

O Exame do Sêmen na Infertilidade Masculina: V- Exame Microbiológico

The microbiological examination of the sêmen to evaluate male infertility

Fernando Tadeu Andrade-Rocha

RESUMO - Neste artigo, o autor revisa o papel do exame microbiológico do sêmen para avaliar infertilidade masculina. São descritos os efeitos negativos de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, micoplasmas, fungos, *Trichomonas sp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus sp.* na qualidade do sêmen. A influência de leucocitosp.ermia e bacteriospermia também é revisada. Simultaneamente, também são feitas algumas considerações sobre metodologias atualmente usadas para investigar estes microrganismos no sêmen.

PALAVRAS-CHAVE - Sêmen; infertilidade; microbiologia; cultura; anaeróbios; micoplasmas; *Chlamydia trachomatis*; leucocitosp.ermia; bacteriospermia.

SUMMARY - In this article, the author reviews the role of the microbiological examination of the semen to evaluate male infertility. They are described negative effects of aerobic and anaerobic bacteria, mycoplasmas, fungi, *Trichomonas sp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* and *Mobiluncus sp.* on the semen quality. Influence of leukocytosp.ermia, and bacteriosp.ermia are also reviewed. Simultaneously, they are also made some considerations about methodologies currently used to investigate these microorganisms on semen.

KEYWORDS - semen; infertility; microbiology; culture; anaerobes; mycoplasmas; *Chlamydia trachomatis*; leukocytosp.ermia; bacteriosp.ermia.

INTRODUÇÃO

Infertilidade masculina é um distúrbio que afeta um grande número de indivíduos em todo o mundo e, com frequência, o laboratório de análises clínicas é requisitado por especialistas, para auxiliar na sua investigação. O exame do sêmen (espermograma) é o principal exame solicitado nesta investigação.

Em publicações prévias sobre o assunto, (2,3,5,6,7,8) este autor abordou diversos aspectos clínicos e laboratoriais do espermograma, na investigação de infertilidade masculina. Foram revisadas as metodologias usadas no exame, a interpretação dos resultados e sua importância para o diagnóstico. No presente trabalho, o objetivo é continuar esta abordagem, dando ênfase ao exame microbiológico do sêmen. O autor faz várias considerações sobre microrganismos detectados no sêmen, sua relação com processos infecciosos e sua influência na capacidade reprodutiva do homem. O autor também faz algumas considerações sobre metodologias empregadas nesta análise.

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Para a análise microbiológica do sêmen, três fatores são básicos para se obter resultados satisfatórios e de valor clínico: 1- a sintomatologia do paciente; 2- a presença de bactérias no sêmen (bacteriospermia); 3- o aumento de leucócitos no sêmen (leucocitosp.ermia). Considerando que, na prática laboratorial, poucos pacientes procuram o laboratório com uma sintomatologia bem definida de infecção genital, os processos infecciosos detectados no exame do sêmen, geralmente são de pacientes que se submetem a um exame de rotina, principalmente, para investigação de infertilidade masculina, ou seja, são assintomáticos. Neste caso, o exame detecta leucocitosp.ermia, que não é, a princípio, indicativa de infecção genital, como se explica adiante. Em contraste, muitas vezes o exame não apresenta bacteriospermia, (cuja pesquisa não é efetuada de rotina na maioria dos laboratórios), o que dificulta o diagnóstico.

Desta forma, é muito difícil caracterizar uma associação entre sintomatologia, leucocitosp.ermia e bacteriospermia, quando o paciente faz um espermograma e são vários os motivos, como segue:

1. Diversos microrganismos colonizam a uretra masculina em condições normais, sem causar infecções. São considerados contaminantes (22,63).
 2. Às vezes, algumas bactérias residentes na uretra se proliferam em quantidade, tornando-se potencialmente patogênicas. Neste caso, desenvolvem infecção temporária (69).
 3. Em muitos exames, a bacteriospermia é intensa, mas não se associa com uma sintomatologia definida ou com leucocitosp.ermia (71).
 4. Alguns pacientes são assintomáticos, mas o exame detecta uma leucocitosp.ermia acentuada. Este quadro é conhecido como infecção silenciosa (64).
 5. Às vezes, o paciente apresenta sintomas, com ou sem leucocitosp.ermia e/ou bacteriospermia. Isso acontece com alguns tipos de prostatites (36).
 6. Alguns exames apresentam uma elevada proliferação de bactérias anaeróbicas, que são potencialmente patogênicas e podem desenvolver um processo infeccioso (27). Geralmente, as infecções causadas por estas bactérias não são investigadas clinicamente, ou na rotina microbiológica do sêmen.
 7. O plasma seminal contém várias substâncias com propriedades antimicrobianas, que funcionam como uma barreira à proliferação bacteriana (37).
 8. Também se observa com frequência alterações em marcadores da próstata e das vesículas seminais (21). Entretanto, estas alterações são desconsideradas clinicamente, embora possam ajudar na localização do sítio da infecção. Ressalta-se que muitos laboratórios não pesquisam marcadores bioquímicos glandulares de rotina, apesar de serem úteis para o diagnóstico (10).
- Como se observa, dificilmente se caracteriza uma associação bem definida entre sintomatologia, leucocitosp.ermia e bacteriosp.ermia na maioria dos exames, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico.

Recebido em 06/12/2006

Aprovado em 26/12/2007

Laboratório Dr. Homero Soares Ramos, Unidade de Pesquisa do Sêmen, Petrópolis, RJ

Laboratório Dr. Ivan Mostaro, Juiz de Fora, MG

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MICRORGANISMOS DETECTADOS NO SÊMEN

O isolamento de bactérias e outros microrganismos no sêmen variam entre 10 e 100% das amostras analisadas, dependendo da população estudada (61). A prevalência das espécies também é variável, pois há vários fatores que afetam o isolamento destes microrganismos, como segue:

- As populações avaliadas em estudos prévios foram heterogêneas (homens férteis, inférteis, com uretrite, prostatite, etc.) e os resultados bem variados (46);
- Vários estudos não usaram procedimentos, para evitar a contaminação do sêmen pela flora bacteriana uretral durante a colheita, o que aumenta a frequência bacteriana da amostra analisada (14);
- As investigações reportadas previamente, de um modo geral, não pesquisaram todos os microrganismos que podem ser detectados no sêmen.

Desta forma, praticamente não há uma informação bem definida, sobre a prevalência de microrganismos no sêmen e seu papel etiológico em infecções genitais. São apenas informações isoladas, muitas vezes conflitantes e, geralmente, de pouco valor clínico. Consultando as informações disponíveis, resume-se, que os seguintes microrganismos podem ser detectados no sêmen (veja Tabela I):

TABELA I

Microrganismos comensais e potencialmente patogênicos que podem ser detectados no sêmen

Bactérias aeróbicas	Bactérias anaeróbicas e facultativas	Fungos	Outros microrganismos
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Peptococcus</i> sp..	<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Peptostreptococcus</i> sp..	<i>Candida krusei</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp..	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Corynebacterium</i> sp..	<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Eubacterium</i> sp..	<i>Rhodotorula</i> sp..	<i>Trichomonas</i> sp..
<i>Enterobacteriaceae</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp..		
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Propionibacterium</i> sp..		
	<i>Bacillus</i> sp..		
	<i>Clostridium</i> sp..		
	<i>Neisseria</i> sp..		
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
	<i>Veillonella</i> sp..		
	<i>Acinetobacter</i> s.p		
	<i>Actinomyces</i> sp..		
	<i>Bacteroides</i> sp..		
	<i>Fusobacterium</i> sp..		
	<i>Gardnerella</i> sp..		
	<i>Mobiluncus</i> sp..		

Bactérias aeróbicas gram positivas

São as bactérias mais comuns, predominando os cocos gram positivos (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) (71). Em pacientes assintomáticos, a colonização destas bactérias ocorre na glândula, uretra proximal e uretra distal (22,81,98). O isolamento varia entre 10% e 100% das amostras e geralmente ocorre em baixas concentrações (<10⁴ unidades formadoras de colônias/ml – ufc/ml). Estas características indicam, que são bactérias residentes da uretra e podem ser carregadas pelo sêmen durante a ejaculação. Portanto, seu isolamento no líquido seminal não é indicativo de infecção genital e ocorre com frequência em homens assintomáticos. Por outro lado, o isolamento em concentrações >10⁴ ufc/ml é raro e sugestivo de infecção genital.

Bactérias aeróbicas gram negativas

Sua frequência é menor que 10% (46) e raramente são isoladas em homens assintomáticos. Portanto, sua presença no sêmen é sugestiva de infecção genital. *Escherichia coli* é a bactéria mais comum, mas são também detectados *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. e raramente a *Pseudomonas* sp.. Estas bactérias geralmente afetam a motilidade espermática (40).

Bactérias anaeróbicas

A presença de bactérias anaeróbicas no sêmen é conhecida há muito tempo, mas, pouca atenção é dada a seu isolamento e sua etiologia em infecções genitais. Rotineiramente isolam-se *Peptococcus* sp. e *Peptostreptococcus* sp., *Eubacterium* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp. e com menor frequência *Corynebacterium* sp. (27,43). Este isolamento ocorre em indivíduos assintomáticos (98), com uretrite, prostatite, prostato-vesiculites e balanitis (74). De um modo geral, as bactérias anaeróbicas são habitantes naturais da uretra, mas são potencialmente patogênicas. Desta forma, em algumas circunstâncias desenvolvem um processo infeccioso, geralmente de natureza polimicrobiana. Assim é comum o isolamento de diferentes bactérias anaeróbicas (às vezes 5 ou mais bactérias) na mesma amostra seminal.

No trato genital feminino é bem definida, a associação destas bactérias com infecções ginecológicas e obstétricas graves, vaginite e vaginose bacteriana (15,53,54). Contrastando com seu alto poder infectante, estes microrganismos também são isolados em mulheres normais (54).

Além das espécies citadas acima, também se isolam de rotina no exame microbiológico do sêmen *Lactobacillus* sp., *Veillonella* sp., *Propionibacterium* sp. e *Bifidobacterium* sp.. Por outro lado, raramente são isoladas *Actinomyces* sp. e *Clostridium* sp., *Neisseria* sp. (incluindo a *Neisseria gonorrhoeae*) e algumas bactérias não convencionais tais como *Rubrivivax* sp., *Burkholderia* sp. e *Streptococcus pneumoniae* (43). Ressalta-se que, em um estudo anterior (42), observou-se a aderência de bactérias anaeróbicas em células do epitélio uretral presentes no ejaculado. Desta forma, suspeita-se que o sêmen pode ser um veículo de transmissão destes microrganismos para o trato genital feminino, causando a vaginose bacteriana. Tal característica também foi observada por este autor previamente (2).

Micoplasmas

Micoplasmas são microrganismos da classe Mollicutes, que abrange mais de 120 espécies, das quais, seis colonizam o trato genital masculino (84). Destas, três são considerados clinicamente importantes: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma urealyticum*. Estas espécies são potencialmente patogênicas e atuam como agentes etiológicos de infecções genitais, inclusive no trato genital feminino.

Micoplasmas são conhecidos desde o século 19 (65), mas o primeiro isolamento em seres humanos somente foi reportado em 1937, por Dienes & Edsall (25), que detectaram um microrganismo com características sugestivas de *Mycoplasma hominis* em uma mulher com abscesso na glândula de Bartholin. Esta espécie somente foi definitivamente identificada nos anos 50, ao passo que o *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma genitalium* foram descobertos nas décadas de 50 e 80, respectivamente.

Resume-se a importância clínica das espécies de micoplasmas no trato genital masculino como segue:

Mycoplasmas hominis – No homem é descrito como comensal, por ser frequentemente isolado em indivíduos assinto-

máticos (84). Porém, também é um agente etiológico de uretrite não gonocócica, balanopostites e prostatites e de vaginose bacteriana, doença inflamatória pélvica, septicemia pós-parto, ruptura de membranas e corioamnionites em mulheres (87). Partos prematuros e problemas neonatais também são comuns, quando a mãe é portadora deste microrganismo (12,35). Recentes evidências também indicam que o *Mycoplasma hominis* pode se fixar e penetrar nos espermatozoides, afetando a capacidade de fertilização (23).

Mycoplasma genitalium – Este microrganismo foi isolado pela primeira vez na década de 80 (89), mas sua ação como patógeno genital é pouco conhecida, por ser difícil seu isolamento através de cultura. Sabe-se que o *Mycoplasma genitalium* causa uretrite não gonocócica e *Chlamydia trachomatis* negativa, aguda e provavelmente crônica (85), supostamente tão frequente quanto às uretrites por *Chlamydia trachomatis* e caracterizada por uma forte resposta inflamatória. Também é isolado em uretrites recorrentes resistentes a tratamento (41) e em homens assintomáticos (prevalência de 0,8% a 9,1%) (104). Apesar de sua presença na uretra, raramente é detectado no sêmen (menos de 1% das amostras), embora se suspeita que se envolva com epididimites e prostatites aguda e crônica (72). Na mulher, foi observada sua associação com uretrites, cervicites (inclusive mucopurulenta), endometrite, e salpingites (86). Em contraste com o *Mycoplasma hominis*, raramente é detectado em mulheres com vaginose bacteriana (59). *Mycoplasma genitalium* também pode se fixar nos espermatozoides e serem transmitidos para o trato genital feminino (83), provavelmente prejudicando a fertilização.

Ureaplasma urealyticum – É o menor microrganismo vivo conhecido. Sua prevalência no trato genital masculino varia entre 30 e 85% (82) e seu isolamento no sêmen, entre 7% e 42% (61). Há 14 sorotipos de *Ureaplasma urealyticum* conhecidos, classificados por análise filogenética em 2 biovars, o biovar 1 ou Parvum Biovar que abrange os sorotipos 1,3,6 e 14 e o biovar 2, ou biovar T960, que inclui os demais (70). Evidências mais recentes indicam que estes biovars seriam 2 espécies distintas, o *Ureaplasma parvum* (Biovar 1) e o *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) (48). Suspeita-se, que alguns sorotipos se associam com doenças, enquanto que outros não apresentam esta característica. Pelo fato de ser desprovido de membrana celular e de reduzido tamanho, o *Ureaplasma urealyticum* se adere facilmente aos espermatozoides, particularmente na peça intermediária e no flagelo. Esta aderência promove uma peroxidação lipídica, que reduz a fluidez da membrana espermática, aumentando a quantidade de radicais livres no sêmen (estresse oxidativo) (68) e provoca um enrolamento do flagelo ("coil tail") (66). Estes distúrbios prejudicam a motilidade espermática e a capacidade de fertilização. Às vezes, o *Ureaplasma urealyticum* também induz à formação de anticorpos antiespermatozoides (79), apoptose (morte celular programada) anormal e fragmentação do DNA (102), afetando o desenvolvimento do embrião, após a fertilização. Por causa destes efeitos, constantemente se associa o *Ureaplasma urealyticum* com infertilidade masculina, embora não haja um consenso sobre esta associação.

São muitas as dificuldades para estabelecer a patogenicidade do *Ureaplasma urealyticum*, a qual pode estar vinculada a determinados sorotipos, mas poucos avanços foram obtidos nesta área. Na prática clínica, relatos demonstraram que o *Ureaplasma urealyticum* causa epididimites, prostatites (cuja prevalência é alta) e uretrite não gonocócica (84). Entretanto, este microrganismo é muito isolado em homens assintomáticos, o que dificulta sua caracteri-

zação como agente etiológico de infecções genitais (82). Curiosamente, parece que o *Ureaplasma urealyticum* não se associa com leucocitospermia, mesmo em pacientes sintomáticos (68). Esta característica também foi observada por este autor em estudos feitos anteriormente, com secreções uretrais (1) e semens (9).

Na mulher foi relatado o envolvimento de *Ureaplasma urealyticum* com infecções genitais, patologias obstétricas, nascimento prematuro e infecções neonatais (44).

Vários métodos são avaliáveis para o diagnóstico laboratorial de micoplasmas usando meios de cultura seletivos e técnicas de biologia molecular (PCR). Como estes microrganismos são extremamente sensíveis a condições adversas, as amostras devem ser inoculadas imediatamente, ou em meios de transporte apropriados (A3b, por exemplo). Para o *Mycoplasma hominis* e o *Ureaplasma urealyticum*, alguns meios líquidos (caldos U10, MLA, B broth) e sólidos (A7) são usados. Técnicas de biologia molecular são recomendadas para detectar *Mycoplasma genitalium*, mas, também podem ser usadas para o *Mycoplasma hominis* e para o *Ureaplasma urealyticum* e o *Ureaplasma parvum* (105).

Chlamydia trachomatis

A *Chlamydia trachomatis* é um significativo agente etiológico de doenças sexualmente transmissíveis, que causa cerca de 90 milhões de novos casos por ano em todo o mundo (30). No Brasil não há dados disponíveis, mas sabe-se que a incidência deste patógeno também é bastante elevada.

Infecções por *Chlamydia trachomatis* desenvolvem-se a partir da fixação de corpos elementares (EB) metabolicamente inertes do patógeno, em células epiteliais da uretra formando uma inclusão (vacúolo). Nesta inclusão, os corpos elementares se diferenciam em corpúsculo reticulado (RB), a forma ativa do patógeno, que prolifera e desenvolve a infecção. Simultaneamente, os corpúsculos reticulados se diferenciam em novos corpos elementares, que se rompem e infectam outras células, reiniciando o ciclo (19). A *Chlamydia trachomatis* causa inflamação aguda na uretra, geralmente caracterizada por corrimento intenso, resultante de uma forte resposta inflamatória, que, de um modo geral, é facilmente tratada com antibióticos.

Por sua capacidade de disseminação dentro do trato genital masculino, a *Chlamydia trachomatis* também pode colonizar a próstata, as vesículas seminais e os epidídimos, onde também desenvolve infecções agudas e crônicas (95). Entretanto, seu papel etiológico em infecções nestes órgãos não é bem definido. Sabe-se apenas que estas infecções às vezes causam oclusões nos ductos excretórios, danos na espermatogênese e respostas imunológicas com a produção de anticorpos antiespermatozoides (31), afetando a capacidade reprodutiva do homem.

A *Chlamydia trachomatis* é facilmente detectada em swabs uretrais e na urina, mas é pouco demonstrável em outras secreções genitais masculinas. Igualmente observou-se, que a presença de anticorpos séricos ou seminais anti-*Chlamydia* não são indicativos de uma infecção corrente, pois também são detectados em homens assintomáticos ou sem uma resposta inflamatória bem definida (56).

Basicamente, há o seguinte consenso sobre o papel etiológico da *Chlamydia trachomatis* em infecções genitais masculinas e sobre sua influência na capacidade reprodutiva do homem (28,31,67,97): 1- O patógeno é bem caracterizado em uretrites e epididimites; 2- Nos epidídimos às vezes provoca uma estenose parcial ou total destes órgãos e dos ductos ejaculatórios, que comprometem dramaticamente a fertilidade masculina. Em alguns casos, resultam em azo-

ospermia; 3- Dependendo da resposta imune ao patógeno, formam-se anticorpos antiespermatozóides, os quais também afetam a fertilidade masculina; 4- Por seu suposto envolvimento com prostatites crônicas, suspeita-se que a *Chlamydia trachomatis* cause diversas anormalidades seminais, tais como hipospermia, baixos níveis de frutose e de marcadores bioquímicos da próstata, edema, dilatação das vesículas seminais, dos ductos ejaculatórios e do plexo venoso periprostatico, além de calcificações intraprostaticas. Estas anormalidades afetam a atividade secretora glandular e a qualidade do sêmen. 5- Também há evidências que a *Chlamydia trachomatis* aumenta a apoptose das células germinais imaturas, afetando a produção de espermatozóides. Um lipopolissacarídeo presente em sua estrutura seria o responsável por este fenômeno. 6- Outras evidências indicam que a resposta imune às infecções por *Chlamydia trachomatis* promove peroxidação lipídica da membrana espermática, aumentando a produção de radicais livres, os quais também afetam a fertilidade masculina. 7- Por outro lado, este patógeno pode ser detectado em 70 a 80% de mulheres e 50% de homens assintomáticos, o que também é uma grande preocupação para epidemiologistas, por causa de sua transmissão sexual para parceiros não infectados.

Considerando a importância clínica e epidemiológica da *Chlamydia trachomatis* no trato genital masculino, deve-se enfatizar que este patógeno tem a capacidade de usar os espermatozóides como veículo de transmissão para o trato genital feminino, durante a ejaculação (93). Apesar da travessia da acidez vaginal ser nociva à sua sobrevivência, a *Chlamydia trachomatis* prolifera com facilidade, quando alcança o muco cervical e, por sua capacidade ascendente, também coloniza as partes superiores do trato genital feminino, causando doença inflamatória pélvica, infertilidade, e gravidez tubária (80). Esta é a principal preocupação de especialistas em reprodução humana, em relação à *Chlamydia trachomatis*.

Resumindo, suspeita-se que a *Chlamydia trachomatis* afete a fertilidade masculina, embora isto não seja ainda bem definido. Clinicamente, sua importância para casais inférteis, diz respeito, principalmente, aos danos que este patógeno causa no trato genital feminino. Sua detecção é efetuada por técnicas de cultura celular, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático, sendo os métodos por biologia molecular, particularmente os testes por amplificação de ácidos nucleicos, os mais sensíveis para detecção deste patógeno (77).

Fungos

A presença de fungos no sêmen é pouco reportada na literatura, embora estes microrganismos sejam freqüentes, principalmente, no trato genital feminino. De fato, a mulher apresenta uma tendência para adquirir candidíase com facilidade, mas, apesar de sua transmissão sexual, raramente se isola *Candida albicans* no sêmen (incidência menor que 4%) (62), mesmo sendo este microrganismo muito comum em balanopostites (60). A *Candida albicans* é o fungo de maior prevalência, mas outras espécies também são detectadas, tais como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida Krusei* (52). O presente autor também já isolou *Rhodotorula sp.* em uma amostra seminal de um paciente infértil (dados não publicados), apesar deste fungo ser predominantemente detectado em semens de animais (26).

A influência de fungos na qualidade do sêmen é pouco conhecida. Há evidências que prejudicam a motilidade espermática (57) e causam fragmentação do DNA e apoptose anormal (16). Estes distúrbios afetam a capacidade de

fertilização, principalmente, em reprodução assistida. Uma vez presente no sêmen, se transmitem sexualmente para a mulher e desenvolvem infecções, também prejudicando sua capacidade reprodutora.

Trichomonas sp.

A presença de *Trichomonas sp.* no trato reprodutor masculino é documentada na literatura, incluindo sua detecção no sêmen. Sua freqüência é estimada em 4%, para homens assintomáticos e até 58%, em pacientes com alto risco para a infecção (33). *Trichomonas sp.* causa orqui-epididimites, prostatites e uretrites, mas sua influência na qualidade do sêmen é pouca conhecida. Há evidências que este microrganismo reduz a motilidade e a vitalidade espermática, o número de espermatozóides morfológicamente normais, o teste hiposmótico e causam hiperviscosidade seminal, (33,49) alterações que comprometem a fertilidade masculina. *Trichomonas sp.* também é detectado em pacientes com prostatites, (51) mas, neste caso, seus efeitos na qualidade do sêmen são praticamente desconhecidos.

Gardnerella vaginalis

Em associação com bactérias anaeróbicas, *Mobiluncus sp.* e micoplasmas, a *Gardnerella vaginalis* causa a vaginose bacteriana, uma infecção genital muito comum na mulher em idade reprodutiva. Além de promover mudanças radicais no pH vaginal, a vaginose bacteriana caracteriza-se por intensa proliferação bacteriana, desaparecimento da flora normal da vagina e pela formação de estruturas celulares conhecidas como células guias ("clue cells"), que são células do epitélio vaginal com membrana citoplasmática revestida de bactérias, as quais, muitas vezes, também ocupam seu citoplasma, promovendo uma intensa destruição celular (78).

No homem, também se demonstrou que a *Gardnerella vaginalis* e outros agentes etiológicos da vaginose bacteriana colonizam a uretra e formam células guias (94) desenvolvendo a infecção e re-infectando a mulher pelo contato sexual. De fato, estudos prévios demonstraram que o sêmen é um veículo de transmissão sexual dos agentes etiológicos da vaginose bacteriana (4,17,42,94),.

Se a vaginose bacteriana é uma infecção genital clinicamente bem definida na mulher, quanto à sintomatologia e agentes etiológicos, há poucas informações na literatura sobre a influência da *Gardnerella vaginalis* na fertilidade masculina. Há relatos que este microrganismo não afeta a qualidade do sêmen (42,47). Entretanto, dados do presente autor sugerem uma influência negativa sobre a motilidade espermática (dados não publicados). Também se suspeita, que a *Gardnerella vaginalis* prejudica a implantação do embrião em reprodução assistida (99). Entretanto, são dados ainda pouco conclusivos.

Mobiluncus sp.

Assim como a *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp.* também participam do conglomerado bacteriano responsável pela vaginose bacteriana. Estes microrganismos são bacilos anaeróbicos curvos gram negativos, geralmente isolados no trato genital feminino. Duas espécies são esporadicamente detectadas no sêmen: *M. mullieris* e *M. curtisii* (90). Em pacientes inférteis, o isolamento é inferior a 10% das amostras seminais (39). Porém, praticamente não há informações sobre sua influência na qualidade do sêmen. Por ser um agente etiológico da vaginose bacteriana, supõe-se que também afete negativamente.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LEUCOCITOSPERMIA

O aumento de leucócitos no sêmen em valores maiores que $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ é uma alteração seminal conhecida como leucocitospermia. Este distúrbio geralmente é sugestivo de infecção genital, embora esta não seja caracterizada em muitas amostras seminais analisadas de rotina. Leucocitospermia, pode se associar com um aumento de bactérias no sêmen (27,71) e com alterações em marcadores bioquímicos da próstata e das vesículas seminais (10,21,32,58), o que ajuda na identificação dos agentes etiológicos e do sítio da infecção, respectivamente.

Apesar da leucocitospermia ser um achado comum no exame do sêmen, sua influência sobre a função espermática é controversa, sendo este um tema de permanente debate há muitas décadas. Isto se demonstra pela grande quantidade de artigos reportados nos últimos 30 anos sobre este assunto. Apesar de tantas abordagens, ainda são pouco conhecidas as causas do aumento de leucócitos no sêmen, seus mecanismos biológicos e em que casos, especificamente, afetariam a função espermática, prejudicando a capacidade reprodutiva do homem. De fato, leucócitos têm um papel importante no sêmen, pois remove espermatozoides anormais ou degenerados. Também produzem radicais livres, que em concentrações normais são essenciais para a fisiologia seminal. Por outro lado, o aumento de leucócitos em níveis superiores àqueles descritos pela OMS pode levar a um estado denominado estresse oxidativo, que se caracteriza por excessiva produção de radicais livres, o quais prejudicam a reação acrossômica (evento essencial para o processo de fertilização) e a integridade do DNA espermático, afetando a capacidade de fertilização (55,76). Leucocitospermia tem várias etiologias: infecções bacterianas (46), infecções virais (50), espermatogênese anormal (13) e fatores diversos tais como cigarro, álcool e drogas de abuso (20). Muitos estudos encontraram uma relação entre leucocitospermia e infertilidade (11,29,75,100,103). Entretanto, outros não foram capazes de fazê-lo (88,96), ao passo que, alguns autores identificaram até um efeito positivo da leucocitospermia no sêmen (45). Outros estudos mostraram que o aumento de leucócitos no sêmen pode se associar com uma produção exagerada de anticorpos antiespermatozoides, de radicais livres e com alterações nos marcadores físico-químicos de próstata e das vesículas seminais, os quais afetam a qualidade do sêmen (55,101). Na verdade, o tema é bastante complexo e abrangente e as informações disponíveis são controversas e pouco conclusivas.

Outro aspecto importante da leucocitospermia diz respeito aos produtos leucocitários. Além dos radicais livres, que são produzidos em excesso na leucocitospermia, níveis aumentados de algumas citocinas (interferon gama, fator alfa necrose tumoral) são detectados no sêmen (18) e também causam efeitos deletérios sobre os espermatozoides, particularmente na motilidade espermática. No entanto, a influência destas substâncias varia em intensidade e depende das subpopulações leucocitárias presentes, da origem do distúrbio e de sua duração. Esta área é ainda pouco pesquisada.

Na rotina de análise do sêmen, a maioria das amostras contém concentrações normais de leucócitos ($<1,0 \times 10^6/\text{ml}$). De um modo geral, granulócitos representam 50 a 60% de todos os leucócitos seminais, macrófagos de 20% a 30% e T-linfócitos de 2% a 5% (88). Células plasmáticas, B-linfócitos e eosinófilos, raramente são encontrados. Ressalta-se, que os métodos usados de rotina para detectar leucócitos no sêmen não são capazes de estimar estas subpopulações

leucocitárias, individualmente. Isto somente é possível com metodologias que usam anticorpos monoclonais (101).

Se a presença de leucócitos no sêmen é um fato bem documentado, mas seus efeitos sobre a qualidade do sêmen não são bem definidos, o valor de referência atualmente recomendado pela OMS, também é um assunto controverso. De fato, alguns estudos mostraram que semens com valores $>1,0 \times 10^6/\text{ml}$ também são encontrados em pacientes férteis (38). Ao mesmo tempo, quando se estudou pacientes inférteis, alguns resultados não estabeleceram uma relação bem definida entre leucocitospermia e infertilidade (88,96). Apontam-se como as principais causas destas distorções, as diferentes metodologias usadas nos estudos efetuados, a origem do infiltrado leucocitário, as subpopulações leucocitárias presentes, os diferentes mecanismos de ativação celular, que variam com a natureza e com as características do processo infeccioso presente e a complexidade dos mecanismos que regulam a produção de radicais livres pelos leucócitos e de antioxidantes seminais. Estes fatores induzem a resultados conflitantes e pouco conclusivos. Como se observa, uma simples contagem de leucócitos no sêmen não é suficiente para avaliar todos os fatores envolvidos na resposta leucocitária e seus efeitos sobre a função espermática. Em adição, experimentos com pacientes submetidos a técnicas de reprodução assistida também mostraram, que os danos sobre os espermatozoides podem ser maiores in vitro do que in vivo (92). Com base estas observações, conclui-se que ainda persistem inúmeras dúvidas sobre os efeitos da leucocitospermia na qualidade do sêmen e sua importância clínica.

INFLUÊNCIA DA BACTERIOSPERMIA NA QUALIDADE DO SÊMEN

A presença de bactérias no sêmen também é um fato bem documentado na literatura, assim como sua influência em características espermáticas e na atividade secretora das glândulas acessórias genitais. Há inúmeros relatos sobre bactérias aeróbicas gram positivas e gram negativas, bactérias anaeróbicas, micoplasmas, *Chlamydia trachomatis*, *Candida sp.* e *Trichomonas sp.* influenciando negativamente na qualidade do sêmen. Estes microrganismos são isolados predominantemente na uretra, mas também são agentes etiológicos de prostatites, vesiculites, prostato-vesiculites, orquites, epididimite e orqui-epididimite, infecções que afetam a fertilidade masculina em muitos casos. De um modo geral, comparações entre homens infectados e não infectados mostraram que a vitalidade e a motilidade são os parâmetros seminais mais afetados (62,73). Em alguns pacientes, a morfologia espermática, a integridade da membrana espermática e a contagem de espermatozoides também podem ser prejudicadas (34,73,91). Quando estes processos infecciosos atingem à próstata e as vesículas seminais, prejudicam a produção de fluidos glandulares, o que também causa um impacto negativo sobre os espermatozoides (24). Ressalta-se, que estes efeitos dependem do tipo de microrganismo presente, do sítio da infecção, da resposta inflamatória ao processo e da concentração bacteriana (valores $\geq 10^4$ unidades formadoras de colônias (ufc)/ml determinam a provável patogenicidade destes microrganismos).

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Como apresentado nesta revisão, vários microrganismos colonizam o sêmen afetando a qualidade dos fluidos semi-

nais e a função espermática. Apesar de não ser viável a investigação de todos os microrganismos aqui citados, na rotina laboratorial, pela complexidade de algumas metodologias empregadas e de seus altos custos, os quais são inacessíveis para muitos laboratórios, ainda assim é possível estabelecer alguns critérios práticos para investigar bactérias e outros microrganismos no sêmen, como segue:

Através de uma triagem bacterioscópica

Faz-se esta triagem em esfregaços seminais corados pelo Gram, que detecta as seguintes estruturas bacterianas:

- **Cocos gram positivos** – são indicativos de bactérias aeróbicas (*Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.*) e anaeróbicas (*Peptococcus sp.* e *Peptostreptococcus sp.*).
- **Bacilos gram positivos** – são bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas (*Corynebacterium sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Bacillus sp.*).
- **Bactérias gram negativas** – inclui bactérias aeróbicas (enterobacteriáceas) e anaeróbicas (*Bacteroides sp.* e *Fusobacterium sp.*).
- **Bacilos gram negativos pleomórficos** – são indicativos de *Gardnerella vaginalis*. Às vezes encontram-se aderidos às células do epitélio uretral.
- **Bacilos curvos gram negativos** – São raros e indicativos de *Mobiluncus sp.*. Algumas vezes *Bacteroides sp.* também apresentam esta característica.
- **Cocos gram negativos** – sugestivos de *Veillonella sp.*.
- **Diplococos gram negativos** – sugestivos de *Neisseria sp.* inclusive *Neisseria gonorrhoeae*.
- **Formas de leveduras** – encontrados com frequência na forma de hifas, esporos e conídios, com morfologia bastante variável. São sugestivos de *Candida sp.* e *Rhodotorula sp.*.
- **Trichomonas sp.** – raramente são encontrados.

A frequência destes microrganismos é bastante variável. Na maioria das amostras se detectam raros cocos gram positivos, mas, outras estruturas morfológicas também são encontradas em maior ou menor frequência. Por outro lado, algumas amostras apresentam uma frequência bacteriana elevada e, vários tipos morfológicos acima descritos são facilmente caracterizados pelo exame bacterioscópico. Estas informações são clinicamente relevantes, pois ajudam a caracterizar a bacteriospermia e a influência destes microrganismos na fertilidade masculina em muitos casos. Por isto, devem ser pesquisados e reportados no exame.

Através do isolamento de microrganismos no sêmen

A rotina ideal para o exame microbiológico do sêmen deve abranger a investigação de todos os principais agentes etiológicos citados neste trabalho, adequada à disponibilidade técnica de cada laboratório. A investigação de bactérias aeróbicas gram positivas e gram negativas, *Candida albicans* e micoplasmas é essencial, pois estes microrganismos são os mais comuns na rotina do exame. Outro procedimento importante é a cultura de bactérias anaeróbicas, pois estes microrganismos são tão comuns quanto às bactérias aeróbicas e micoplasmas.

Em muitos exames, isola-se uma flora polimicrobiana constituída de 2 ou mais microrganismos (na rotina deste autor, até 7 tipos diferentes de bactérias foram identificadas em uma única amostra), os quais afetam significativamente a qualidade do sêmen. Estas bactérias são sexualmente transmissíveis, através do coito e causam vaginites e cervicites, também de etiologia polimicrobiana. Apesar de complexa, a cultura de bactérias anaeróbicas pode ser efetuada de rotina em qualquer laboratório, em um sistema de

triagem com meios de cultura específicos (agar sangue, agar chocolate, CDC, etc). Neste sistema de triagem, faz-se o isolamento da colônia, que é posteriormente corada pelo gram para identificar o tipo morfológico presente. Cada bactéria anaeróbica, gram negativa ou gram positiva, tem suas características morfológicas bem definidas, que podem ser facilmente identificadas pelo gram, as quais, na maioria das vezes, identificam o tipo de bactéria presente, de forma presuntiva, ao nível do gênero, por exemplo, *Bacteroides sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, etc. Praticamente, todas as bactérias anaeróbicas podem ser caracterizadas no exame do sêmen através deste sistema de triagem, que pode ser usado em qualquer laboratório. Para identificação bacteriana, testes bioquímicos (Sistema API 20A[®]) também são disponíveis.

Em relação a outros microrganismos tais como a *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*, a investigação deve ser efetuada nos casos mais específicos, nos quais se suspeita da sua presença, pois não são muito frequentes na rotina do exame. *Trichomonas sp.* e *Mobiluncus sp.* são muito raros, mas também podem ser pesquisados de rotina. Micoplasmas também tem procedimentos específicos para identificação como descrito em um tópico específico deste trabalho.

CONCLUSÃO

Infertilidade conjugal é um problema que afeta um número cada vez maior de casais em todo o mundo, o que é motivo de preocupação, na mesma proporção, para especialistas em reprodução humana. Devido à complexidade do problema, que envolve numerosos fatores etiológicos no homem, na mulher e na relação do casal, hoje se buscam cada vez mais alternativas de investigação, de modo a se obter melhores resultados, pois a infertilidade conjugal envolve aspectos pessoais, psicológicos e sociais, que podem afetar a vida de um casal. Como laboratoristas, nossa participação é importante, pois muitos exames fazem parte da rotina de investigação de casais inférteis, tais como dosagens hormonais, o espermograma e o exame microbiológico do sêmen. O espermograma tem um papel decisivo nesta investigação, pois é um exame que pode dar numerosas informações sobre a atividade funcional dos órgãos genitais masculinos e seus distúrbios.

Previamente, este autor reportou neste periódico, a importância da análise de características espermáticas, dos fluidos glandulares, da função espermática (testes funcionais) e da interação espermatozóide-muco cervical (2,3,5,7). Não menos importante é o exame microbiológico do sêmen, aqui abordado, devido à elevada incidência de diferentes microrganismos, no trato reprodutor masculino. Há muitas evidências que estes microrganismos afetam a capacidade reprodutiva do homem e, portanto, devem ser investigados, embora este procedimento não faça ainda parte da rotina básica de investigação do casal infértil. No entanto, um exame microbiológico mais abrangente, como abordado neste trabalho, pode ser efetuada de rotina, pois há muitos profissionais capacitados para executá-lo em nossos laboratórios. Eles podem estabelecer procedimentos padrões viáveis para sua rotina, divulgá-los dentro de sua comunidade e ajudar muitos casais que enfrentam o drama da infertilidade e a pacientes mais velhos, em relação a prostatites, segundo a experiência deste autor, pois a colonização do sêmen por determinados microrganismos é comprovadamente nociva à fertilidade e à saúde masculina.

REFERÊNCIAS

- Andrade-Rocha FT. Isolamento de micoplasmas em uretrite não gonocócica em relação à pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e à contagem de leucócitos polimorfonucleares. *J Bras Urol* 19:80-82,1993.
- Andrade-Rocha, FT, Carvalho PPNG. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. I- Análise das características espermáticas dos espermatozoides e de suas células precursoras. *Rev Bras Anál Clín* 28:171-178,1996.
- Andrade-Rocha, FT, Carvalho, PPNG. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. II- Avaliação da atividade secretora das glândulas acessórias genitais. *Rev Bras Anál Clín* 29:75-80,1997.
- Andrade-Rocha FT. O sêmen como veículo de transmissão sexual dos microrganismos associado à vaginose bacteriana: Relato de caso. *J Bras Ginec* 107:211-216,1997.
- Andrade-Rocha, FT. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. III- Testes para função espermática. *Rev Bras Anál Clín* 30:13-21,1998.
- Andrade-Rocha, FT. Sperm parameters in men with suspected infertility. Sperm characteristics, strict criteria sperm morphology analysis and hypotonic swelling test. *J Reprod Med* 46:577-582,2001.
- Andrade-Rocha, FT. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. IV- Avaliação da interação espermatozoide-muco cervical. *Rev Bras Anál Clín* 34:31-37,2002.
- Andrade-Rocha, FT. Semen analysis in laboratory practice. An overview of routine tests. *J Clin Lab Anal* 17:247-258,2003.
- 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 with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 71:377-381,2003.
- Andrade-Rocha FT. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. *Clin Chem Lab Med* 43:1203-1210, 2005.
- Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarreal V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E. Non-sperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 45:131-136,2000.
- Aujard Y, Maury L, Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Baud O, Farnoux C, Bingen E. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in newborns: personal data and review of the literature. *Arch Pediatr* 12(Suppl.1):S12-18,2005.
- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril* 82:621-627,2004.
- Boucher P, Lejeune H, Pinatel MC, Gille Y. Spermoculture: improvement of the bacteriological quality of samples by direct verbal counseling before semen collection. *Fertil Steril* 64:657-660,1995.
- Brook I, Frazier EH, Thomas RL. Aerobic and anaerobic microbiologic factors and recovery of beta-lactamase producing bacteria from obstetric and gynecologic infection. *Surg Gynecol Obstet* 172:138-144,1991.
- Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans*: a case report. *Reprod Biomed Online* 8:569-573,2004.
- Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev* 5:213-237,1992.
- Celinska A, Fracki S, Sangidorj D, Barcz E. Role of inflammatory cytokines in male infertility. *Ginekol Pol* 77:404-411,2006.
- Cevenini R, Donati M, Sambri V. *Chlamydia trachomatis* - the agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16:761-773,2002.
- Close CE, Roberts PL, Berger, RE. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol* 144, 900-903,1990.
- Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 5:393-398, 1999.
- Cottell E, Harrison RF, McCaffrey M, Walsh T, Mallon E, Barry-Kinsella C. Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertil Steril* 74:465-470,2000.
- Diaz-Garcia FJ, Herrera-Mendoza AP, Giono-Cerezo S, Guerra-Infante FM. *Mycoplasma hominis* attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. *Hum Reprod* 21:1591-1598,2006.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol* 10:39-44,2000.
- Dienes L, Edsall G. Observations on the L-Organism of Klieneberger. *Proc Soc Exp Biol Med* 36:740-744,1937.
- Dion WM. The origin and species of yeasts in commercial preparations of bovine semen. *Can J Comp Med* 43:16-21,1979.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Strock W, Pohl S, Schwalbach B, Runnebaum B. Anaerobes in ejaculates of subfertile men. *Hum Reprod Update* 1:462-478,1995.
- Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero F. Can *Chlamydia trachomatis* directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis* 5:53-57,2005.
- Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 23:717-723,2002.
- Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 351(Suppl 3):2-4,1998.
- Gonzales GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Díaz-Gutiérrez O, Vigil P, Vásquez F, Kortebeani G, Mazzoli A, Bustos-Obregón E. Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. *Andrologia* 36:1-23,2004.
- Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 3:251-258,2001.
- Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Kumar TC. Semen characteristics of asymptomatic males affected by *Trichomonas vaginalis*. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 7:165-167,1990.
- Gopalkrishnan K, Joseph R, Sheth AR. Alteration of semen characteristics and regulatory factors in human semen with bacterial infection. *Arch Androl* 32:213-218,1994.
- Grattard F, Soleilhac B, De Barbeyrac B, Bebear C, Seffert P, Pozzetto B. Epidemiologic and molecular investigations of genital mycoplasmas from women and neonates at delivery. *Pediatr Infect Dis J* 10:853-858,1995.
- Habermacher GM, Chason JT, Schaeffer AJ. Prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Annu Rev Med* 57:195-206,2006.
- Hall SH, Hamil KG, French FS. Host defense proteins of the male reproductive tract. *J Androl* 23:585-597,2002.
- Harrison PE, Barratt CLR, Robinson AJ, Kessopoulou E, Cooke ID. Detection of white blood cell populations in the ejaculates of fertile men. *J Reprod Immunol* 19:95-98,1991.
- Hillier SL, Rabe LK, Muller CH, Zarutskie P, Kuzan FB, Stenchever MA. Relationship of bacteriologic characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic. *Obstet Gynecol* 75:800-804,1990.
- Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, Weidner M. Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. *Andrologia* 30(Suppl 1):55-59,1998.
- Ishihara S, Yasuda M, Ito S, Maeda S, Deguchi T. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. *Int J Antimicrob Agents* 24(Suppl. 1):23-27,2004.
- Ison CA, Easom CS. Carriage of *Gardnerella vaginalis* and anaerobes in semen. *Genitourin Med* 61:120-122,1985.
- Jarvi K, Lacroix JM, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertil Steril* 66:463-467,1996.
- Judlin P. Genital mycoplasmas. *Gynecol Obstet Fertil* 31:954-959,2003.
- Kaleli S, Ocer F, Irez T, Budak E, Aksu MF. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 89:185-191,2000.
- Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 4:891-903,1998.
- Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H. Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic. *APMIS* 105:566-570,1997.
- Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W, Gilbert GL. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*-support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol* 49:1879-1889,1999.
- Kranjic-Zec I, Dzamic A, Mitrovic S, Arsic-Arsenijevic V, Radonjic I. The role of parasites and fungi in secondary infertility. *Med Pregl* 57:30-32,2004.
- Krause W, Herbstreit F, Slenzka W. Are viral infections the cause of leukocytospermia? *Andrologia* 34:87-90,2002.
- Krieger JN, Riley DE. Chronic prostatitis: Charlottesville to Seattle. *J Urol* 172:2557-2560,2004.
- Krzeminska-Jaskowiak E, Cybulski Z, Pietkiewicz K. Characterization of *Candida* sp. strains isolated from different clinical specimens in the years 1989-1993. *Przegl Epidemiol* 49:305-311,1995.

53. Larsen, B. & Monif, GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis* 32:69-77,2001.
54. Larsson PG, Forsum U. Bacterial vaginosis--a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *APMIS* 113:305-316,2005.
55. Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP. Leucocytosp.ermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses. *Gynecol Obstet Fertil* 33:2-10,2005.
56. Liu DB, Zhu PY. Detection of IgG and IgM antibodies against Chlamydia trachomatis in semen of asymptomatic infertile patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* 9:197-199,2003.
57. Liu JH, Li HY, Cao ZG, Duan YF, Li Y, Ye ZQ. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sp.erm motility parameters in vitro. *Asian J Androl* 4:179-182,2002.
58. Ludwig M, Kummel C, Schroeder-Printzen I, Ringert RH, Weidner W. Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or leukocytosp.ermia. *Andrologia* 30(Suppl 1):41-47,1998.
59. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, Totten PA. Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. *J Infect Dis* 187:650-657,2003.
60. Mayser P. Mycotic infections of the penis. *Andrologia* 31(Suppl 1):13-16,1999.
61. Megory E, Zuckerman H, Shoham Z, Lunenfeld B. Infections and male fertility. *Obstet Gynecol Surv* 42:283-290,1987.
62. Merino G, Carranza-Lira S, Murrieta S, Rodriguez L, Cuevas E, Moran C. Bacterial infection and semen characteristics in infertile men. *Arch Androl* 35:43-47,1995.
63. Montagnini Sp.aine D, Mamizuka EM, Pereira Cedenho A, Srougi M. Microbiologic aerobic studies on normal male urethra. *Urology* 56:207-210,2000.
64. Nikkanen V, Gronroos M, Suominen J, Multamaki S. Silent infection in male accessory genital organs and male infertility. *Andrologia* 11:236-241,1979.
65. Nocard E, Roux E. Le microbe de la péripneumonie. *Ann Inst Pasteur* 12:240-262,1898.
66. Nunez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martinez-Ferrer M, Meseguer MA. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human sp.ermatozoa. *Hum Reprod* 13:2756-2761,1998.
67. Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis and male fertility. *Hum Fertil (Camb)* 7:271-276,2004.
68. 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 leukocytosp.ermia. *J Urol* 163:1775-1778,2000.
69. Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl* 16:1-13,1993.
70. Robertson JA, Stemke GW. Expanded serotyping scheme for Ureaplasma urealyticum strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 15:873-878,1982.
71. Rodin DM, Larone D, Goldstein M. Relationship between semen cultures, leukosp.ermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril* 79(Suppl 3):1555-1558,2003.
72. Ross JD, Jensen JS. Mycoplasma genitalium as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. *Sex Transm Infect* 82:269-271,2006.
73. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol* 67:51-56,2005.
74. Schiefer HG. Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. *Andrologia* 30(suppl.1):7-13,1998.
75. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 22:575-583,2001.
76. Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 6:495-501,2005.
77. Skidmore S, Horner P, Mallinson H. Testing sp.ecimens for Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* 82:272-275,2006.
78. Sobel JD. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis? *Infect Dis Clin North Am* 19:387-406,2005.
79. Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Casp.i E, Samra Z. Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function, sp.erm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 53:331-336,1990.
80. Sp.iliopoulou A, Lakiotis V, Vittoraki A, Zavou D, Mauri D. Chlamydia trachomatis: time for screening? *Clin Microbiol Infect* 11:687-689,2005.
81. Stovall DW, Bailey LE, Talbert LM. The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing in vitro fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 59:197-201,1993.
82. Styler M, Shapiro SS. Mollicutes (mycoplasma) in infertility. *Fertil Steril* 44:1-12,1985.
83. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium attaches to human sp.ermatozoa. *Hum Reprod* 18:2103-2109,2003.
84. Taylor-Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. *Lancet* 351(suppl.3):12-15,1998.
85. Taylor-Robinson D, Horner PJ. The role of Mycoplasma genitalium in non-gonococcal urethritis. *Sex Transm Infect* 77:229-231,2001.
86. Taylor-Robinson D. Mycoplasma genitalium -- an up-date. *Int J STD AIDS*. 13:145-151,2002.
87. Taylor-Robinson D. Ureaplasma urealyticum (T-strain mycoplasmas) and Mycoplasma hominis. In: Principles and practice of infectious diseases, vol. 2. Mandell G, Douglas R, Bennett J (eds). New York, Churchill and Livingstone Inc.;1990, p. 1458-1463.
88. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 60:1069-1075,1993.
89. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1:1288-1291,1981.
90. Vetere A, Borriello SP, Fontaine E, Reed PJ, Taylor-Robinson D. Characterisation of anaerobic curved rods (Mobiluncus sp.p.) isolated from the urogenital tract. *J Med Microbiol* 23:279-288,1987.
91. Veznik Z, Posp.isil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sp.erm. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83:656-660,2004.
92. Vicino M, Loverro G, Simonetti S, Mei L, Selvaggi L. The correlation between idiopathic leukocytosp.ermia, embryo quality and outcome in the FIVET and ICSI procedures. *Minerva Ginecol* 51:413-420,1999.
93. Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sp.erm function. *Andrologia* 34:155-161,2002.
94. Villegas H, Arias F, Flores E, Casanova G, Karchmer S. Ultrastructural characteristics of Gardnerella vaginalis infection in the heterosexual couple. *Arch Androl* 39:147-153,1997.
95. Wagenlehner FM, Weidner W, Naber KG. Chlamydial infections in urology. *World J Urol* 24:4-12,2006.
96. Wang AW, Politch J, Anderson DJ. Leukocytosp.ermia in male infertility patients in China. *Andrologia* 26:167-172,1994.
97. Weidner W, Krause W, Ludwig M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with sp.ecial focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 5:421-432,1999.
98. Willen M, Holst E, Myhre EB, Olsson AM. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. *Scand J Urol Nephrol* 30:387-393,1996.
99. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Viville S, Nisand I. Abnormal bacterial colonisation of the vagina and implantation during assisted reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 32:135-139,2004.
100. Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukocytosp.ermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 53:528-536,1990.
101. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63:1143-1157,1995.
102. Xu C, Lu MG, Feng JS, Guo QS, Wang YF. Germ cell apoptosis induced by ureaplasma urealyticum infection. *Asian J Androl* 3:199-204,2001.
103. Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytosp.ermia clinically relevant? *Fertil Steril* 66:822-825,1996.
104. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of Mycoplasma genitalium from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:1451-1455,2002.
105. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum, and Ureaplasma urealyticum organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J Clin Microbiol* 41:1850-1855,2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rua Irmãos D'Ângelo 48 sala 101
 CEP: 25.685-330 Petrópolis, RJ
 Telefax 0-xx-24-22376173
 e-mail: ftarocho@yahoo.com.br