

Puerta Suárez, Jenniffer¹
Cardona Maya, Walter Darío²

Enterobacterias y su impacto en la calidad seminal: el mito sobre su relación negativa

Enterobacteria and their impact on semen quality: the myth about their negative relationship

Fecha de aceptación: agosto 2024

Resumen

ANTECEDENTES. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* son enterobacterias responsables de infecciones del tracto urinario y se han asociado con alteraciones en la calidad del semen. El objetivo de este trabajo es evaluar la presencia de estas enterobacterias en el tracto reproductivo de hombres fértiles y hombres con fertilidad desconocida y su efecto en la calidad seminal.

MÉTODO. Se incluyó a 76 participantes, éstos se dividieron en dos categorías: hombres fértiles (n = 19) y hombres con fertilidad desconocida (n = 57), a cada participante se le solicitó una muestra de semen y una de orina para el análisis de bacterias y parámetros seminales convencionales y funcionales.

RESULTADOS. En los hombres fértiles se detectó con mayor frecuencia el ADN de *E. coli* en las muestras de semen con respecto a los hombres de fertilidad desconocida (5.3 vs. 4%; p = 0.0421). Los hombres fértiles presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto con respecto a los hombres con fertilidad desconocida (61.1 vs. 49.85%; p = 0.0289). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en otros parámetros de calidad seminal.

CONCLUSIONES. *E. coli* y *K. pneumoniae* se pueden detectar en el tracto reproductivo de hombres fértiles y hombres con fertilidad desconocida, por lo que estas bacterias pueden ser colonizadores frecuentes del tracto genitourinario masculino. Los hombres fértiles tienen mayor porcentaje de espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto, sin embargo, no se observan más alteraciones en los parámetros seminales asociados a la presencia de los microorganismos.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, fertilidad, espermatozoides.

Abstract

BACKGROUND. *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* are enterobacteria responsible for urinary tract infections and have been associated with alterations in semen quality. This work aimed to evaluate the presence of these enterobacteria in the reproductive tract of fertile men and men with unknown fertility and their effect on seminal quality.

METHOD. Seventy-six participants were divided into two categories: fertile men (n = 19) and men with unknown fertility (n = 57). Each participant was asked for a semen sample and a urine sample for bacteria analysis, cytokines, and conventional and functional seminal parameters.

RESULTS. In fertile men, *E. coli* DNA was detected more frequently in semen samples compared to men of unknown fertility (5.3 vs. 4%; p = 0.0421). Fertile men presented a higher percentage of sperm with high mitochondrial membrane potential than men with unknown fertility (61.1% vs. 49.85%; p = 0.0289). No statistically significant differences were observed in other seminal quality parameters.

CONCLUSIONS. *E. coli* and *K. pneumoniae* can be detected in the reproductive tract of fertile men and men with unknown fertility; these bacteria may be frequent colonizers of the male genitourinary tract. Fertile men have a higher percentage of sperm with high mitochondrial membrane potential; however, no further alterations are observed in seminal parameters associated with microorganisms.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, fertility, sperm.

¹ Grupo Reproducción, Departamento de Obstetricia y Ginecología
² Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Correspondencia: Dra. Jenniffer Puerta-Suárez
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Calle 67, núm. 53-108, Aranjuez, Medellín, Colombia.
Dirección electrónica: jennifer.puerta@udea.edu.co

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo después de más de un año de relaciones sexuales regulares sin el uso de métodos anticonceptivos,¹ y se ha descrito que afecta aproximadamente a 48.5 millones de parejas en todo el mundo.² En al menos la mitad de los casos de infertilidad, la causa es de origen femenino, en 20 a 30% de los casos es responsable sólo el factor masculino y en el 20 a 30% restante es una combinación de ambos factores.³ A pesar de los esfuerzos académicos y de investigación en el ámbito de la infertilidad masculina, hasta en 30% de los casos aún se les denomina como infertilidad idiopática;⁴ y cuando se determina la causa, ésta generalmente incluye una amplia variedad de factores como alteraciones hormonales, problemas eyaculatorios, varicocele, problemas obstructivos, problemas asociados al estilo de vida como el consumo de tabaco, de alcohol, la obesidad,^{3,5,6} e incluso infecciones del tracto genitourinario (ITG).⁷

Las ITG representan entre 6 y 10% de los casos de infertilidad masculina,⁷ los datos clínicos evidencian que se puede observar inflamación o infección local en el tracto urinario en hasta 60% de los pacientes que reciben tratamiento mediante técnicas de reproducción asistida, por lo que la evidencia existente sugiere un efecto negativo de los microorganismos sobre los parámetros espermáticos,⁸ descrito principalmente por especies bacterianas como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*,⁷⁻¹⁰ las dos últimas son enterobacterias (*E. faecalis* y *E. coli*) aisladas en los espermocultivos de hombres con y sin alteración en la calidad seminal.^{9,11,12}

Específicamente, con frecuencia *E. coli* se aísla en infecciones del tracto urinario, que se adhiere de forma rápida a los espermatozoides humanos *in vitro*, lo que provoca la aglutinación de los espermatozoides.¹³ Al evaluar el efecto de dos cepas de *K. pneumoniae* en la calidad seminal, se observó que la cepa productora de carbapenemasas redujo gradualmente la movilidad espermática, mientras que la cepa productora de betalactamasas de espectro extendido incrementó los espermatozoides con apoptosis tardía, efectos que podrían estar relacionados con los lipopolisacáridos presentes en esta bacteria.⁹ *K. pneumoniae* también se detectó en 56% de las muestras de semen de hombres asintomáticos para infecciones urogenitales,¹⁴ lo que confiere el carácter de controversial a la relación que pueden tener las enterobacterias y la calidad seminal e incluso la fertilidad. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es detectar la presencia de *K. pneumoniae* y *E. coli* en el tracto reproductivo de hombres fértiles y hombres con fertilidad desconocida, así como evaluar su efecto en la calidad seminal.

Materiales y métodos

Población de estudio

En el estudio se incluyó a 76 participantes, 19 hombres fértiles debido a que tenían hijos menores de 12 meses o

que su pareja estaba embarazada al momento del reclutamiento, mientras que los 57 voluntarios restantes se consideraron como hombres con fertilidad desconocida debido a que no tenían embarazos previos. A los participantes de ambos grupos se les realizó una encuesta que incluyó factores sociodemográficos y de estilo de vida. Cada uno donó una muestra de orina y una muestra de semen mediante masturbación después de una abstinencia sexual de dos a cinco días, en un recipiente estéril.

Determinación de los parámetros seminales convencionales y funcionales

Se evaluaron los parámetros seminales convencionales según lo establecido por el manual para el análisis seminal de la OMS,¹⁵ además se realizó la detección del potencial de membrana mitocondrial espermática ($\Delta\Psi_m$), la determinación de la integridad de la membrana, la detección de la integridad de la cromatina, el análisis de la lipoperoxidación de la membrana espermática y la evaluación de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno en los espermatozoides de acuerdo con los protocolos previamente establecidos.¹⁶

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa para detectar ADN de *E. coli* y *K. pneumoniae*

Inicialmente se centrifugaron las muestras de semen (500 μ L a 200 g) o de orina (10 mL a 22 000 g) durante 10 minutos, a cada muestra se le adicionaron 5 μ L de proteinasa K y 0.5 mL de solución de lisis (Tris 1 M, EDTA 0.5 M, NaCl 5 M, SDS 10% y Tritón 0.1%) durante 12 horas a 54 °C.¹⁷ Posteriormente se adicionó 1 mL de fenol-cloroformo-isoamílico y se centrifugó a 5 000 g por 10 min, al sobrenadante recuperado se le adicionaron 50 μ L de acetato de sodio 3 M, 1 mL de etanol absoluto (-20 °C) y se incubó 12 horas a -20 °C con el fin de precipitar el ADN. Finalmente, el ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se diluyó en 100 μ L agua libre de DNasa/RNasa y se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo-Scientific, Estados Unidos).

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando 12.5 μ L de Master Mix (Thermo-Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), solución que contiene 0.025 U/L de Taq ADN polimerasa, 2 mM de MgCl₂ y 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), además se adicionaron 0.2 μ M de cada cebador, 2 μ L de ADN (200 ng) y 9.3 μ L de agua, en un termociclador T3000 (Whatman, Biometra, Goettingen, Alemania) empleando la siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos (95 °C: 30 s; 55 °C: 30 s; 72 °C: 30 s) y una elongación final de 72 °C durante cinco minutos.

Como control positivo de la reacción se empleó el ADN extraído de cada cepa bacteriana o aislados clínicos obtenidos de los pacientes. Para evaluar la presencia de *E. coli* se emplearon los cebadores F: 5'-CGAGAACTGGCGATCCTTA-3' R: 5'-CTTCATCAAGCGGTTTCACA-3' que permitieron la amplificación de un fragmento de 113pb,¹⁸ mientras que para la detección de *K. pneumoniae* se emplearon los cebadores R: 5'-CATCTCGATCTGCTGCCAA-3', R:5'-GCGCGGATCCAGCGATTGGA-3' que permitieron amplificar un fragmento de 90pb.¹⁹

Análisis estadístico

Analizamos los datos utilizando la herramienta GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos), se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. Se realizaron comparaciones cuantitativas y cualitativas entre algunas variables observadas en el grupo de hombres fértiles y hombres con fertilidad desconocida empleando las pruebas de Mann Whitney y chi cuadrado. Los datos de las pruebas funcionales espermáticas evaluadas mediante citometría de flujo se analizaron utilizando el programa FlowJo 7.6 (Tree Star, Inc. Oregón, Estados Unidos).

Resultados

La edad media y desviación estándar para los hombres fértiles fue de 35 ± 9.49 años y para los hombres con fertilidad desconocida fue de 34 años ± 10.17 ($p = 0.4988$).

Con excepción del estado civil en donde se observó que los hombres fértiles en su mayoría eran casados en comparación con los hombres con fertilidad desconocida que en su mayoría eran solteros ($p = < 0.0001$), ambos grupos presentaban las variables sociodemográficas y de comportamiento sexual similares (cuadro 1).

Los hombres fértiles presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto respecto de los hombres con fertilidad desconocida (61.1 vs. 49.85% ; $p = 0.0289$), sin embargo, no se observó ninguna otra diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los parámetros espermáticos convencionales y funcionales (cuadro 2). Al realizar la detección del ADN de las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae*, se observó que los hombres fértiles tienen mayor frecuencia el ADN de *E. coli* en las muestras de semen con respecto a los hombres de fertilidad desconocida (5.3 vs. 4.0% , $p = 0.0421$) (figura 1).

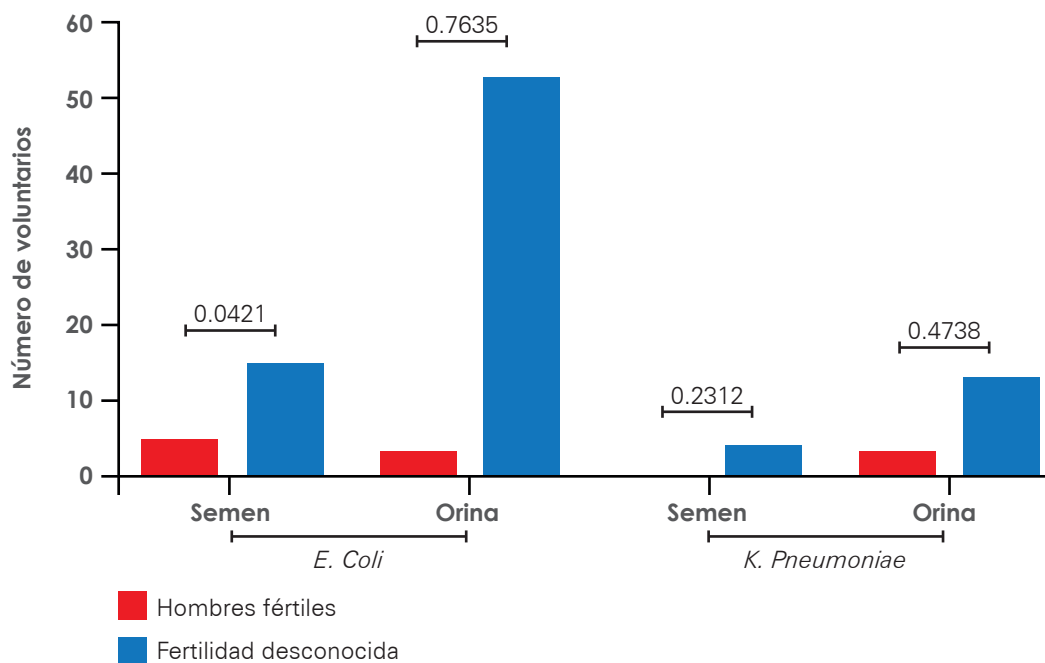
Cuadro 1.
Características sociodemográficas y sexuales

| Características | Hombres fértiles n = 19 | Fertilidad desconocida n = 57 | Valor de p |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------|
| Nivel de educación | | | 0.1432 |
| Básica secundaria | 5 | 4 | |
| Técnico/tecnólogo | 0 | 11 | |
| Universitario | 26 | 39 | |
| Posgrado | 68 | 37 | |
| Estado civil | | | <0.0001 |
| Soltero | 5 | 60 | 1 |
| Casado/unión libre | 95 | 33 | |
| Separado/divorciado | 0 | 7 | |
| Vasectomía | 5 | 14 | 0.3054 |
| ITS previas | 5 | 21 | 0.1134 |
| Uso de condón | | | 0.1291 |
| Nunca | 21 | 16 | |
| Rara vez | 58 | 37 | |
| Frecuentemente | 21 | 28 | |
| Siempre | 0 | 19 | |
| Parejas sexuales | | | 0.7209 |
| Una a tres | 32 | 25 | |
| Más de tres | 68 | 74 | |
| Ninguna | 0 | 1 | |
| Masturbación | 68 | 74 | 0.6568 |
| Tipo de relaciones sexuales | | | |
| Oral | 58 | 68 | 0.0578 |
| Anal | 21 | 46 | 0.4023 |
| Vaginal | 100 | 88 | 0.1089 |

Cuadro 2.
Parámetros seminales convencionales y funcionales evaluados en las muestras de semen

| Parámetro | Hombres fértiles n = 19 | | Fertilidad desconocida n = 57 | | Valor de p |
|--|----------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|------------|
| | Mediana | Rango | Mediana | Rango | |
| Concentración 10 ⁶ /mL | 89 | 7-270 | 77 | 0-520 | 0.5982 |
| pH | 8 | 7-8 | 8 | 7-9 | 0.3045 |
| Morfología, porcentaje | 4.85 | 2.5-8.56 | 5.6 | 2-13 | 0.5207 |
| Volumen, mL | 2.48 | 0.8-5.8 | 2.8 | 0.3-11.8 | 0.8746 |
| Movilidad progresiva, porcentaje | 52 | 6-81 | 49.5 | 40-60 | 0.4837 |
| Movilidad no progresiva, porcentaje | 6.5 | 0-20 | 6.5 | 1-50 | 0.9675 |
| Viabilidad, porcentaje | 79 | 49-91 | 81.5 | 36-92 | 0.6973 |
| Índice de teratozoospermia | 1.24 | 1.1-1.52 | 1.26 | 0.96-1.52 | 0.2079 |
| Morfología anormal, porcentaje | 95.15 | 91.35-97.5 | 94.4 | 87-98 | 0.5207 |
| Determinación de especies reactivas de oxígeno, porcentaje | 63.40 | 17.70-86.20 | 57.00 | 21.70-85.00 | 0.3259 |
| Índice de fragmentación del ADN | 11.00 | 10.40-14.90 | 11.02 | 10.10-13.68 | 0.4299 |
| Capacidad antioxidante, porcentaje | 61 | 9.5-81.38 | 59.7 | 15.23-82.3 | 0.7936 |
| Lipoperoxidación de la membrana, porcentaje | 49.80 | 3.92-96.3 | 49.75 | 2.13-98.5 | 0.9147 |
| Potencial de membrana mitocondrial, porcentaje | 61.10 | 12.3-73.5 | 49.85 | 12.9-75.5 | 0.0289 |
| Integridad de la membrana plasmática, porcentaje | 63.9 | 12.1-84.4 | 59.5 | 8.55-81.7 | 0.5415 |

Figura 1.
Detección de ADN de enterobacterias en semen y orina



Discusión

Este estudio evaluó el efecto de la presencia de las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* en el semen y en la orina sobre la fertilidad masculina a través de la evaluación de la calidad seminal. En la literatura se ha demostrado cómo las ITG masculinas pueden afectar la fertilidad debido al daño testicular y a la función biológica alterada de los gametos maduros, así como a los efectos perjudiciales directos de las bacterias en el ADN espermático, la integridad de la membrana celular, el acrosoma y las mitocondrias. Lo anterior puede resultar en una disminución en la calidad y la capacidad de fertilización de los espermatozoides, contribuyendo así a la infertilidad masculina.²⁰

La infertilidad se define como la imposibilidad de conseguir un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin protección,¹ está influenciado por diversos aspectos entre los que se incluyen los factores genéticos, hormonales, problemas eyaculatorios y causas infecciosas, estas últimas son las más comunes.^{6,21} Entre las infecciones comunes que causan infertilidad se incluyen *E. coli* y *E. faecalis*, así como algunos virus como el virus de la hepatitis B y el virus del papiloma humano.²⁰

Los resultados de un metaanálisis de 55 estudios comparativos sobre el microbioma del semen en hombres fértiles e infértiles fueron contradictorios.²² A pesar de las discrepancias en los estudios sobre la composición microbiana del tracto urogenital masculino, la presencia de algunas bacterias como *K. pneumoniae* y *E. coli* parece no afectar la fertilidad masculina. Sin embargo, ciertas bacterias podrían estar relacionadas con aspectos específicos de la calidad del semen, indicando una posible conexión compleja entre bacterias y fertilidad masculina.²²

Algunas cepas bacterianas como *E. coli*, *Ureaplasma urealyticum* y *S. aureus* pueden influir directamente en la calidad del semen, debido a que estas infecciones pueden inducir estrés oxidativo y liberación de citoquinas proinflamatorias, afectando negativamente la función antioxidante del semen.²³ Además, se ha observado que la mala calidad de los espermatozoides en muestras de semen incubadas con bacterias podría influir en los resultados de las técnicas de reproducción asistida debido a que las infecciones bacterianas en el tracto genital masculino afectan la fisiología espermática, esto aumenta el estrés oxidativo y daña el ADN espermático,²⁰ resultados que coinciden con los publicados por Ghasemian y colaboradores,⁶ quienes observaron que bacterias como *E. coli* y *Staphylococcus saprophyticus* afectan negativamente la calidad de los espermatozoides y los resultados de la reproducción asistida.⁶

In vitro se ha observado que la presencia de bacterias en el semen, incluyendo *E. coli*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Bacteroides ureolyticus* tiene un efecto negativo en la integridad de la membrana espermática y reduce la capacidad de los espermatozoides para penetrar y fertilizar los oocitos.²⁴ Algunas especies bacterianas pueden afectar a los espermatozoides induciendo daño en el ADN, alteración de la integridad de la membrana celular, cambios en el acrosoma y afectación de las mitocondrias; estos efectos se deben a la producción de toxinas y metabolitos, la inducción de inflamación y estrés oxidativo, y la estimulación de respuestas autoinmunitarias.²⁰ Adicionalmente, se encontró que la presencia de bacterias en el semen, en especial las que tienen capacidad hemolítica, como ciertas cepas de *E. coli*, se ha asociado con efectos perjudiciales en la fertilidad masculina, afectando la viabilidad y la movilidad de los espermatozoides e induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno en las células espermáticas.²⁵

En contraste, Smolinska y O'Mahony,²⁶ al estudiar la relación entre el microbioma y la salud reproductiva en hombres, reportaron que la bacteriospermia no tiene un efecto significativo en los parámetros del semen, resultado acorde con nuestros hallazgos, donde se observa que incluso en el semen de los hombres fértiles se puede detectar el ADN de enterobacterias sin afectar la calidad seminal ni el éxito reproductivo, sin embargo, este tema sigue siendo objeto de discusión^{22,26} y serán necesarios nuevos estudios que permitan evidenciar no sólo el papel negativo de los microorganismos en el semen y la orina, sino que también deberá estudiarse el factor protector de la presencia de especies de *Lactobacillus* spp. en el tracto reproductivo masculino sobre la aparición de enfermedades como la prostatitis.²⁷ En conclusión, tanto el semen como la orina de los hombres fértiles y de hombres con fertilidad desconocida albergan enterobacterias, sin alterar los parámetros espermáticos convencionales y funcionales. La presencia de enterobacterias en el tracto urinario y reproductivo masculino carece de relevancia clínica en ausencia de síntomas, aunque los hombres fértiles presentan mayor porcentaje de espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto, en el semen se detecta con mayor frecuencia el ADN de *E. coli*, lo que sugiere que la presencia de estos microorganismos no tendría un efecto negativo en la calidad seminal.

Agradecimientos: expresamos un agradecimiento especial a los voluntarios que participaron en el estudio.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

Financiamiento: Ninguno.

Referencias

1. World Health Organization (WHO), "Infertility". Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility2023>.
2. Obeagu, E.I., Njar, V.E. y Obeagu, G.U., "Infertility: prevalence and consequences", *Int J Curr Res Chem Pharm Sci*, 2023, 10 (7): 43-50.
3. Altamimi, S.I., Snobar, R.O., Al-Fraihat, A.A., Albuarki, H. y Rizk, D., "Causes of infertility", *Bahrain Medical Bulletin*, 2019, 41 (2): 93-96.
4. Gunes, S., Arslan, M.A., Hekim, G.N.T. y Asci, R., "The role of epigenetics in idiopathic male infertility", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2016, 33: 553-569.
5. Fainberg, J. y Kashanian, J.A., "Recent advances in understanding and managing male infertility", *F1000Research*, 2019, 8.

6. Ghasemian, F., Esmailnezhad, S. y Mehdipour Moghaddam, M.J., "Staphylococcus saprophyticus and Escherichia coli: tracking from sperm fertility potential to assisted reproductive outcomes", *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 2021, 48 (2): 142-149.
7. Folliero, V., Santonastaso, M., Dell'Annunziata, F., De Francis, P., Boccia, G., Colacurci, N. et al., "Impact of Escherichia coli outer membrane vesicles on sperm function", *Pathogens* (Basilea), 2022, 11 (7).
8. Puerta-Suárez, J., Giraldo, M., Cadavid, Á.P. y Cardona-Maya, W., "Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad", *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 2014, 79 (3): 209-217.
9. Zuleta-González, M.C., Zapata-Salazar, M.E., Guerrero-Hurtado, L.S., Puerta-Suárez, J. y Cardona-Maya, W.D., "Klebsiella pneumoniae and Streptococcus agalactiae: passengers in the sperm travel", *Archivos Españoles de Urología*, 2019, 72 (9): 939-947.
10. Berktaş, M., Aydın, S., Yilmaz, Y., Cecen, K. y Bozkurt, H., "Sperm motility changes after incubation with various uropathogenic microorganisms: an in vitro experimental study", *International Urology and Nephrology*, 2008, 40: 383-389.
11. Puerta Suárez, J., Villegas Castaño, A., Serna Quintana, G.J., Martínez, A., Romero Palacio, J., Giraldo, M. et al., "Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales", *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 2015, 80 (1): 33-40.
12. Vilvanathan, S., Kandasamy, B., Jayachandran, A.L., Sathiyarayanan, S., Tanjore Singaravelu, V., Krishnamurthy, V. et al., "Bacteriospermia and its impact on basic semen parameters among infertile men", *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2016.
13. Marchiani, S., Baccani, I., Tamburrino, L., Mattiuz, G., Nicolò, S., Bonaiuto, C. et al., "Effects of common gram-negative pathogens causing male genitourinary-tract infections on human sperm functions", *Scientific Reports*, 2021, 11 (1): 19177.
14. Rivera, V.V., Cardona Maya, W.D. y Puerta-Suárez, J., "The relationship between sexually transmitted microorganisms and seminal quality in asymptomatic men", *Asian Journal of Urology*, 2022, 9 (4), 473-479.
15. Wyres, K.L., Lam, M.M.C. y Holt, K.E., "Population genomics of Klebsiella pneumoniae", *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18 (6): 344-359.
16. Hwang, J.H., Hwang, J.H., Lee, S.Y. y Lee, J., "Prostatic abscess caused by Klebsiella pneumoniae: a 6-year single-center study", *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11 (9).
17. Sesma, B., Martínez, R., Hernández, H., Mendoza-Nazar, P., Llaven, M., Ibarra, C. et al., "Extracción y cuantificación de ADN de pajillas de semen bovino criopreservado" *Revista Científica Udo Agrícola*, 2010, 10.
18. Rashid Mahmood, A. y Mansour Hussein, N., "Study of antibiotic resistant genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from burns and wounds", *Archives of Razi Institute*, 2022, 77 (1): 403-411.
19. Anbazhagan, D., Mui, W.S., Mansor, M., Yan, G.O., Yusof, M.Y. y Sekaran, S.D., "Development of conventional and real-time multiplex PCR assays for the detection of nosocomial pathogens", *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, 42 (2): 448-458.
20. Oghbaei, H., Rastgar Rezaei, Y., Nikanfar, S., Zarezadeh, R., Sadegi, M., Latifi, Z. et al., "Effects of bacteria on male fertility: spermatogenesis and sperm function", *Life Sci*, 2020, 256: 117891.
21. Brugo-Olmedo, S., Chillik, C. y Kopelman, S., "Definición y causas de la infertilidad", *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 2003, 54: 227-248.
22. Farahani, L., Tharakan, T., Yap, T., Ramsay, J.W., Jayasena, C.N. y Minhas, S., "The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: a systematic review and meta-analysis", *Andrology*, 2021, 9 (1): 115-144.
23. Sanocka-Maciejewska, D., Ciupińska, M. y Kurpisz, M., "Bacterial infection and semen quality", *Journal of Reproductive Immunology*, 2005, 67 (1): 51-56.
24. Fraczek, M., Wiland, E., Piasecka, M., Boksa, M., Gaczarzawicz, D., Szumala-Kakol, A. et al., "Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection", *Fertil Steril*, 2014, 102 (3): 711-719 e1.
25. Boguen, R., Treulen, F., Uribe, P. y Villegas, J.V., "Ability of Escherichia coli to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm", *Fertil Steril*, 2015, 103 (5): 1155-1161.
26. Smolinska, S. y O'Mahony, L., "Microbiome: host immune system interactions", *Semin Liver Dis*, 2016, 36 (04): 317-326.
27. Liu, L., Yang, J. y Lu, F., "Urethral dysbacteriosis as an underlying primary cause of chronic prostatitis: potential implications for probiotic therapy", *Medical Hypotheses*, 2009, 73 (5): 741-743.