalidades morfológicas y de motilidad baja son considerados como un hallazgo anormal, donde el *Mycoplasma* y el *Ureaplasma* deben incluirse en los diagnósticos diferenciales. Han de emplearse técnicas rápidas y confiables, o tinciones específicas para determinar su presencia en microscopio de fluorescencia, y aun mejor, en campo claro.

adhesión del microorganismo al espermatozoide excluyendo las formas de defensa naturales existentes en el humano.

Estudios reportan la formación de peróxido de hidrógeno y, por ende, aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen peroxidación de los lípidos del espermatozoide, lo que provoca una alteración interna que lo incapacita para moverse. Además, las alteraciones en el acrosoma disminuyen la probabilidad de fertilizar un óvulo³¹, siendo completamente un daño mecánico lo que afecta al espermatozoide. La capacidad de adhesión del *Mycoplasma* al espermatozoide *in vitro* tiene lugar a los 10 min de incubación. El *Mycoplasma* es capaz de adherirse en todas las partes del espermatozoide, lo que conlleva alteraciones morfológicas visibles como enrollamientos de colas y vesículas en el cuello. Se ha confirmado que la capacidad de adhesión del *M. hominis* guarda relación con la afinidad que demuestra éste con los glicolípidos sulfatados presentes en el espermatozoide³². Se han hallado otras proteínas que propician la adhesión, como las adhesina P140, P110 y las MG218 y MG317^{33,34}; lo que puede explicar, la rápida adhesión del microorganismo a las células espermáticas.

El *Mycoplasma* es detectado visiblemente utilizando tinciones como el DiIC18⁹ y es de utilidad en laboratorios, deben tenerse en cuenta pruebas de biología molecular para su identificación y aislamiento^{35,36}. Necesariamente, se deben tener equipos de alto costo para su visualización, debido a esto un espermograma con un alto porcentaje de anormalidades morfológicas y aumento de leucocitos

por campo debe ser considerado para realizar un diagnóstico más exhaustivo, incluyendo en los diagnósticos diferenciales *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Este criterio ha de aplicarse también a pacientes con historial de baja fertilidad, actualmente existen en el mercado reactivos que eliminan bacterias después de la centrifugación del semen, este podría ser una medida preventiva en centros de reproducción asistida³⁷.

La terapia antibiótica en estos pacientes es eficiente y mejora su calidad seminal. Se reportan tratamientos eficaces con fluoroquinolonas³⁸, tetraciclínas y cloranfenicol. Otros ya se han descartado, como aquellos que utilizaban las cefalosporinas y la rifampicina³⁹. Sin embargo, la proporción de cepas resistentes a los tratamientos ha ido en aumento (20%), sobre todo a las tetraciclínas⁴⁰. En nuestros resultados, también se evidencia un aumento en los pacientes positivos respecto al año 2012 (**tabla 2**). Otros antibióticos como la azitromicina y a ofloxacina pueden ser suficientes para el tratamiento de la uretritis no gonocócica⁴¹. Un estudio realizado por Gallegos y colaboradores (2008) determinó que con terapia antibiótica hay una disminución significativa en la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático: de 37.7 ± 13.6% a 24.2 ± 11.2%; además, se logró que de 14 parejas que intentaron el embarazo, el 85.7% lo consiguiera.

Es importante considerar la terapia antibiótica correcta para no incidir en la resistencia bacteriana ya que se ha reportado en varios tratamientos antibióticos, incluyendo los macrólidos y fluoroquinolonas^{42,43}. En infecciones persistentes se ha recomendado la combinación de doxiciclina y azitromicina⁴⁴, aunque estudios han demostrado mayor eficacia en la primera⁴⁵. Trabajos realizados con sitofloxacina (100 mg 2 veces al día durante 7 días) mostraron que se erradicó clínicamente y por pruebas de laboratorio el 95.7% de *C. trachomatis*, 93.8 % de *M. genitalium* y 100 % of *U. urealyticum* 46.

CONCLUSIONES

Si bien el *Mycoplasma* y el *Ureaplasma* se consideran como flora normal del tracto genitourinario, su diagnóstico y su correlación con los hallazgos

de la espermatobioscopía deben hacerse de manera rutinaria en pacientes con historial de fertilidad y subfertilidad. Se ha demostrado que el diagnosticar y el tratar con una terapia antibiótica adecuada trae beneficios como el mejoramiento de la calidad espermática y el aumento de la tasa de embarazos.

El aumento de porcentaje de anormalidades morfológicas y de motilidad baja son considerados como un hallazgo anormal, donde el *Mycoplasma* y el *Ureaplasma* deben incluirse en los diagnósticos diferenciales. Éstos no son visibles en microscopio de campo claro, lo que dificulta su diagnóstico. Han de emplearse, en el futuro, técnicas rápidas y confiables, o tinciones específicas para determinar su presencia en el espermatozoide en microscopio de fluorescencia, y aun mejor, en campo claro.

Los resultados obtenidos son un aproximado de la casuística existente en la Ciudad de México. Aun así, son necesarios más estudios para determinar la incidencia total de estos microorganismos y, en consecuencia, determinar una terapia antibiótica congruente con los antibiogramas para no aumentar la resistencia bacteriana. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor-Robinson D, Tully J, Furr P, Cole R, Rose D, Hanna N. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. Israel journal of medical sciences. 1981;17:524-30.
2. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. Infectious diseases in obstetrics and gynecology. 2010;2010.
3. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. Journal of andrology. 2008;29:198-206.
4. Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, et al. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. BMC infectious diseases. 2007;7:129.
5. Soleymani Ra, Golshani M, Fayaz F, Rafiei Tabatabaei S. Detection of mycoplasma dna from the sperm specimens of infertile men by PCR. Iranian Journal Of Medical Microbiology. 2007;1:47-53.
6. Ny Z, Bt K-A, Js L, C D, L K, Yg L. Ureaplasma Urealyticum or Mycoplasma Hominis Infections and Semen Quality of Infertile Men in Abidjan. Journal of Reproduction and Contraception. 2008;19:65-72.
7. Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement NCCLS document M100-S9 National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.
8. Busolo F, Zanchetta R, Lanzone E, Cusinato R. Microbial Flora in Semen of Asymptomatic Infertile Men. Andrologia. 1984;16:269-75.
9. López-Hurtado M, Guerra-Infante FM. Avances en la interacción entre micoplasmas y espermatozoides de humano. Bioquímica. 2008;33:115-21.
10. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkeland S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium attaches to human spermatozoa. Human Reproduction 2003;18:2103-9.
11. Díaz-García FJ, Herrera-Mendoza AP, Giono-Cerezo S, Guerra-Infante FM. Mycoplasma hominis attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. Human Reproduction. 2006;21:1591-8.
12. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez L, Giono-Cerezo S. Comparación genómica en micoplasmas de interés médico. An Med Am Brit Cowdry Med Cent México. 2006;51:74-9.
13. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. Fertility and sterility. 2008;90:328-34.
14. Gdoura R, Kchaou W, Znazen A, et al. Screening for bacterial pathogens in semen samples from infertile men with and without leukocytospermia. Andrologia. 2008;40:209-18.
15. Jones JA, Chaban N, May M. Global Rates and Prevalence of Urogenital Mycoplasmosis: Assembly of a Dataset from Peer-Reviewed Literature. 2013.
16. Fagundo-Sierra R, Sánchez-Saínz A, Pérez-Jáuregui J. Resistencia in vitro de aislamientos clínicos de Mycoplasma hominis y Ureaplasma urealyticum en México. Bioquímica. 2006;31:124-31.
17. Busolo F, Zanchetta R. The effect of mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum on hamster egg in vitro penetration by human spermatozoa. Fertility and sterility. 1985;43:110-4.
18. Nunez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer M. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Human Reproduction. 1998;13:2756-61.
19. Reichart M, Kahane I, Bartoov B. In Vivo and In Vitro Impairment of Human and Ram Sperm Nuclear Chromatin Integrity by Sexually Transmitted Ureaplasma urealyticum Infection. Biology of Reproduction. 2000;63:1041-8.
20. Andrade-Rocha FT. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Urologia internationalis. 2003;71:377-81.
21. Peerayeh SN, Yazdi RS, Zeighami H. Association of Ureaplasma urealyticum infection with Varicocele-related in-

- fertility. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2008;2:116-9.
- 22. Rodríguez Pendás BV, Ortiz Rodríguez C, Santana Pérez F, Domínguez Alonso E, Nurquez Guerra B. *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum y bacterias aeróbicas en el semen de hombres que consultan por infertilidad*. Revista Cubana de Endocrinología. 2013;24:47-56.
 - 23. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*. 2010;16:231-45.
 - 24. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: World Health Organization; 2010.
 - 25. Savini V, Marollo R, Farina C, Fazii P, D'Antonio D. *Saccharomyces cerevisiae* versus *Candida* in the Liofilchem® AF Genital System. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6:323.
 - 26. Alim A, Çetin A, Yıldız Ç. Evaluation of vaginal flora and susceptibility test of microorganisms in reproductive-age women with or without vaginitis in primary care settings. *Cumhuriyet Medical Journal (CMJ)*. 2009;31:116-21.
 - 27. ДИАГНОСТИКА КЛ. Клинико-диагностическая значимость лабораторных тестов диагностики и оценки прогноза течения беременности. ARSMEDICA. 2010;24:51.
 - 28. Liu J, Wang Q, Ji X, et al. Prevalence of *Ureaplasma Urealyticum*, *Mycoplasma Hominis*, *Chlamydia Trachomatis* Infections, and Semen Quality in Infertile and Fertile Men in China. *Urology*. 2014;83:795-9.
 - 29. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S-I, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40:1451-5.
 - 30. Lee JS, Kim KT, Lee HS, Yang KM, Seo JT, Choe JH. Concordance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Infertile Couples: Impact on Semen Parameters. *Urology*. 2013;81:1219-24.
 - 31. Potts Jm, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of *Ureaplasma urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *The Journal of urology*. 2000;163:1775-8.
 - 32. Lingwood C, Quinn P, Wilansky S, Nutikka A, Ruhnke H, Miller R. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. *Biology of reproduction*. 1990;43:694-7.
 - 33. Burgos R, Pich OQ, Ferrer-Navarro M, Baseman JB, Querol E, Piñol J. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *Journal of bacteriology*. 2006;188:8627-37.
 - 34. Pich OQ, Burgos R, Ferrer-Navarro M, Querol E, Piñol J. Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytadherence. *Microbiology*. 2008;154:3188-98.
 - 35. Mehta SD, Gaydos C, Maclean I, et al. The effect of medical male circumcision on urogenital *Mycoplasma genitalium* among men in Kisumu, Kenya. *Sexually transmitted diseases*. 2012;39:276.
 - 36. Mehta A, Mielnik A, Paduch DA. New quantitative, molecular method for the simultaneous diagnosis of chlamydia, mycoplasma, ureaplasma, and neisseria in semen samples. *Fertility and Sterility*. 2012;98:S146.
 - 37. Fourie J, Loskutoff N, Huyser C. Elimination of bacteria from human semen during sperm preparation using density gradient centrifugation with a novel tube insert. *Andrologia*. 2012;44:513-7.
 - 38. Deguchi T, Maeda S-I, Tamaki M, et al. Analysis of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48:742-4.
 - 39. Taylor-Robinson D, Bébérard C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997;40:622-30.
 - 40. Roberts MC, Kenny GE. Dissemination of the *tetM* tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1986;29:350-2.
 - 41. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalfopristin, dirithromycin, evernimicin, gati-floxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45:2604-8.
 - 42. Yew HS, Anderson T, Coughlan E, Werno A. Induced Macrolide Resistance in *Mycoplasma genitalium* Isolates from Patients with Recurrent Nongonococcal Urethritis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49:1695-6.
 - 43. Pond MJ, Nori AV, Witney AA, Lopeman RC, Butcher PD, Sadiq ST. High prevalence of antibiotic resistant *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis: the need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. *Clinical infectious diseases*. 2013;cit752.
 - 44. Manhart LE, Gillespie CW, Lowens MS, et al. Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. *Clinical infectious diseases*. 2013;56:934-42.
 - 45. Seña AC, Lensing S, Rompalo A, et al. *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Trichomonas vaginalis* infections in men with nongonococcal urethritis: predictors and persistence after therapy. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;206:357-65.
 - 46. Takahashi S, Hamasuna R, Yasuda M, et al. Clinical efficacy of sitafloxacin 100 mg twice daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;19:941-5.