

EFEECTO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN PAREJAS INFÉRTILES Y SU RELACIÓN CON INFECCIONES GENITALES

Adriana Brufman¹, Laura Colombo², Esteban Streiger³ y Rocío Pusillico¹.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (UNR).

¹Departamento de Bioquímica Clínica UNR. ²Departamento Microbiología UNR.

³Servicio Urología. Hospital Escuela Eva Perón. Argentina.

Trabajo financiado por la Universidad Nacional de Rosario. Proyecto de Investigación y Desarrollo BIO247: "Efecto de la Respuesta inmune celular y humoral en parejas infértiles y su relación con infecciones genitales". Res.: C.S. n° 418/2011

Resumen.- **OBJETIVO:** El propósito de este estudio fue determinar la prevalencia de los diferentes microorganismos aislados del tracto urogenital de hombres infértiles y evaluar si existen diferencias en los parámetros seminales según la presencia o ausencia de infecciones genitales.

MÉTODOS: Se analizaron en forma retrospectiva los parámetros del semen en 280 muestras de hombres infértiles de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2010). El análisis microbiológico se realizó según modificación del método de Stamey-Meares propuesta por Santoianni et al.

RESULTADOS: Los estudios microbiológicos mostraron ausencia de microorganismos o presencia de colonizantes habituales no jeraquizables en el 67,86% (GRUPO 1) de las muestras, y presencia de al menos un patógeno o patógeno potencial en 32,14% del total (GRUPO 2). No se observaron diferencias significativas en volumen de eyaculado ($p=0,353$), valor de pH ($p=0,801$), movilidad ($p>0,30$), concentración de ácido cítrico ($p=0,383$) y viscosidad ($p=0,948$) entre los dos grupos. El recuento relativo de espermatozoides en los pacientes infectados fue significativamente menor que en aquellos que no presentaban patógenos ($p=0,05$). Se evaluó además el índice de teratozoospermia (IT). Las muestras de pacientes con infección presentaron valores de IT mayores ($p<0,0001$).

CONCLUSIONES: Un tercio de la población estudiada presentó infecciones genitales. En base a nuestros resultados, consideramos fundamental la realización de un espermocultivo en las primeras etapas del estudio del paciente infértil para contribuir a un adecuado tratamiento de la pareja con fallas reproductivas.

CORRESPONDENCIA



Adriana Silvia Brufman
Agrelo, 2101 – S2005OQC
Rosario, Santa Fe (Argentina)

abrufman@fbioyf.unr.edu.ar

Aceptado para publicar: 23 de diciembre 2016

Palabras clave: Infertilidad masculina. Infecciones genitales. Parámetros seminales.

Summary.- **OBJECTIVE:** The purpose of this study was to determine the prevalence of different microorganisms isolated from the urogenital tract of infertile men and assess whether there are differences in semen parameters according to the presence or absence of genital infections.

METHODS: 280 semen samples from infertile men were studied retrospectively. Semen parameters were analyzed according to the World Health Organization criteria (WHO 2010). Microbiological analysis was performed using the modified method of Stamey and Meares proposed by Santoianni et al.

RESULTS: Microbiological studies showed absence of microorganisms or presence of usual colonizing flora in 67.86% of the samples (GROUP 1) and presence of at least one pathogen or potential pathogen in 32.14% (GROUP 2). No significant differences in ejaculate volume ($p=0.353$), pH value ($p=0.801$), motility ($p>0.30$), citric acid concentration ($p=0.383$) and viscosity ($p=0.948$) were observed between the two groups. The relative sperm count was significantly lower in infected patients than in those without pathogens ($p=0.05$). Teratozoospermia index (TZI) was evaluated. Samples of infected patients showed TZI values higher than patients without microorganisms or normal genital tract flora ($p<0.0001$).

CONCLUSIONS: A third of the studied population had genital infections. Based on our results, sperm culture may be considered in the early stages of the study of the infertile patient. Early diagnosis of an infectious disease could be useful for a suitable treatment for couples with reproductive failure.

Keywords: Male infertility. Reproductive tract infections. Seminal parameters.

INTRODUCCIÓN

Los procesos infecciosos e inflamatorios del tracto genital masculino son de gran preocupación para los médicos e investigadores en el campo de la medicina reproductiva debido a sus potenciales efectos sobre la fertilidad. Muchos de los patógenos implicados causan enfermedades serias en las glándulas anexas y epidídimo y se ha verificado su transmisión a través de los procedimientos de inseminación (1, 2).

Los hombres pueden albergar infecciones subclínicas durante períodos prolongados de tiempo. Aunque no siempre están claros los mecanismos patogénicos implicados a nivel celular, de alguna forma se ve alterada la calidad del semen, sea por acción directa del microorganismo o producción de inductores de inflamación y especies oxígeno reactivas como también a través de la estimulación de formación de anticuerpos antiespermáticos (3, 4).

En el tracto genital masculino la única zona colonizada es la uretra anterior, desde allí algunos microorganismos pueden ascender y desencadenar una infección al alcanzar sitios estériles o aumentar su virulencia. Los patógenos que no forman parte de la biota habitual (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*) poseen factores de virulencia que le permiten desarrollar patologías independientemente de su recuento.

Estudios recientes sobre la microbiota del semen demuestran que tanto en hombres sanos como infértiles existe un elevado número de microorganismos. El estudio de estas comunidades parece mostrar perfiles diferentes entre los dos grupos (5).

Los principales microorganismos relacionados a estas infecciones son *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, micoplasmas y *Chlamydia* (3,6).

OBJETIVO

El propósito de este estudio fue determinar la prevalencia de los diferentes microorganismos aislados del tracto urogenital de hombres infértiles y evaluar si existen diferencias en los parámetros seminales según la presencia o ausencia de infecciones genitales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron en forma retrospectiva 280 muestras de semen de hombres cuyas edades oscilaban entre 20-45 años (media 33) que consultaron por desórdenes en la fertilidad durante el período 2014 a 2015 en el Servicio de Reproducción del Hospital Escuela "Eva Perón" de la ciudad de Granadero Baigorria, Santa Fe, Argentina. Los pacientes incluidos en el estudio presentaban al menos un parámetro seminal por debajo del límite de referencia inferior recomendado por la OMS (2010) (7). Ninguno de ellos presentaba síntomas de infección urogenital. Los hombres con trastornos endócrinos fueron excluidos del estudio.

El análisis de semen y la identificación microbiana se realizaron en el mismo eyaculado, según el protocolo de nuestro Servicio de Reproducción. Se consideraron los resultados hallados en la primera muestra de semen evaluada en nuestro Laboratorio. Los pacientes presentaron diversos diagnósticos: infertilidad primaria: 214 (76,43%), varicocele en distinto grados: 48 (17,14%); oligoastenoteratozoospermia (OAT): 8 (2,86%); prostatitis: 4 (1,43%); tumor testicular: 4 (1,43%); criptorquidia: 2 (0,71%).

Las muestras se dividieron en dos grupos:

G1: Semen de pacientes con microorganismos patógenos cualquier recuento o colonizantes habituales en recuento $\geq 1 \log_{10}$ respecto al primer chorro de orina.

G2: Semen de pacientes sin microorganismos o con colonizantes habituales (flora normal) en recuento $< 1 \log_{10}$ respecto a la orina de primer chorro (o sin infecciones).

Todas las muestras se obtuvieron previo consentimiento de los pacientes después de haber sido informados de las características del estudio, contando con autorización y aval del Comité de Ética institucional.

De acuerdo a las instrucciones recibidas, los pacientes contaban con 48 - 72 horas de abstinencia sexual y se les solicitó lavarse las manos y los genitales externos previo a la eyaculación (3,8).

Se analizaron los parámetros del semen de acuerdo con el Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2010) (7). Para la observación

de morfología de células espermáticas se usó la técnica de tinción de Hematoxilina/Eosina-Floxina y para el recuento de espermatozoides en cámara de Neubauer una dilución 1/20 en solución de Diluyente Mac Comber y Saunders (Bicarbonato de sodio 0,5% P/V en solución acuosa de formol 0,5% V/V).

Además de la evaluación de la morfología, se determinó el índice de teratozoospermia (IT), como se describe en el Manual de la OMS 2010 (7,9). El IT forma parte del protocolo de estudio de nuestro Servicio de Reproducción; es un indicador del número de anomalías presentes por cada espermatozoide anormal. De acuerdo al manual de la OMS 2010, cada espermatozoide anormal puede tener una a cuatro anomalías: anomalía de cabeza, anomalía de cuello/pieza media, anomalía de cola o presencia de gota citoplasmática. Estas anomalías pueden presentarse como un único defecto o en combinación de dos, tres o las cuatro anomalías simultáneamente. Los valores del índice de teratozoospermia están comprendidos entre 1,00 (cada espermatozoide anormal tiene un único defecto) y 4,00 (cada espermatozoide anormal tiene defectos de cabeza, pieza media, cola y gota citoplasmática).

Tabla I. Distribución de microorganismos en las muestras de semen.

	Microorganismo/s	Cantidad de pacientes	Porcentaje
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	9	3,21%
	<i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	3	1,07%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	2,50%
	<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	9	3,21%
Con al menos un patógeno	Enterobacterias	19	6,79%
	Enterococos	6	2,14%
	<i>Mycoplasma hominis</i>	6	2,14%
	<i>Ureaplasma urealyticum</i> y <i>Mycoplasma hominis</i>	7	2,50%
	<i>Ureaplasma urealyticum</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	5	1,79%
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	19	6,79%
	Sin Microorganismos o colonizantes habituales no jerarquizables ^a	190	67,86%
	Total general	280	100%

a. Se considera muestra sin microorganismos, o con colonizantes habituales en bajo recuento; siendo éstos: *Staphylococcus coagulasa negativo*; *Streptococcus grupo viridans*; *Enterococcus spp*; especies de *Neisseria spp.*; bacilos difteroides; *Gardnerella vaginalis*; *Acinetobacter spp.*; etc.

Estudios Microbiológicos

De acuerdo a lo propuesto por Santoianni et al. (3,10) se estudiaron muestras de primer chorro de orina y semen, diluido al medio para disminuir inhibidores, en agar-sangre, agar chocolate y agar Thayer-Martin (CO₂) y agar cisteína -lactosa deficiente en electrolitos (CLDE).

Se consideraron positivas aquellas muestras de semen que presentaron un recuento de colonias $\geq 1 \log_{10}$ respecto al primer chorro de orina.

El diagnóstico de infecciones por micoplasmas se llevó a cabo por técnica semicuantitativa en caldos selectivos y diferenciales. Se consideraron positivas aquellas muestras de semen que presentaban un recuento $\geq 1 \log_{10}$ del primer chorro miccional.

Investigación de *Chlamydia trachomatis* en semen

Se realizó por Inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra la proteína mayor de la membrana externa (MOMP).

Metodología estadística

Para estudiar la asociación entre variables cualitativas se utilizó la prueba Chi-cuadrado, exacta de Fisher, *t* de Student o Prueba U de Mann-Whitney según corresponda.

RESULTADOS

Los estudios microbiológicos mostraron ausencia de microorganismos o presencia de colonizantes no jeraquizables en el 67,86% (GRUPO 1) de las muestras, y presencia de al menos un patógeno o patógeno potencial en 32,14% del total (GRUPO 2). La prevalencia de los microorganismos aislados se presenta en la Tabla I.

No se observaron diferencias significativas en volumen de eyaculado, valor de pH, viscosidad, movilidad, morfología y concentración de ácido cítrico entre los distintos grupos:

Viscosidad

La asociación entre la viscosidad y la presencia de infección se evaluó con una prueba χ^2 de independencia. No se encontró asociación significativa entre ambos criterios. ($\chi^2 = 0,107$; $p = 0,948$).

pH

Para el análisis estadístico del pH de las muestras se realizó la prueba *t* de Student para datos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el pH seminal de las muestras de pacientes infértiles con y sin infección. Media aritmética \pm error estándar (7,73 \pm 0,075; 7,75 \pm 0,037 respectivamente) $t = 0,253$; $p = 0,801$.

Movilidad

Para evaluar la asociación entre la movilidad espermática y la presencia de infecciones se utilizó el test exacto de Fisher.

La movilidad se categorizó en reducida y normal. No se observó asociación significativa ($p=0,100$) entre ambos criterios. En el caso de las muestras provenientes de pacientes con infección el 55,8% presentó movilidad reducida, valor que fue del 40,2% en el caso de muestras provenientes de pacientes sin infección.

Concentración

Para la comparación de los valores medios del n° de espermatozoides/mL de G1 y G2 se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para dos muestras independientes.

G1: Me: 25 millones de espermatozoides/mL (12 millones - 80 millones).

G2: Me: 45,5 millones de espermatozoides/mL (15 millones - 107 millones).

Se observó que el valor mediano de espermatozoides por mililitro en pacientes con infección es menor que en los no infectados ($p=0,05$). Hay diferencia significativa.

Morfología

En los dos grupos estudiados se observa un alto porcentaje de espermatozoides anormales; este porcentaje es mayor en el grupo que presenta infecciones pero no es estadísticamente significativo ($p=0,53$).

Índice de Teratozoospermia

Las muestras de pacientes con infección presentaron valores de IT mayores ($p<0,0001$).

Considerando los grupos de pacientes estudiados, se realizó la prueba *t* de Student para datos

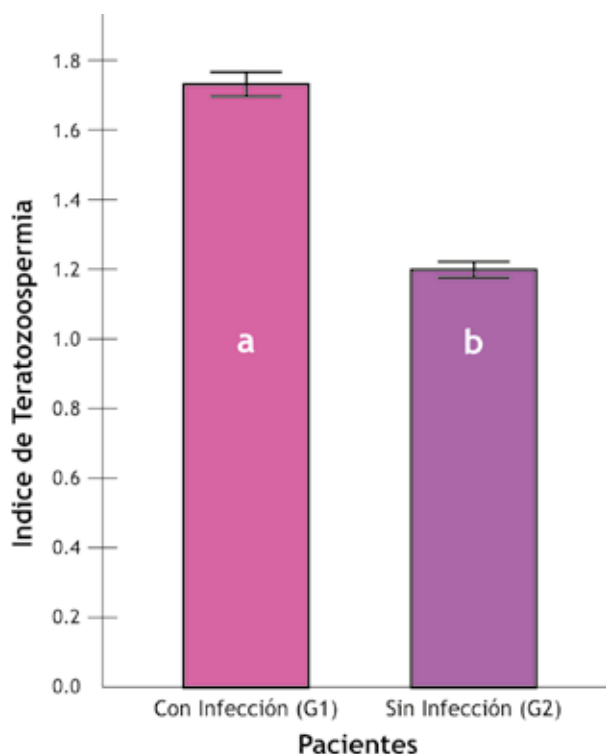


Figura 1. Distribución del Índice de teratozoospermia en hombres infértiles con y sin infecciones genitales.

independientes y se observó que la presencia de infección afecta muy significativamente el valor promedio del IT (Figura 1).

a. Los valores de IT se expresan para pacientes con infección (G1) como: media aritmética \pm error estándar: $1,74 \pm 0,045$

b. Los valores de IT se expresan para pacientes sin infección (G2) como: media aritmética \pm error estándar: $1,20 \pm 0,019$

Parámetros estadísticos (t de Student): $t=13,33$; $(p<0,0001)$

DISCUSIÓN

Existen grandes controversias en cuanto a la contribución de la bacteriospermia a la infertilidad (11-13). Los microorganismos señalados como causa de desmejoramiento en la calidad del semen poseen diferentes factores de virulencia que podrían interferir en distintos estadios del proceso reproductivo. La variación individual del microbioma, las diferencias de edad, patologías de base, los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes además de variación en los tamaños muestrales y metodología aplicada en

los distintos estudios hace difícil la comparación entre ellos. Muchas de las infecciones genitales son asintomáticas y por lo tanto no son tratadas ni estudiadas. Sin embargo existen evidencias que un tratamiento específico y prolongado logra curación microbiológica y mejora los parámetros espermáticos en un importante porcentaje de los pacientes (14,15).

En las muestras de semen de los 280 pacientes estudiados se caracterizaron algunos parámetros espermáticos y los patógenos presentes. Más del 30% de los pacientes presentó microorganismos (al menos un patógeno demostrado o potencial). Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores (6,3,16,17). La prevalencia de los microorganismos aislados se presenta en la Tabla I. Encontramos un leve predominio de *Ureaplasma urealiticum* como única flora o acompañado por otros microorganismos, seguido por enterobacterias, datos similares a los de Núñez Calong (17). Otros grupos encontraron prevalencia de enterobacterias y enterococos (6, 3,12,13).

El predominio de pacientes jóvenes en nuestro estudio podría explicar esta diferencia ya que en mayores de 35 años comienza a aumentar la frecuencia de compromiso prostático y el aislamiento de microorganismos entéricos.

Otros autores observaron alteraciones en algunos parámetros seminales en pacientes con infecciones (18-20). En nuestro estudio los pacientes en los que se aislaron patógenos presentaron disminución de la movilidad y un marcado aumento del IT (no evaluado en la bibliografía consultada) respecto a los que no presentaban microorganismos, mientras que no se vieron afectados otros parámetros. El estudio de los parámetros para cada microorganismo en particular podría cambiar estos resultados debido a su diferente mecanismo de acción en el tracto genital (21-24).

CONCLUSIONES

Un tercio de la población estudiada presentó infecciones genitales. Las alteraciones observadas en los distintos parámetros evaluados justifican la realización de un espermocultivo en las primeras etapas del estudio del paciente infértil. El diagnóstico precoz de una patología infecciosa podría colaborar con un adecuado tratamiento de la pareja con fallas reproductivas. Nuestro protocolo de estudio incluye en la primera muestra de semen, además de un espermograma, un espermocultivo. Incluimos también en nuestro protocolo de estudio la evaluación del IT. Al igual que otros autores (9), consideramos que el

estudio detallado de las anomalías morfológicas es de mayor utilidad que la simple observación del porcentaje de espermatozoides normales como predictor de fertilidad tanto in vivo como in vitro.

Aunque en un primer momento pareciera que se incrementan los gastos al realizar en una primera muestra estos estudios, se simplifica la toma de muestra por parte del paciente y los datos obtenidos contribuyen a la elección terapéutica más adecuada para ofrecer mayores chances o posibilidades de procreación a la pareja infértil, aún en caso de que sea necesario el uso de técnicas de fertilización asistida de baja o alta complejidad.

Los resultados deben evaluarse junto con otras pruebas de diagnóstico y la clínica. De esta manera, el médico especialista tomará una decisión terapéutica que tienda a mejorar la calidad de vida de los pacientes y contribuir a la solución de problemas de infertilidad aún no resueltos.

AGRADECIMIENTOS

A Selva Alfaro, por su colaboración en la recopilación de datos, al Ing. Ricardo Di Masso por su asistencia en el procesamiento estadístico y al Arq. Carlos Cabrera por su asistencia en el diseño de gráficos y tablas.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

Trabajo financiado por la Universidad Nacional de Rosario. Proyecto de Investigación y Desarrollo BIO247: "Efecto de la Respuesta inmune celular y humoral en parejas infértiles y su relación con infecciones genitales". Res.: C.S. n° 418/2011.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses. Las fuentes de financiación no han tenido participación en el diseño del estudio, la colección de datos, el análisis o la interpretación de éstos, en la redacción del manuscrito o en la decisión de enviarlo para su publicación.

BIBLIOGRAFÍA y LECTURAS RECOMENDADAS (*lectura de interés y **lectura fundamental)

1. Harrison K, Darling N, Vargas K, Irving J, Osborn J, Yazdani A, et al. Incidence of transmissible diseases in a network of assisted reproduction clinics throughout Queensland, Aust. *N Z J Obstet Gynaecol*. 2015. 55(5):515-7.
- *2. Boitrelle F, Robin G, Lefebvre C, Bailly M, Selva J, Courcol R et al. Bacteriospermia in Assisted Reproductive Techniques: effects of bacteria on spermatozoa and seminal plasma, diagnosis and treatment. *Gynecol Obstet Fertil*. 2012. 40(4):226-34
- **3. Santoianni JE, Mormandi E, Smayevsky J, Nagelberg A, Farinati AE, Terradas C et al. Primer Consenso Argentino sobre diagnóstico de las infecciones de las vías espermáticas y glándulas anexas en infertilidad. *Bioquím Patol Clín*. 2002. 66(1):9-27.
4. Fraczek M, Kurpisz M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015. 53(3):201-17
5. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014. 9(10):e110152.
- *6. Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico M, Giannerini V, et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet*. 2009. 26:47-56.
- **7. World Health Organization. WHO laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. 2010 Ed. World Health Organization
8. Krissi H, Orvieto R, Ashkenazi J, Gilboa Y, Shalev J, Moscovitch I, et al. Effect of contaminated preprocessed semen on fertilization rate and embryo quality in assisted reproductive techniques. *Gynecol Endocrinol*. 2004. 18(2):63-7.
- *9. Menkveld R, Wong W, Lombard C, Wetzels A, Thomas C, Merkus H, et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod*. 2001. 16(6):1165-71
- **10. Stamey T, Meares E. Bacteriological localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *InvestUrol*. 1968. 5:492-518.
11. Terradas C, Mormandi E, Rodriguez M, Aszpiz S, Levalle O. Impacto de la infección detectada en semen sobre las variables espermáticas. *Bol.Soc.Arg. Androl* 1995. 3:38
12. Filipia E, Marchlewska K, Oszukowska E, Walczak-Jedrzejowska R, Swierczynska-Cieplucha A, Kula K. Presence of aerobic micro-organisms and their influence on basic semen parameters in infertile men. *Andrología*. 2015. 47(7): 826-31.
13. Ruggeri M, Cannas S, Cubeddu M, Molicotti P, Piras G, Dessole S, et al. Bacterial agents as a cause of infertility in humans. *New Microbiologica*. 2016. 39(3): 206-20.

14. Cardoso E, Santoianni E, De Paulis A, Andrada J, Predari S, Arregger A. Improvement of semen quality in infected asymptomatic infertile male after bacteriological cure. *Medicina (Bs. Aires)*. 1998. 58(2):160-4.
15. Terradas C, Rodríguez Peña M, Grasso E, Nagelberg A. Evaluación de la eficacia de la levofloxacin comparando dos esquemas terapéuticos y estudio de la capacidad oxidante del plasma seminal en pacientes con infección del tracto genital. *Rev. Arg. de Urol.* 2011. 76(1):12-16.
16. 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(3): 209- 17.
17. Núñez Calonge R, Cortés Gallego S, Gago García M, Pueyo Cañero A, Peramo Moya B, Caballero P. Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad *Rev Int Androl.* 2007.5(3):206-11.
- *18. Comhaire F, Mahmoud A, Depuydt C, Zatala A, Christophe A. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint *Hum. Reprod. Update.* 1999. 5(5): 393-98.
19. Ombelet W, Menkveld R, Kruger F, Steeno O. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum. Reprod. Update.* 1995. 1(6):543-57.
20. La Vignera S, Vicari E, Condorelli R, D'Agata R, Calogero A. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int J Androl.* 2011.34(5):330-47.
21. Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Schroeder-Printzen I, Michelmann H, Schiefer H, et al. Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters in vitro. *Andrologia.* 2003. 35(2):100-5.
22. Lang T, Dechant M, Sanchez V, Wistuba J, Boiani M, Pilatz A, et al. Structural and functional integrity of spermatozoa is compromised as a consequence of acute uropathogenic *E. coli*- associated epididymitis. *Biol Reprod.* 2013. 19;89(3):59.1-10.
23. Mazzoli S, Cai T, Addonizio P, Bechi A, Mondaini N, Bartoletti R. *Chlamydia trachomatis* infection is related to poor semen quality in young prostatitis patients. *Eur. Urol.* 2016.57(4): 708-14.
24. Huang C, Zhu H, Xu K, Wang S, Fan L, Zhu W. Mycoplasma and ureaplasma infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology.* 2015. 3(5):809-16.