

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS
AISLADAS DE MUESTRAS SEMINALES EN
PACIENTES CON PROBLEMAS DE
FERTILIDAD UTILIZANDO EL SISTEMA
AUTOMATIZADO VITEK ® 2 DURANTE EL
2016**

Tesis para optar el Título Profesional de

Licenciado en Biología

Mario Alonso Aguayo Cerna

Lima, Perú, 2017

DEDICATORIA

A mis padres, Mario y Patty por siempre brindarme su apoyo y consejos para hacer de mí una mejor persona; a mi mamita María Amparo, quien a lo largo de mi niñez me inculcó el significado de la familia y el amor; a mi hermana María Susan ejemplo de perseverancia, a mi familia y a Dios quien cuida de mí en cada paso que doy. Todos ellos depositaron en mí su entera confianza, estimulando mis capacidades intelectuales en cada reto que se me presentaba. También dedico esta investigación a Lina Burga, amiga desde el inicio de mi carrera universitaria y ahora mi fiel compañera de cada jornada; a quien le agradezco por su apoyo incondicional y sincero en los momentos más difíciles. A todos ellos dedico esta tesis, porque forman parte de mi vida y sin su apoyo no hubiese sido posible hacerla realidad.

Mario Alonso Aguayo Cerna

AGRADECIMIENTO

A mis profesores y a su vez amigos, de quienes adquirí gran parte de la información que ahora son la base de mis conocimientos, gracias a su labor como docentes promueven a jóvenes científicos; un agradecimiento a los miembros de la Facultad de Biología de esta prestigiosa universidad, los cuales tendieron sus manos a jóvenes como yo, con el objetivo de brindarnos una excelente educación y un futuro competitivo. Finalmente agradezco a mi asesor M. Sc. Blgo. Mauricio Gonzáles Molfino y al profesor Juan Carlos Ramos Gorbeña. A todos mis compañeros que de una manera u otra influyeron en mí ya sea como motivación o solo como un apoyo para culminar esta tesis. Este trabajo, se ha realizado gracias al financiamiento del Laboratorio Biogénesis S.A.C y el apoyo de las personas quienes lo conforman, a las facilidades brindadas por el equipo de gestión de calidad de Frutarom Perú S.A. sin su apoyo no hubiese sido posible realizar esta investigación.

Mario Alonso Aguayo Cerna

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Calidad y análisis seminal	12
2.2. Infecciones bacterianas del tracto genitourinario en el hombre	13
2.2.1. Infecciones de transmisión sexual	14
2.2.2. Infecciones en el semen por bacterias	15
2.2.3. Infecciones en el semen por hongos	17
2.2.4. Infecciones en el semen por parásitos	18
2.2.5. Infecciones en el semen por virus	18
2.3. Leucozoospermia	20
2.3.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	21
2.4. Procesos infecciosos en el trato urinario	22
2.5. Análisis microbiológico del semen	24
2.5.1. Espermocultivo	24
2.5.2. Sistema Automatizado VITEK	25
2.5.3. Antibiograma	26
III. ANTECEDENTES	28
IV. HIPÒTESIS	32
V. MATERIALES Y MÈTODOS	33
5.1. Lugar de ejecución	33
5.2. Tipo y diseño de investigación	33
5.3. Variables	33
5.4. Operacionalización de las variables	34

5.5.	Procedimientos y Análisis de datos	35
5.5.1.	Procedimientos	35
5.5.2.	Análisis estadístico	37
5.6.	Aspecto ético	37
VI.	RESULTADOS	38
6.1.	Identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	38
6.2.	Pruebas de sensibilidad bacteriana para los microorganismos aislados	38
6.3.	Relación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas de muestras seminales con problemas de fertilidad	39
VII.	DISCUSIÓN	41
VIII.	CONCLUSIONES	43
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
	ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. N°1.** Tinción Gram en muestra seminal y presencia de bacterias Gram negativas. _____ 48
- Fig. N°2.** Medios de cultivos utilizados para crecimiento bacteriano. A) Agar Sangre, B) Agar Chocolate y C) Agar Mac conkey. _____ 48
- Fig. N°3.** Colonias Gram positivas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Enterobacter cloacae* 49
- Fig. N°4.** Colonias Gram negativas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Enterococcus faecalis* _____ 49
- Fig. N°5.** Colonias Gram negativas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Escherichia coli*. ____ 50
- Fig. N°6.** Colonias Gram negativas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Klebsiella pneumoniae*. _____ 50
- Fig. N°7.** Preparación del inóculo, pruebas bioquímicas, sensibilidad bacteriana y lectura de los resultados utilizando Vitek ® 2. _____ 51
- Fig. N°8.** Presencia de un alto número de leucocitos en una muestra seminal, se confirmaría luego que es un caso de Leucozoospermia. 51
- Fig. N°9.** Número de cultivos positivos vs Frecuencias de bacterias aisladas. _____ 54
- Fig. N°10.** Diferencia de los parámetros seminales de las muestras según el cultivo _____ 54
- Fig. N°11.** Diagnósticos vs Espermiocultivo positivos y negativos _____ 55

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla N° 1.-** Frecuencia de bacterias Gram negativas y Gram positivas identificadas de los cultivos seminales. _____ 52
- Tabla N°2.** Tabla de sensibilidad y resistencia bacteriana de las bacterias aisladas. _____ 52
- Tabla N°3.** Incidencia de oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, oligoastenoteratozoospermia y azoospermia entre muestra seminales positivas a *Enterococcus faecalis* (Grupo A), Enterobacterias potencialmente patógenas (Grupo B), Especies coagulasa negativa (Grupo C) y muestras seminales negativas (Grupo D). _____ 53
- Tabla N°4.** Parámetros seminales en pacientes con cultivos positivos para *Enterococcus faecalis*, enterobacterias potencialmente patógenas, especies coagulasas negativas y cultivos negativos _____ 53

RESUMEN

Las infecciones genitourinarias provocadas por bacterias, son consideradas como posibles factores biológicos causantes del 41.4% de casos de infertilidad masculina. El objetivo de esta investigación fue identificar las bacterias aisladas en muestras seminales de pacientes con problemas de fertilidad utilizando el sistema automatizado VITEK®2 durante el 2016.

Materiales y métodos: La población estuvo conformada por varones entre los 28 a 56 años, a quienes se les realizó un espermocultivo. Las muestras fueron sometidas a coloración Gram, cultivos microbiológicos, pruebas bioquímicas y sensibilidad utilizando el sistema automatizado.

Resultados: De los 100 pacientes estudiados se determinó que el 32% presentaban cultivos positivos, mientras que el 68% correspondían a cultivos negativos. Se identificaron siete especies bacterianas, de las cuales *Enterococcus faecalis* presentó mayor frecuencia con 20 (62,5%), seguido por *Escherichia coli* con 6 (18,8%) casos. Además, se identificó *Klebsiella pneumoniae* 2 (6,3%), *Enterobacter cloacae* 1 (3,1%), *Proteus vulgaris* 1 (3,1%), *Staphylococcus albus* 1 (3,1%) y *Staphylococcus haemolyticus* 1 (3,1%). En los espermogramas con cultivos positivos el diagnóstico seminal más frecuente fue oligoastenoteratozoospermia con 15.6%, seguido por azoospermia con 18.7%. Mientras que astenozoospermia con 8.8% fue el diagnóstico más frecuente en los espermogramas con cultivos negativos.

Conclusión: La presencia de bacterias en las muestras seminales evidencia diferencias significativas en los valores promedio de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen respecto a muestras con espermocultivo negativos.

Palabras clave: bacterias, parámetros seminales, infertilidad

ABSTRACT

Genitourinary infections caused by bacteria are considered as possible biological factors causing 41.4% of cases of male infertility. The objective of this research was to identify the isolated bacteria in seminal samples of patients with fertility problems using the automated VITEK®2 system during 2016. Materials and methods: The population consisted of males between 28 and 56 years old, who were performed sperm cultures. Samples were subjected to Gram staining, microbiological cultures, biochemical tests and sensitivity using the automated system. Results: Of the 100 patients studied it was determined that 32% had positive cultures, while 68% were negative cultures. Seven bacterial species were identified, of which *Enterococcus faecalis* presented the highest frequency with 20 (62.5%), followed by *Escherichia coli* with 6 (18.8%) cases. In addition, *Klebsiella pneumoniae* 2 (6.3%), *Enterobacter cloacae* 1 (3.1%), *Proteus vulgaris* 1 (3.1%), *Staphylococcus albus* 1 (3.1%) and *Staphilococcus haemolyticus* 1 (1%). In spermatograms with positive cultures the most frequent seminal diagnosis was oligoastoteratozoospermia with 15.6%, followed by azoospermia with 18.7%. While asthenozoospermia with 8.8% was the most frequent diagnosis in spermatograms with negative cultures. Conclusion: The presence of bacteria in seminal samples shows significant differences in the mean values of the macroscopic and microscopic parameters of the semen compared to samples with negative sperm cultures.

Keywords: bacteria, seminal parameters, infertility

I. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema creciente y que afecta a un gran porcentaje de parejas en edad reproductiva en el país. Entre los factores etiológicos causantes de la infertilidad encontramos a las infecciones del tracto genitourinario ocasionados por bacterias, las cuales representan según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 25% de casos de infertilidad en el mundo. Es por esto que, diferentes investigaciones se han enfocado en estudiar la infertilidad femenina como causante único, mientras que en la infertilidad masculina aún se mantienen los esfuerzos para encontrar rutas terapéuticas efectivas que la eviten. Así mismo, reportan la presencia anormal de bacterias las cuales, al encontrar condiciones óptimas para sobrevivir, cambian los parámetros seminales y probablemente disminuyan la calidad seminal. Por otro lado, la presencia de leucocitos y de especies de oxígeno reactivas (ROS) estaría relacionadas considerablemente en los mecanismos patológicos involucrados de infertilidad masculina.

Diversas investigaciones han identificado la presencia de especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Klebsiella pneumoniae* en muestras seminales inclusive en varones fértiles y/o con asintomatologías para infecciones urogenitales. Las infecciones del tracto urogenital masculino expresadas mayormente en la inflamación de las glándulas accesorias, es debido a la presencia de microorganismos (Bacteriospermia), que posiblemente guarden relación con la respuesta inmunitaria de los leucocitos, muestras con leucospermia y con el efecto ocasionado por el estrés oxidativo en la calidad seminal.

Dentro de las técnicas de diagnóstico de pacientes con problemas de infertilidad encontramos al espermocultivo y espermatograma, las cuales

sirven como herramientas descriptivas de los parámetros seminales, para reporte de infecciones microbianas y para la elección del mejor tratamiento a seguir. Para la detección de especies bacterianas existen sistemas de reconocimiento automatizado por pruebas bioquímicas, como VITEK ® 2 que reconoce diferentes tipos de organismos tales como: Bacterias Gram positivas y negativas, hongos y levaduras.

Las infecciones genitourinarias son consideradas como posibles factores biológicos causantes de infertilidad masculina, representando del 41.45 al 28.55% del total de las causas de infertilidad masculina. Estas infecciones bacterianas y virales del tracto genital masculino conducen al deterioro de los diferentes estadios del espermatogénesis, afectando la producción y la calidad del semen. Actualmente las investigaciones acerca del papel que juegan las infecciones en las vías seminales y la relación con la infertilidad masculina, son de carácter descriptivo en pacientes varones diagnosticados con infertilidad, donde se analizan especies bacterianas y el número que se reportan. Por tal motivo, al no existir un grupo comparativo de hombres con fertilidad probada y hombres fértiles, no se puede concluir que los gérmenes aislados en hombres se relacionen con infertilidad, como causa única.

Por lo tanto la siguiente investigación tuvo como objetivo identificar las bacterias aisladas en muestras seminales de pacientes con problemas de fertilidad utilizando el sistema automatizado Vitek ® 2, así como realizar pruebas de sensibilidad bacteriana y relacionar las especies identificadas con problemas de fertilidad.

II. MARCO TEÓRICO

Una gran diversidad de ambientes están colonizados por microorganismos y los seres humanos no son una excepción. La interacción que puede existir entre humanos y organismos microscópicos ocasiona ciertas relaciones que no siempre son benéficas para las personas, ocasionando infecciones. Las infecciones agudas y crónicas del tracto genitourinario ocasionadas por factores etiológicos son las principales causantes de la infertilidad masculina. La presencia anormal de bacterias, leucocitos, mediadores inflamatorios como las citoquinas, especies de oxígeno reactivas (ROS), son consideradas relevantes debido a que están involucrados como agentes causantes de la infertilidad masculina. Se ha observado que un 8 a 35% de problemas como obstrucción por infección, daño celular, daño testicular, epididimitis y orquitis son causantes de una infertilidad.

2.1. Calidad y análisis seminal

La calidad que puede presentar una muestra seminal se determina mediante un examen conocido como espermatoograma o seminograma, siendo el método comúnmente aceptado para estudiar al factor masculino, ya que es rápido, sencillo y muy económico. Este análisis evalúa los parámetros macroscópicos y microscópicos del eyaculado, producido por masturbación. Las características a analizar son aspecto, olor, licuefacción, viscosidad, pH, volumen, concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología del espermatozoide, presencia de detritos, leucocitos, células epiteliales extruidas y otros elementos celulares del semen, así como la aglutinación entre espermatozoides y agregación (Remohi *et al.*, 2003). Muchas citas bibliográficas indican que existe un gran heterogeneidad al momento de evaluar las características

seminales de un varón, aun así se trabajen muestras repetidas de un mismo individuo, o se realice por el mismo investigador, por lo tanto, se pueden encontrar alteraciones en una muestra seminal (Barja y Berrios, 2003).

Los parámetros macroscópicos (volumen, pH, aspecto, consistencia, olor y licuefacción) indican principalmente la función y el estado de salud de las glándulas accesorias como la próstata, vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. En cambio, los parámetros microscópicos (concentración, motilidad, vitalidad y morfología) radican en la función testicular, producción de espermatozoides, viabilidad de los conductos excretores y la funcionalidad del epidídimo, órgano encargado de la maduración final y movilidad de los espermatozoides (Tapia, 2003; WHO, 2010).

2.2. Infecciones bacterianas del tracto genitourinario en el hombre

Las infecciones del tracto genitourinario masculino pueden clasificarse en tres tipos: Infecciones de transmisión sexual, infecciones del tracto urinario, debido a que ambos tractos, genital y urinario, comparten varias porciones anatómicas y las infecciones asociadas a desequilibrios en la microbiota bacteriana.

Las infecciones asociadas a desequilibrios en la microbiota bacteriana se deben al gran número de bacterias colonizadoras del tracto reproductivo masculinas, las cuales desencadenan procesos infecciosos con múltiples consecuencias. Este tipo de infecciones se caracterizan en su gran mayoría por ser asintomáticas, mientras que en algunos casos estarían acompañadas de inflamaciones persistentes que pueden finalmente generar alteraciones en la fertilidad o la infertilidad en sí. Estas alteraciones pueden desarrollarse ya sea por daño directo de la célula

espermática o de su nicho, o como vehículo para el ascenso de un gran número de microorganismos en el tracto reproductivo femenino lo que promovería procesos infecciosos e inflamatorios como es el caso de la enfermedad inflamatoria pélvica. (Ministerio de Salud. 2014).

2.2.1. Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) hacen referencia a la transmisión directa de persona a persona por ciertos microorganismos en las relaciones sexuales. La transmisión se puede dar mediante el sexo vaginal, anal y oral. En el año 2015, el Ministerio de Salud del Perú registró 505, 797.00 de casos de personas infectadas con al menos un microorganismo, entre los que destacan las infecciones bacterianas como la gonorrea ocasionada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*; clamidiasis provocada por *Chlamydia trachomatis*; sífilis causada por la bacteria *Treponema pallidum*. (Ministerio de Salud. 2006).

2.2.1.1. Bacterias involucradas en ITS en hombres

- *Chlamydia trachomatis*:

Es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada cuyo único reservorio es el humano. Es catalogada como el principal agente causal de alteraciones fisiológicas como: uretritis, cervicitis mucopurulenta, enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad tubal, epididimitis y enfermedades oculares en los neonatos durante el parto donde se produce el contagio a través de la vagina de la madre. En el 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cataloga como la bacteria causante de ITS más prevalente en el mundo (Lozano, R. *et al.*, 2012).

- *Neisseria gonorrhoeae*

Es un diplococo Gram negativo, móvil no esporulado, oxidasa positiva. Está relacionada a uretritis crónicas, prostatitis y epididimitis en hombres mayores de 25 años. Se conoce que el único reservorio es el humano. La importancia de esta bacteria es que posee una estructura llamada Pili, la cual le permite adherirse a los eritrocitos a través de un proceso llamado hemaglutinación, así como interactuar con células epiteliales, células de la mucosa uretral, leucocitos y espermatozoides, donde se ha encontrado a la bacteria unida a varias porciones de la célula espermática influenciada por una variedad de factores físicos y químicos.

- *Treponema pallidum*:

Es una espiroqueta que mide entre 5 y 20 µm de largo, altamente contagiosa y la cual presenta de hasta 5 flagelos. Es causante de sífilis, la cual presenta un grado de complejidad desde el momento de su identificación y por las diversas manifestaciones clínicas que presenta. Diferentes investigaciones han reportado su presencia en el espacio intracelular de fibroblastos, células intersticiales, células de Leydig en el testículo y de los espermatozoides (Salazar, D. 2016).

2.2.2. Infecciones en el semen por bacterias

Dentro del grupo de bacterias causantes de diversas alteraciones fisiológicas, encontramos aquellas que se caracterizan por provocar inflamaciones a nivel del tracto genitourinario, entre ellas tenemos a bacterias como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Citrobacter sp*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*.

2.2.2.1. Bacterias causantes de inflamaciones genitourinarias

- *Mycoplasma genitalium*

Es una bacteria que ha provocado diversas discusiones al ser considerada como agente de transmisión sexual, por su capacidad de unión al espermatozoide afectando la movilidad espermática. Por otro lado, otros estudios la asocian como una simple bacteria oportunista, sin embargo ambas etiologías provocarían la infertilidad masculina (Rodríguez, B. *et al.*, 2013).

- *Ureaplasma urealitycum*

Al igual que el *M. genitalium*. Esta especie es considerada como un patógeno altamente relacionado en el decrecimiento de los valores inmunosupresores del plasma seminal y del daño directo al espermatozoide. Así mismo, está vinculada a los cambios del pH y prolongación de la licuefacción del semen, lo cual conduce en la disminución de la calidad espermática (Rodríguez, B. *et al.*, 2013).

- *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram negativa no esporulada, móvil debido a sus flagelos peritricos o inmóvil cuando lo carecen, puede ser aerobia o anaerobia facultativos. Ha sido relacionada a inflamaciones del tracto genitourinario como: uretritis, cistitis, prostatitis. Es una de las especies de mayor crecimiento y capacidad de adaptarse a medios ricos en azúcares. La importancia reside en que es una de las especies bacterianas con mayor presencia en infecciones urinarias, debido generalmente a mala higiene del paciente o por la cercanía del intestino grueso como hábitat natural (Ortiz, J. 2016).

- *Staphylococcus sp*

Es una bacteria Gram positiva no esporulada, anaerobia facultativa e inmóvil. La presencia de *Staphylococcus sp* en el cultivo de esperma

podría indicar la existencia de prostatitis, glomerulonefritis o epididimitis. Así mismo se le ha relacionado a inflamaciones de la pared de la vía urinaria provocando sangrado en la orina (hematuria). Debido a esta especie se encuentra presente en diferentes áreas del cuerpo, principalmente en la piel se debe repetir el cultivo para confirmar la presencia de la bacteria y descartar una posible contaminación del cultivo (Galarzo, S. et al., 2015).

- *Klebsiella spp*

Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa. Está asociada a inflamaciones como cistitis, prostatitis, pielonefritis aguda y glomerulonefritis. Esta especie, es una de las pocas especies que al ser mal tratadas tiene un alto índice de crear resistencia a los antibióticos. A los antibióticos.

- *Citrobacter spp.*

El género *Citrobacter* es un bacilo Gram negativo, aerobio perteneciente al grupo de bacterias entéricas. Se le relaciona a infecciones urinarias debido a que puede hallarse en el agua, intestinos y heces. Es por eso que el aseo de atrás hacia adelante o el acto sexual no convencional puede ser causa de infecciones por esta bacteria.

2.2.3. Infecciones en el semen por hongos

La única infección causada por un hongo en el líquido seminal es la candidiasis, la cual es provocada por el género *Candida sp.* El nicho de este hongo abarca desde las cavidades orales, tracto gastrointestinal y en el caso de la mujer, la vagina. La candidiasis provoca la inflamación de las paredes uretrales, caracterizándose principalmente por el descenso de un flujo blanco, inodoro, prurito y eritema (Rodríguez, B., Santana, F. 2008).

2.2.4. Infecciones en el semen por parásitos

La infección con mayor interés presente en las vías genitourinarias es la trichomonosis, causada por el protozooario *Trichomonas vaginalis*. La importancia en la identificación de este germen, es que en la mayoría de casos es asintomática, camuflando incluso en simples inflamaciones a nivel urinario.

- *Trichomonas vaginalis*

Es un protozooario de forma ovoide o piriforme. Mide de 10 – 30 μm de longitud y 5 – 15 μm de ancho; se caracteriza por el movimiento rápido de atrás hacia adelante, debido a sus cuatro flagelos anteriores y la membrana ondulante que posee. Su etiología se basa en la adherencia al epitelio escamoso en la zona de contacto con la célula del hospedador. El reporte de casos positivos en hombres es baja, debido principalmente a que muchos casos son asintomáticos.

2.2.5. Infecciones en el semen por virus

Dentro de las infecciones virales reportadas en el líquido seminal se encuentran: Virus Papiloma Humano (VPH), Citomegalovirus humano (CMVH), Virus de la Hepatitis (VH) y el Virus del Herpes genital (VHS). (Rodríguez, B., Santana, F. 2008).

- Virus Papiloma Humano (VPH)

El VPH presenta ADN como información genética transferible, se han descubierto alrededor de 70 genotipos de los cuales 20 tienen la capacidad de infectar el tracto genital. La infección de este virus puede ser asintomática expresada en la ausencia de anormalidades epiteliales, pasando por la presencia de pequeñas lesiones visibles solo en un análisis médico hasta las verrugas genitales son pleomórficas (Condiloma acuminado). En el caso de hombre, las lesiones aparecen con más

frecuencia en el frenillo, surco balanoprepucial, glande y prepucio, provocando algún tipo de inflamación local y por lo tanto afectando las vías genitales.

- Citomegalovirus humano (CMVH)

El CMVH es virus con ARN, asociado en algunos casos a problemas de fertilidad en los hombres. Se sabe que el CMVH tiene la capacidad de transmitirse por vía sexual, al haberse demostrado su presencia en el líquido seminal de pacientes infértiles. Según la OMS, este virus es la causa más común de transmisión congénita, que puede conducir en enfermedades fetales y neonatales graves. Así mismo, se han publicado estudios que la relacionan con pacientes inmunocomprometidos. En el caso de los hombres, diversas técnicas buscan perfeccionar los trabajos de conservación por congelación de los espermatozoides, con el objetivo de protegerlos del virus.

- Virus de la Hepatitis (HV)

El HV es un virus con ADN, asociado a patologías en el hígado, también ha podido verse presente en el semen y la saliva, por lo que son considerados en muchos casos ITS. Diferentes estudios referidos a la calidad seminal en pacientes con hepatitis B (VHB) y hepatitis C (VHC), evidenciaron que, aunque pudiera no haber relación inversa con la calidad seminal, los valores de apoptosis y necrosis son altamente significativos, incluso con alteraciones en la espermatogénesis, lo cual en resumen indica una importante reducción de los índices de fertilidad en estos pacientes infectados. La presencia de este virus puede ser transmitido parentalmente de madre al hijo, por lo que también debe ser excluida su presencia durante los procesos de reproducción asistida.

- Virus del Herpes (VHS)

El herpes genital es causado por los virus herpes simple tipo 1 (VHS-1) y herpes simple tipo 2 (VHS-2). La transmisión se da a través de

secreciones orales, incluso en el sexo oral, por lo que ambas cepas de virus pueden transmitirse sexualmente. Diferentes investigaciones epidemiológicas han enfatizado el rol de los hombres en la transmisión viral, pero a pesar de esto, muchas veces continúan ausentes de los mensajes preventivos dirigidos a disminuir las infecciones, y los beneficios del diagnóstico y la atención, por eso la importancia de realizar investigaciones para determinar la presencia de virus en semen en los servicios de reproducción asistida.

2.3. Leucozoospermia

La leucozoospermia es la presencia de leucocitos sobre los valores normales en el líquido seminal. Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) se dice que leucospermia es la presencia de más de 1×10^6 de células blancas en un mililitro de semen. Diferentes estudios han buscado asociar la leucospermia con la disminución de los parámetros seminales, evidenciando que pacientes diagnosticados con leucospermia representaban el 10- 20% de los pacientes infértiles. Es por eso, que entender las causas posibles de leucospermia jugaría un papel esencial para determinar el tratamiento a seguir. Dentro de las teorías más aceptadas del porque se desarrolla la leucospermia es a la presencia de procesos inflamatorios o infecciosos que se han podido desarrollar o se encuentran en desarrollo en alguna zona del tracto genitourinario. Sin embargo, no siempre se ha podido demostrar alguna correlación entre la disminución de los parámetros seminales y la leucospermia. Otra teoría recientemente postulada es que la abstinencia sexual influye en la aparición de leucospermia, ya que cuanto más tiempo permanezcan los espermatozoides en el epidídimo, más macrófagos serán atraídos por los espermatozoides envejecidos, ocasionando un aumento de la presencia de leucocitos en el eyaculado. (Somolinos, M. *et al.*, 2007).

2.3.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Durante el desarrollo de una infección, existen mecanismos de comunicación entre los microorganismos y las células hospederas, debido a la formación de un puente entre ambas determinarán el éxito del proceso de colonización o de resistencia de la infección. Los microorganismos ya sean bacterias, virus, hongos o parásitos presentan una serie de moléculas que le permiten sobrevivir en diversas partes anatómicas, donde puedan ser eliminadas por el sistema inmunológico del hospedero.

De igual forma, las células dianas del hospedero expresan ciertas moléculas con una amplia variedad de funciones, dentro de estas están aquellas que sirven para la defensa contra patógenos; desde alertar al sistema inmune cuando se compromete el equilibrio del organismo hasta la eliminación de los microorganismos. Un claro ejemplo de este tipo de moléculas son los receptores de reconocimiento de patógenos (TRL), los cuales están presentes en las células de Sertoli en el testículo y tiene la capacidad de producir mediadores de inflamación, que protegerán al organismo de una infección ascendente, pero durante la etapa de defensa podrían generar especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales limitarían la función de la célula espermática. Se conoce que el mecanismo de acción de estas sustancias, se basa en la generación de un desbalance oxidativo en donde la acumulación de leucocitos estaría asociada con fagocitosis que luego causa la activación de receptores y la activación de citoquinas pro-inflamatorias que desbalancean el sistema antioxidante.

Entonces, la activación desbalanceada de citoquinas pro-inflamatorias puede ser perjudicial para los espermatozoides. Se ha evidenciado la presencia de la interleucina 1 (IL1) en altas concentraciones en el plasma seminal de pacientes infértiles, aunque su presencia no se ha relacionado con afectación de la movilidad espermática ni del proceso de reacción acrosomal (Tortolero, I. *et al.*, 2004).

2.4. Procesos infecciosos en el trato urinario

Una infección urinaria puede incluir micción dolorosa y frecuente, mientras que en el tracto alto los síntomas pueden incluir fiebre y dolor localizado (La vignera, S. *et al.*, 2014). Estos procesos infecciosos tienen repercusiones sobre la esterilidad que algunos hombres pueden sufrir, debido a que la mitad de los casos tienen una afectación bilateral. Demostrando así que las infecciones sistémicas de origen bacteriano o viral pueden causar disminución en la producción del esperma.

Las infecciones del tracto reproductivo son consideradas como la principal causa etiológica de la infertilidad masculina. Entre el 5 y el 12% de pacientes atendidos en las clínicas de infertilidad que cursan con procesos inflamatorios relacionados con infecciones, se ha reportado daño en la calidad espermática con reducción de la movilidad, la concentración y la morfología espermática, e incluso se ha encontrado la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en el 8% de esta población (Andrade-Rocha, F. 2003).

a) Tracto urinario bajo

- Uretritis

Denominada así por la inflamación que ocurre en la uretra masculina, usualmente causada por infecciones de transmisión sexual. *Chlamydia trachomatis* y es catalogada como el principal agente causal de uretritis, *Neisseria gonorrhoeae* también catalogado como principal causa de uretritis en hombres, además de estar implicado en prostatitis y en epididimitis. Finalmente, *Mycoplasma hominis* que infecta con mayor frecuencia el aparato genital y se implica en el desarrollo de vaginosis bacteriana, septicemia posparto, uretritis y aborto (Puerta, J. *et al.*, 2015).

- **Prostatitis**

La inflamación o infección de la próstata provoca prostatitis. Afecta a alrededor del 10% de los hombres de todas las edades, pero con mayor frecuencia a los hombres que tienen entre 40 y 50 años. Uno de los problemas microbiológicos más importantes en la bacteriología de la prostatitis consiste en determinar qué bacterias pueden considerarse patógenos verdaderos. Se sabe que la prostatitis bacteriana es causada por bacterias que ingresan en la uretra o en la vejiga y luego infectan la próstata.

Por lo tanto, los enfoques microbiológicos apropiados incluyen la identificación de un número bajo de bacterias en secreciones prostáticas expresadas o post-orina, que puede ser patognomónica de la prostatitis bacteriana crónica. Una ecografía de la próstata puede mejorar la fiabilidad del diagnóstico, ya que el operador puede dirigir con mayor precisión el mensaje en el lóbulo de la próstata que muestra signos de inflamación en la ecografía. De hecho, el ultrasonido es una excelente herramienta para diferenciar las formas unilaterales de las prostatitis bilaterales (La vignera, S. *et al.*, 2014).

b) Tracto urinario alto

- **Ureteritis**

Inflamación de la uretra, también se le conoce con el nombre alternativo de síndrome uretral. Cuando existe un microorganismo en la orina estos tiene la posibilidad de penetrar y provocar una infección urinaria, siendo una propagación de infección de la vejiga o de los riñones.

2.5. Análisis microbiológico del semen

La identificación microbiológica de bacterias aisladas de procesos infecciosos y de importancia clínica, constituyen una herramienta fundamental para el adecuado manejo de pacientes infectados. Así mismo, la rapidez del diagnóstico y el tratamiento a seguir reducen índices en el sector salud como la morbilidad y mortalidad; por otro lado fomentaría estudios sobre sensibilidad bacteriana y la disminución de infecciones bacterianas (Jorda, L. *et al.*, 2005).

Según datos de la OMS, la prevalencia de bacterias en varones en edad reproductiva, se encuentra entre el 10 al 100% según diferentes publicaciones; este amplio rango reflejaría la variedad de protocolos empleados para la toma de muestra, análisis e identificación microbiológica del semen. Es por eso que, el desarrollo de técnicas que involucren análisis estandarizados y aparatos de alta sensibilidad permitirían obtener resultados de identificación bacteriana en un menor tiempo y de gran confiabilidad (Nuñez, R. *et al.*, 2007).

2.5.1. Espermocultivo

El espermocultivos es una técnica de análisis microbiológico de muestras seminales, las cuales son cultivadas bajo condiciones semejantes al ambiente donde crecen. Es importante considerar, que las probabilidades de contaminación deben reducirse desde el momento de toma de muestra del paciente hasta el cultivo de las mismas en un laboratorio de microbiología. Para el cultivo bacteriano, pueden considerarse: el cultivo del semen puro o diluido en medios de cultivos que contengan los requisitos básicos para el crecimiento. Si la concentración de bacterias excede 1000 unidades formadoras de colonias/mL (UFC), el tipo de las colonias deberá ser analizado; en el caso que el crecimiento bacteriano sea menor a 10000 ufc/mL es cultivo debe ser considerado negativo para una infección. En el caso de ser positivo el crecimiento, si las colonias

tienen un aspecto uniforme se deberá identificar el germen y posteriormente realizar un antibiograma. En el caso de tener colonias con distintos aspectos se sospecha una posible contaminación y se deberá solicitar una nueva muestra al paciente, reforzando las instrucciones para evitar la contaminación.

Las colonias aisladas, serán extendidas en un portaobjetivo y luego coloreada con la técnica de Gram. Esto permitirá observar la presencia de células bacterianas, su morfología y afinidad tinte y conjuntamente con un crecimiento bacteriano (Tapia, S y Rojas, R. 2003).

2.5.2. Sistema Automatizado VITEK

La identificación de bacterias potencialmente patógenas aisladas de procesos infecciosos u provenientes de otras fuentes como son los alimentos y agua; permite obtener resultados que sirvan como instrumentos fundamentales para elegir el mejor tratamiento a seguir. Es por eso que, los empleos de técnicas automatizadas de alta sensibilidad en el área de las ciencias se hacen cada vez más frecuente. Estos métodos requieren un menor tiempo para la obtención de los resultados en comparación con los métodos tradicionales; estos son fáciles de usar, altamente sensibles y en muchos casos económicamente rentables, aunque en la actualidad siguen siendo caros debido a las pocas opciones en el mercado.

Durante las dos últimas décadas, países con alta demanda de tecnología han desarrollado diferentes aparatos automatizados y semi-automatizados que permiten obtener resultados de identificación microbiana en un período relativamente corto (entre 2 y 7 horas) en comparación al tiempo que demoran los métodos tradicionales (entre 15 y 24 horas); reflejando la reducción en la morbilidad y mortalidad de los pacientes por el rápido diagnóstico y elección del tratamiento. A su vez, se han empleado en áreas como la epidemiología, la cual utiliza estos

instrumentos en los laboratorios de microbiología ambiental, con el objetivo de obtener resultados como la identificación de patógenos y antibiogramas con rapidez y precisión.

El sistema *VITEK* es un sistema automatizado para la identificación de bacterias y hongos, así como también para el estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación bacteriana se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con diferentes paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Este sistema se ha empleado para el estudio de cepas clínicamente significativas aisladas de muestras clínicas u de otras ya mencionadas. (Jorda, L *et al.* 2005)

2.5.3. Antibiograma

El conocimiento adecuado de los patrones de sensibilidad de las bacterias más frecuentes que causan infecciones en las vías genitourinarias, es de gran importancia para seleccionar una terapia empírica apropiada y coherente. Sin embargo, uno de los obstáculos más importantes de diversas investigaciones es poder establecer la causalidad de las infecciones en la fertilidad masculina, debido a que la mayoría de antimicrobianos usados en la actualidad parecen ser insuficientes o no se aplican en la concentración adecuada para el tratamiento de infecciones en las vías seminales.

Usando como eje las diversas características fisicoquímicas de los antibióticos, no todos tendrían la capacidad de penetrar en los órganos de la vía seminal. Esto se debería principalmente con la concentración específica o el rango que alcanzan, en muchos casos solo llegan a la próstata o vesículas seminales, ambos órganos reportados con presencia

de principios activos de antibióticos; como ejemplo el uso de trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclinas, metronidazol, fluoroquinolonas, y la doxiciclina. Aun así, los antibióticos que sí logran penetrar los órganos de la vía seminal enfrentan condiciones fisicoquímicas que podrían hacerlos menos activos. Condiciones como el pH en la próstata (casi 6) y en las vesículas seminales es de aproximadamente 7.7; lo cual en ambos casos impediría la separación del agente y la sal, disminuyendo la actividad del antimicrobiano. Esta última, se ha convertido en unas de las hipótesis más fuertes para explicar la mala respuesta a los antibióticos en casos de infección crónica.

Por otro lado, la Infectious Diseases Society of America (IDSA) y la Federal and Drug Administration (FDA) sugieren que el tiempo y la concentración de las dosis usadas en los antimicrobianos para el tratamiento de estas infecciones deben ir acompañadas de estudios de vigilancia en los laboratorios de microbiología clínica, con el fin de obtener información sobre las tasas locales de resistencia y así optimizar la selección de una mejor terapia antimicrobiana. Por lo tanto, la importancia de conocer las tasas de resistencia y los efectos adversos de antimicrobianos, demandan una constante actualización de la sensibilidad antibiótica de las principales bacterias causantes de patologías en las diversas regiones del mundo (Prigau, C. 2013).

III. ANTECEDENTES

Entender el papel de los microorganismos como las bacterias, hongos, virus presentes en fluidos como el semen, contribuyen a mejorar el diagnóstico de casos de infertilidad donde única causa aparente serían los procesos infecciosos. Es por eso que es de suma importancia describir y correlacionar los parámetros seminales con el crecimiento bacteriano de eyaculados en espermocultivos clínicos, es por eso que diversos grupos de investigación en Colombia han buscado la relación de especies bacterianas con las características espermáticas encontradas en espermocultivos. Obteniendo un crecimiento bacteriano del 53,6 %, aislando microorganismos como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus spp* coagulasa negativo, *Klebsiella pneumoniae* todas ellas relacionadas con infecciones genitourinarias y por lo tanto con un alto grado de importancia en estudios de infertilidad (Puerta, J. *et al.*, 2015; Terriquez y Gonzales, 2003). Así mismo, un estudio realizado en el Centro Medico New York Weill Cornell en EE.UU, identificaron bacterias posiblemente responsables de alteraciones en los parámetros seminales, entre ellas encontraron al género *Staphylococcus* presente en un 25.4% de casos, *Streptococcus viridans* con un 15.4% y *Enterococcus faecalis* presente en un 7.4% reportados en EE.UU, sin embargo de estas tres la especie *Enterococcus faecalis* estaría correlacionada directamente en la alteración de parámetros seminales (Rodin, D. *et al.*, 2003; Moretti, E. *et al.*, 2009). De igual forma, estudios relacionados a la presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras seminales, han demostrado que ambas se encuentran presentes en un 25,7% y 1,4% respectivamente en muestras provenientes de pacientes que acuden por consulta de infertilidad en el Instituto Nacional de Endocrinología de La Habana, Cuba, sin embargo al comparar las variables seminales no se encontraron diferencias significativas en pacientes infectados y no infectados , concluyendo que a

pesar de la alta frecuencia de infecciones de las muestras estudiadas, esta no se asociaría a alteraciones en las variables seminales debido a que estas forman parte normal de la flora bacteriana del tracto urinario, y solo considerándose patógenas cuando se producen infecciones por causa de otro organismo (Rodríguez, B. *et al.*, 2013).

Entonces, es clara la intención de muchos investigadores de buscar la relación entre la contaminación bacteriana y la disminución de los parámetros seminales, como se ha visto diversas especies han sido reportadas en muchas regiones del mundo, cada una con valores alternados de acuerdo a la especie, incluso en la prevalencia de las mismas, sin embargo surge una nueva hipótesis para relacionar la disminución de los parámetros seminales con la bacteriospermia, se trata de la leucospermia que en síntesis es una anormal y elevada presencia de leucocitos en el semen como respuesta a una infección bacteriana en alguna zona del tracto genitourinario (Sanocka- Maciejewska, D. *et al.*, 2005; Puertas, J. *et al.*, 2014). Es por eso que, las investigaciones relacionadas al efecto de la leucospermia en el semen buscan encontrar el nivel y la importancia de las infecciones del tracto urinario, y como afecta está a la capacidad fecundante en los diferentes procedimientos de fertilidad. Evidenciando una posible relación inversa entre valores leucocitarios superiores a $0 - 0.2 \times 10^6$ con parámetros seminales como motilidad y morfología. Sin embargo, se propone que no debería ser utilizada como único indicador de la capacidad fecundante del espermatozoide (Van der Ver, H. *et al.*, 1987).

Por otro lado, estudios realizados en pacientes diagnosticados con al menos una patología como: sub-fertilidad, varicocele, orquitis, epididimitis, prostatitis buscan establecer una posible relación entre la alta concentración leucocitaria, bajos indicadores de los parámetros seminales (pH, concentración, movilidad, morfología) y el estrés oxidativo causado por la peroxidación del espermatozoide apuntan como causa a

infecciones por virus, bacterias, hongos no diagnosticadas (Tortolero, I. *et al.*, 2004).

Han surgido diferentes cuestionamientos referidos al cultivo microbiológico rutinario y al tratamiento de antibióticos previos a un procedimiento de fertilidad, principalmente estos problemas se relacionan al tiempo de cultivo de las muestras, donde muestras que se cultivan pasadas los 2 días presentan mayor incidencia de bacterias Gram negativas o al tipo de tratamiento que se le da al paciente varón, la terapia con antibióticos puede aumentar la probabilidad de crecimiento de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos de la vagina. Así mismo, el tratamiento antibiótico será útil dependiendo del procedimiento de fertilidad, viéndose incluso que un tratamiento FIV puede llegar a ser perjudicial (Liversedge, N. *et al.*, 1996; INS, 2007). Es por eso, que la necesidad de buscar métodos y tratamientos para reducir la tasa de contaminación microbiana en el semen, impulso investigaciones en muestras seminales de 183 hombres que participaron en programas de fertilización in vitro al oeste de Sudáfrica, con el objetivo de determinar la presencia bacteriana y fúngica antes y después de un tratamiento con antibióticos, así mismo analizaron la incidencia de microorganismos después de la capacitación del semen por el método de lavado y swim-up. Evidenciaron que la incidencia de patógenos disminuyó en un 16,3% después de un tratamiento con antibióticos para Gram negativos, así mismo se redujo en un 57,4% la incidencia de contaminantes microbianos después de la capacitación de la muestra, mientras tanto en las muestras que no estuvieron bajo tratamiento se pudo observar que los ovocitos infectados se degeneraron o simplemente no se llegaron a fertilizar (Huyser, C. *et al.*, 1991).

Recientemente el uso de sistemas automatizados de alta sensibilidad para la identificación bacteriana en un menor tiempo (7,8 horas); es el caso del sistema automatizado VITEK el cual fue utilizado en 212 aislamientos bacterianos provenientes de pacientes con diferentes

patologías, entre ellos pacientes con infecciones de vías del tracto genitourinario, se identificaron 67 bacilos Gram-negativos no fermentadores, 22 *Enterococcus sp*, 29 *Staphylococcus sp*, así mismo se obtuvo información para la terapia antimicrobiana. En conclusión, el uso del sistema automatizado VITEK podría favorecer el correcto manejo de muestras provenientes de pacientes con infecciones bacterianas (Jordá, L. *et al.*, 2005).

IV. HIPÓTESIS

Si la presencia anormal de bacterias Gram positivas y Gram negativas en el semen son un factor de riesgo de infección, entonces la infección se relacionaría con ciertas patologías de infertilidad masculina.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de ejecución

- El análisis estadístico se realizó en los Laboratorios de Biología y Genética Molecular y Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma
- Los análisis y la investigación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos Biogénesis S.A.C.

5.2. Tipo y diseño de investigación

Se realizó un estudio descriptivo y observacional.

El diseño de investigación fue experimental.

5.3. Variables

a) Población

La población estuvo conformada por individuos del sexo masculino con edades comprendidas entre los 28 y 56 años, que formaron parte de un servicio de infertilidad el cual los derivó al Laboratorio Biogénesis S.A.C para el análisis del factor masculino, como los espermocultivos y espermogramas. En esta investigación también se tomaron en cuenta los resultados de los seminogramas realizados previamente, según los parámetros de la 5ta edición de la Organización Mundial de Salud (OMS) 2010.

A través de un indicativo se instruyó a cada paciente, las condiciones para la toma de muestra de semen, así como la entrega de un frasco estéril de

boca ancha para la muestra (Anexo 1) y se le solicito la firma de un consentimiento escrito de inclusión para futuros estudios (Anexo 2).

5.4. Operacionalización de las variables

Infección bacteriana	Positivo Negativo	UFC/mL	Cuantitativa discreta
Edad	Años	Años	Cuantitativa discreta
Calidad seminal	pH	8.0	Cuantitativa continua
	Volumen	Mililitros (mL)	Cuantitativa continua
	Concentración	Millones ($\times 10^6$)	Cuantitativa continua
	Vitalidad	Porcentaje	Cuantitativa discreta
	Motilidad	Progresivo / No progresivo / Inmóviles	Cuantitativa discreta
	Morfología	Porcentaje	Cuantitativa discreta
Sensibilidad microbiana	Presencia Ausencia	Sensible Intermedio Resistente	Cualitativa nominal

5.5. Procedimientos y Análisis de datos

5.5.1. Procedimientos

a) Obtención y toma de muestras

Las muestras seminales fueron obtenidas por masturbación con una abstinencia sexual de 3 - 5 días, así mismo se recopiló información del individuo para la identificación de la muestra en el laboratorio, las muestras fueron analizadas siguiendo las pautas estandarizadas del laboratorio y del manual de la Organización Mundial de la Salud, 5ta edición del 2010.

b) Análisis del Microbiológico

a. Coloración Gram

Se tomaron pequeñas azadas, con el fin de hacer el frotis en un portaobjeto y así lograr la tinción Gram. Finalmente, se realizaron las lecturas al microscopio binocular Olympus v.2S a un aumento de 1000x (Fig. N°1).

b. Cultivo de las muestras seminales

Las muestras seminales fueron sembradas en placas con Agar Sangre, Agar Chocolate y Agar Mc Conkey; las dos primeras incubadas a condiciones especiales de: 35 °C en micro-aerofilia por 24 horas, mientras que la última a 37 °C por 24 horas. (Fig. N°2). El crecimiento bacteriano fue analizado entre las 18 - 24 horas después del sembrado. Si el resultado fue negativo se volvió a hacer una segunda sembrada por otras 24 horas; y si esta lectura era negativa el resultado era: Negativo a 48 horas de incubación. Por otro lado, si el crecimiento bacteriano fue positivo, se procedió a hacer las pruebas bioquímicas y de sensibilidad antibiótica correspondiente (Fig. N°3,4,5 y 6).

c. Sistema Automatizado VITEK® 2 y de sensibilidad bacteriana

Se tomaron colonias morfológicamente similares a través de una aza de siembra, se coloraron en tubos de poliestireno con 3 mL de solución salina. La densidad del inóculo fue llevado a calibración usando el DensiCheck VITEK 2 (utiliza una sola onda de 580 nm), utilizando el estándar de turbidez McFarland (McF). La turbidez se calibro según la clase de organismo: 0.5-0.63 McF para Gram Negativas (GN); 0.5 – 0.63 Gram Positivas (GP) y 1.80-2.20 Levaduras y organismos levaduriformes (YST).

Después de tener el inóculo calibrado se transfirió 145 µL en el caso de GN, 280 µL en caso de GP, 280 µL en caso de YST a un tubo propio del equipo con 3 ml de NaCl previamente preparado. Este tubo se encuentra conectado a través de un capilar con una tarjeta que contiene 64 pocillos con diferentes sustratos que reaccionaran con el inóculo y nos permitió medir las actividades metabólicas como: acidificación, alcalinización, hidrolisis enzimático, etc. Una vez preparado las muestras se sometieron al proceso automatizado VITEK ® 2.

Ya identificado el organismo, se sometieron a la prueba de sensibilidad bacteriana utilizando las tarjetas de antibiograma del sistema VITEK ® que consiste en una placa de 18 pocillos de diferentes antibióticos según la clase del organismo. El proceso de transferencia del inóculo después del calibrado es el mismo. En el caso de tener sensibilidad >70% de antibióticos, se realizó el reporte correspondiente con la identificación y el resultado de sensibilidad bacteriana, pero si presentaba resistencia superior al 90%, se realizó una segunda prueba de confirmación con el método de Disco Difusión (Kirby- Bauer) según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS)(Fig. N°7).

5.5.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS v.23 Windows 2010 con 95% de confiabilidad. Se compararon la cantidad de casos positivos y negativos, prevalencia de bacterias en casos positivos, relación entre casos positivos y anormalidades de la calidad seminal en gráficos de Excel.

5.6. Aspecto ético

El desarrollo de esta investigación incluyó el consentimiento de los pacientes, a través de una autorización firmada. Dicho consentimiento fue emitido por el Laboratorio de Análisis Clínico Biogénesis expresando el uso exclusivo de datos de los pacientes de forma anónima para futuras investigaciones. (Anexo 2).

VI. RESULTADOS

6.1. Identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El estudio de las muestras obtenidas de los 100 pacientes determinó que el 32% resultaron ser cultivos positivos, mientras que el 68% corresponden a cultivos negativos. De los casos positivos, 31 fueron para solo una especie bacteriana, mientras que solo un caso fue positivo para dos especies de bacterias (Tabla N°1).

Los microorganismos Gram-negativos (93,8%) fueron más frecuentes que los Gram-positivos (6,2%), se identificaron 7 bacterias diferentes cuya distribución se encuentra en la Tabla N°1. De modo que, la especie con mayor frecuencia fue *Enterococcus faecalis* con 20 (62,5%) casos positivos del total diagnosticados, seguido por *Escherichia coli* con 6 (18,8%) casos. Además, se identificó *Klebsiella pneumoniae* 2 (6,3%), *Enterobacter cloacae* 1 (3,1%), *Proteus vulgaris* 1 (3,1%), *Staphylococcus albus* 1 (3,1%) y *Staphylococcus haemolyticus* 1 (3,1%) (Fig.N°9).

6.2. Pruebas de sensibilidad bacteriana para los microorganismos aislados

Las proporciones de sensibilidad y resistencia bacteriana a antibióticos no fueron las mismas para cada microorganismo. La especie *Enterococcus faecalis* fue sensible a los siguientes antibióticos: Bancomicina, Amikacina, Rifampicina, Estreptomina y Ofloxacina, mientras que mostro resistencia a la Minociclina. Para *E.coli* la sensibilidad se dio con los antibióticos Ceftriaxoma, Tobramicina, Piperacilina/Tazobactam, Sulbactam y tuvo resistencia a los antibióticos Levofloxacina y Ampicilina.

Mientras tanto, para *E. cloacae* la sensibilidad se dio a los antibióticos Gentamicina y Amikacina, contrariamente fue resistente a Levofloxacin, Ciprofloxacina y Ampicilina.

En el caso, de *K. neumoniae* fue sensible para los antibióticos Gentamicina y amikacina y resistente a los antibióticos levofloxacin, eritromicina, ciprofloxacina y ampicilina. Finalmente para la especie *P. vulgaris* la sensibilidad fue con los antibióticos Gentamicina, Amikacina, ceftriaxoma, tobramicina, sulbactam y resistente Amikacina y Gentamicina (Tabla. N°2).

6.3. Relación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas de muestras seminales con problemas de fertilidad

En este estudio se encontró alteraciones en los parámetros seminales, se obtuvo que en pacientes con crecimiento bacteriano negativo, la normozoospermia fue del 70,5% mientras que la alteración de uno o más parámetros correspondía al 29,44% de los casos. En el caso de pacientes con crecimiento positivo bacteriano, la normozoospermia se redujo al 31,25% y parámetros seminales con una o más alteraciones subió al 68,75%. (Fig.N°10)

En los espermogramas con cultivos positivos, el diagnóstico más frecuente fue la oligoastenoteratozoospermia con 15.6%, seguido por la azoospermia con 18.7% y leucozoospermia con 12.5%. Mientras que astenozoospermia con el 8.8% fue el diagnóstico más frecuente en los espermogramas con cultivos negativos (Fig. N°11).

Las muestras que presentaron resultados positivos en los espermocultivos fueron clasificadas en cuatro grupos. Muestras seminales positivas a *Enterococcus faecalis* se ubicaron en el Grupo A; Especies de

enterobacterias potencialmente patógenas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris* se ubicaron en el Grupo B; Especies coagulasa negativa como *Staphilococcus haemolyticus* y *Staphylococcus albus* en el Grupo C y las muestras seminales negativas al cultivo bacteriano se ubicaron en el Grupo D (Tabla N°3).

La incidencia de diagnósticos como Astenozoospermia, Oligozoospermia y Teratozoospermia fue mayor en el Grupo A comparado con los otros grupos. No obstante, no hubo diferencia en la incidencia de Astenozoospermia entre los grupos A y D.

Al comparar los parámetros seminales de los espermocultivos positivos del Grupo A y B con los parámetros del Grupo D, se encontró diferencias significativas en cuanto al valor promedio de los parámetros microscópicos como la concentración espermática, motilidad total y morfología normal. El único parámetro que se vio en aumento fue el volumen de muestra en pacientes con espermocultivos positivos del grupo C frente a los pacientes con cultivo negativo (Tabla N°4).

VII. DISCUSIÓN

El análisis de la calidad seminal cumple un rol fundamental como instrumento cualitativo y cuantitativo sobre el estado en el que se encuentra un paciente con problemas de infertilidad; técnicas como los espermogramas y espermocultivos brindan información de los parámetros seminales y de los microorganismos que podrían afectarlo.

Diferentes estudios concuerdan que los parámetros seminales como el volumen, concentración, morfología total, vitalidad al verse afectados por microorganismos como bacterias, virus y hongos pueden reducir sus valores de referencia y disminuir las posibilidades del espermatozoide para fecundar un ovocito, como lo sostienen Puertas (2015), quienes evidenciaron la presencia de bacterias como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* en espermocultivos y buscaron el vínculo de estos microorganismos con los parámetros seminales, encontrando un aumento del volumen seminal en pacientes fértiles con cultivos positivos, así como valores mayores de motilidad espermática en pacientes con cultivos positivos y el incremento de UFC/mL en los eyaculados de pacientes infértiles; contrario a lo que sucede con la concentración espermática la cual se redujo en pacientes diagnosticados con infertilidad y cultivos positivos. En esta investigación, se obtuvieron resultados similares, donde el único parámetro que se vio aumentado fue el volumen del eyaculado mientras que los parámetros como la concentración espermática, morfología total y vitalidad mostraban una disminución en sus valores promedio en pacientes con cultivos positivos, lo cual concuerda con Terriquez y Gonzáles (2003) quienes encontraron responsables en la disminución de los parámetros motilidad y vitalidad espermática a un grupo de bacterias Gram negativas, entre ellas *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*. En la investigación de Rodin (2003) el grupo de bacteria de mayor frecuencia fue *Staphylococcus sp.* coagulasas

negativas, sin embargo estas no estaban correlacionadas con al menos una alteración seminal, la única especie que evidencio alteración de un parámetro fue *Enterococcus faecalis*, la cual redujo la morfología normal (alteraciones en la cabeza); esto difiere con lo encontrado en la presente investigación, donde los pacientes con cultivos positivos para *S. albus* y *S. haemolyticus* mostraron un incremento en el volumen y tuvieron como diagnostico seminal azoospermia

En este estudio se comprobó que en pacientes con cultivos negativos, la astenozoospermia fue la alteración de mayor frecuencia, seguido por la oligoastenoteratozoospermia. Mientras que en pacientes con cultivos positivos fue la oligoastenoteratozoospermia la alteración más frecuente. En el estudio de Moretti (2009), al observar 1256 muestras, 417 de ellas fueron positivas para presencia bacteriana, siendo la astenozoospermia la alteración más frecuente; lo cual difiere con lo encontrado en este trabajo, según Puerta (2014) la alteración de uno o más parámetros seminales estaría condicionado por la cantidad de UFC/mL y de las especies bacterianas que se encuentran a lo largo del tracto genito-urinario del varón, partiendo de esa premisa haría tan variable las alteraciones de los parámetros seminales en cada estudio.

Por otro lado, el estudio de las especies bacterianas involucradas en procesos infecciosos y la respuesta frente a diferentes tratamientos de antibióticos, podría ser la clave para el desarrollo de estrategias que logren tratar el efecto negativo de las infecciones genito-urinarias sobre la fertilidad humana. En este trabajo se comprobó que la sensibilidad a antibióticos era variable para cada bacteria. En el caso de *Escherichia coli* la resistencia al 100% se dio con los antibióticos: Ampicilina, Levofloxacina, mientras que solo al 50% fue con Ciprofloxacina y Amikacina. En el Informe del Ministerio de Salud (2007), la resistencia de *E.coli* no se dio al 100% con ningún antibiótico, sin embargo mostro resistencia al 75% a Aztreonam, 72.2% a cefepime, 62.3% a ciprofloxacina, esta última muy parecida a lo encontrado en este estudio.

VIII. CONCLUSIONES

- La bacteria Gram positiva de mayor presencia fue *Enterococcus faecalis* en un 62.5% y en Gram negativas fue *Escherichia coli* en un 18.7%.
- Al realizar las pruebas de sensibilidad con antibióticos en el grupo de enterobacterias potencialmente patógenas se pudo observar sensibilidad al 100% con Gentamicina y Amikacina. Para la especie *Enterococcus faecalis* la susceptibilidad bacteriana se presentó con Vancomicina y Amikacina.
- El porcentaje de alteraciones en uno o más parámetros (Concentración espermática, motilidad, morfología) en pacientes con crecimiento bacteriano negativo fue del 29.4%, mientras que en pacientes con crecimiento bacteriano positivo fue un 68.7%. La alteración más frecuente en pacientes con espermocultivos positivos fue oligoastenoteratozoospermia alcanzando un 15.6%.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Barja L, Berrios L. Alteraciones de espermogramas en varones que acudieron por infertilidad de pareja a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Edgardo Rebagliati Martins [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina; 2003.
2. Galarzo S, Cano M, Puerta J, Giraldo M, Mayorga J, Cadavid A, *et al.* Efecto de los factores solubles de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* sobre la funcionalidad espermática. Revista Chilena Obstetricia y Ginecología. 2015;80(4):316–323.
3. Garza R, Hernandez K, Mejia. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica. Departamento de Biología. Revista Científica de Biología. UNAM. 2005.
4. Huyser C, Fourie F, Oosthuizen M, Neethling A. Microbial Flora in Semen during in Vitro Fertilization. Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. 1991;8 (5):260-263.
5. Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en hospitales en el Perú. 2007.
6. Jorda L, Vila A, Lanza A, Bonvehi P, Nazar J, Mikietuk A, *et al.* Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2005;39(1):19-25.
7. Liversedge N, Jenkins J, Keay S, Mclaughlin E, Sufyan H, Maile L, *et al.* Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partner's in-vitro fertilization is unnecessary and may be detrimental. Human Reproduction. 1996;(6):1227-1231.

8. Lozano R, Vivas G, Muñoz De Vera M. Mycoplasmas y anticuerpos anti-Chlamydia en semen de hombres infértiles y su relación con la calidad seminal y los marcadores de glándulas sexuales accesorias masculinas. *Revista Investigación clínica*. 2012;53(2):138-147.
9. Ministerio De Salud. Guía Nacional de Manejo de Infecciones de Transmisión sexual [PPT]. Lima: Biblioteca Central del Ministerio de Salud, 2006.
10. Ministerio De Salud. Boletín estadístico sobre infecciones de transmisión sexual Perú: 2002 – 2011. [Revista on-line] 2014 [Consultado 15 marzo 2017]; Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/2728.pdf>.
11. Moretti E, Capitani S, Figura N, Pampolli 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.
12. Nuñez R, Cortés S, Gago M, Pueyo A, Peramo B, Caballero P. Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad. *Revista Internacional de Andrología*. 2007; 5(3):206-211.
13. Ortiz J. Identificación de bacterias patógenas causantes de infecciones de vías seminales en hombres de 20 – 40 años de edad que acuden al laboratorio central Puyo [Tesis]. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias de la Salud; 2016.
14. Puerta J, Giraldo M, Cadavid A, Cardona W. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. 2014;79(3):209-217.
15. Puerta J, Villegas A, Serna G, Martínez A, Romero J, Giraldo M. Espermiocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación

con los parámetros seminales. Revista Chilena Obstetricia y Ginecología. 2015;80(1):33 -40.

16. Puerta A, Mateos F. Enterobacterias. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Medicine. 2011;10(51): 3426-3431.
17. Prigau MC. Infección del tracto urinario. Revista Salvat: Innovación y calidad. Set 2013;1(2):120-135.
18. Remohi JL, Romero J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Revista McGraw-Hill Interamericana. 2013;(4):152-163.
19. Rodin M, Larone D, Goldstein M. Relationship between semen cultures leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. Fertility and Sterility. 2003;79:1555-1558.
20. Rodríguez B, Ortiz C, Santana F. Sexually transmitted diseases, quality of semen and infertility. Revista Cubana Endocrinol. 2008;19(3):22–26.
21. Rodríguez B, Ortiz C, Santana F, Dominguez E, Nurquez B. *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y bacterias aerobias en el semen de hombres que consultan por infertilidad. Revista Cubana de Endocrinología. 2013;24(1):47-56.
22. Salazar, D. Identificación de Bacterias patógenas causantes de infecciones de vías seminales en hombres de 20 a 40 años de edad que acuden al laboratorio central Puyo [Tesis]. Puyo: Universidad Técnica de Ambato. Laboratorio Clínico. 2016.
23. Sanocka D, Ciupinska M, Kurpisz, L. Bacterial infection and semen quality. Journal of Reproductive Immunology. 2005;67:51-26.
24. Somolinos M, Aulesa C, Cabrera M, Caragol I, Planells I, Zahonero E. Estudio de la presencia de leucocitos en muestras de semen

posvasectomía. Revista Internacional de Andrología. 2007;5(3):229-232.

25. Tapia S, Rojas R. (2003). Semiología del análisis de semen. Revista Nacional Mexicana de Urología. Colegio Mexicano de Urología A.C. 2003;17(2):48-52.
26. Terriquez M, Gonzales J. Correlación entre el número de colonias bacterianas en espermocultivos con las alteraciones en los índices del análisis seminal. Departamento de Reproducción Humana, Centro Médico Nacional. 2003;18(3): 100-105
27. Tortolero I, Duarte J, Pamplona M, Alvarez E, Arata G, Regadera J, *et al.* Efectos de la Leucocitospermia sobre la calidad seminal en varones sub-fértiles con y sin varicocele. Arch. Esp. Urol. 2004;57(9): 921-928.
28. Van Der Ven H, Jeyendran R, Perez M, Hasani S, Diedrich K, Krebs D. Leucospermia and the fertilizing capacity of spermatozoa. Eur. J. Obstet. Gynecol Reproduction of Biology. 1987;24:49-52.

ANEXOS

Fig. N°1. Tinción Gram en muestra seminal y presencia de bacterias Gram negativas.

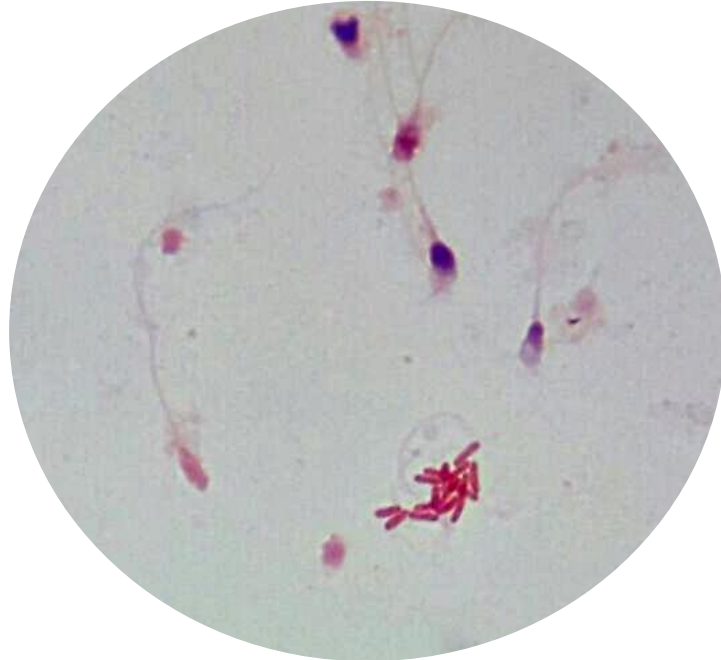


Fig. N°2. Medios de cultivos utilizados para crecimiento bacteriano. A) Agar Sangre, B) Agar Chocolate y C) Agar Mac conkey.

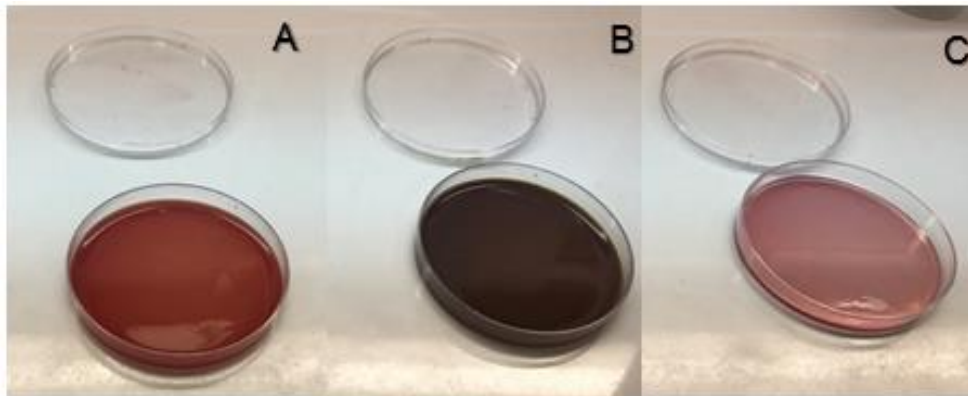
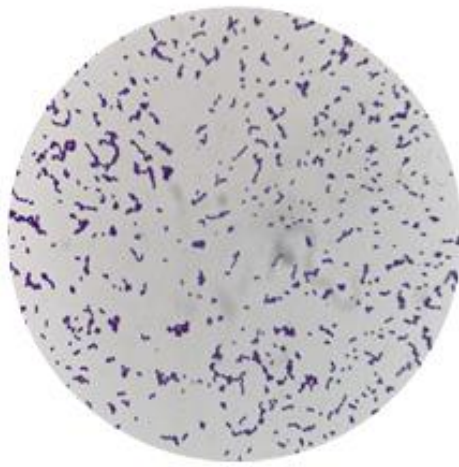


Fig. N°3. Colonias Gram positivas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Enterobacter cloacae*

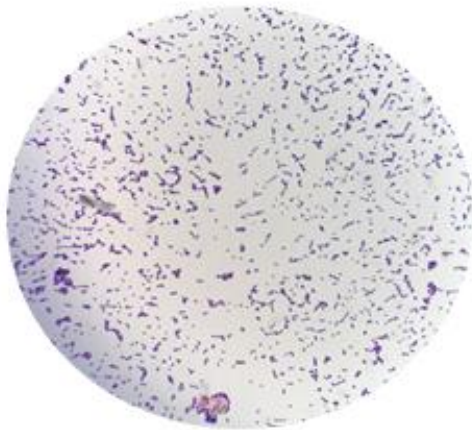


Aumento: 1000x



Crecimiento de colonias rosadas en Agar Mac Conkey

Fig. N°4. Colonias Gram negativas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Enterococcus faecalis*

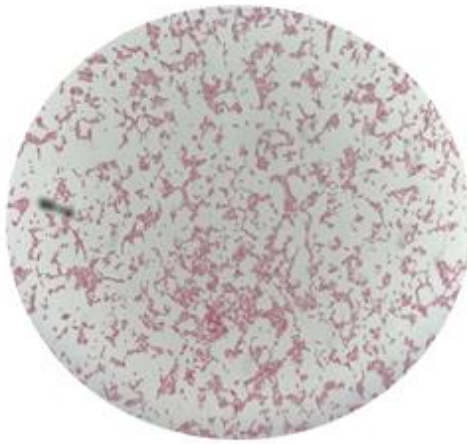


Aumento: 1000x



Crecimiento de pequeñas colonias en Agar Sangre

Fig. N°5. Colonias Gram negativas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Escherichia coli*.

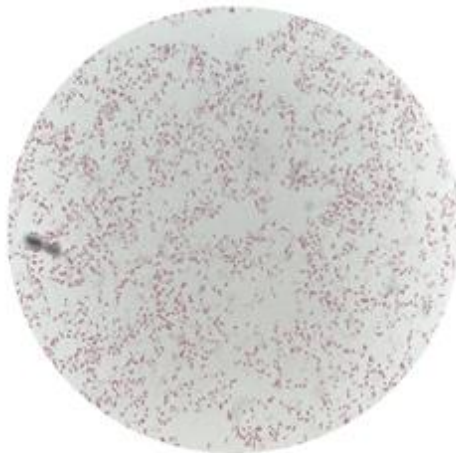


Aumento: 1000x



Crecimiento colonias lactosa negativa en Agar Mac Conkey

Fig. N°6. Colonias Gram negativas, luego de la identificación con el sistema Vitek, se confirmó que era la especie *Klebsiella pneumoniae*.



Aumento: 1000x

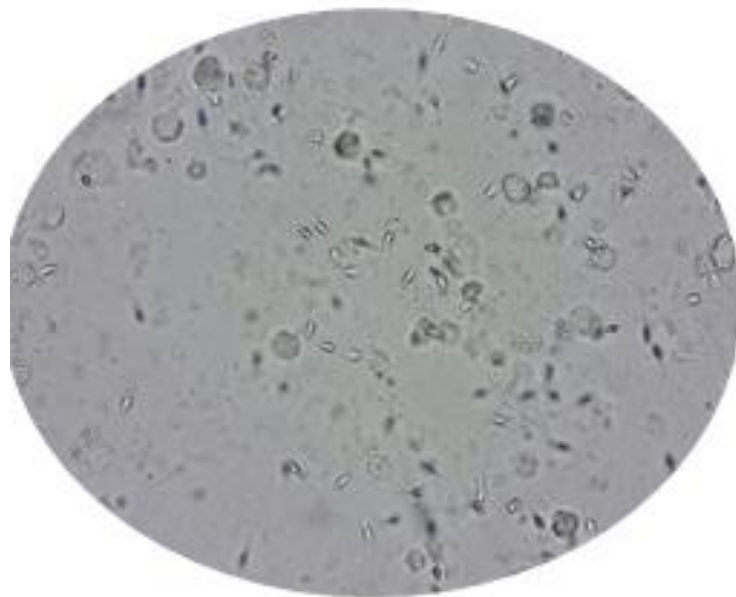


Crecimiento colonias mucosas en Agar Mac Conkey

Fig. N°7. Preparación del inóculo, pruebas bioquímicas, sensibilidad bacteriana y lectura de los resultados utilizando Vitek ® 2.



Fig. N°8. Presencia de un alto número de leucocitos en una muestra seminal, se confirmaría luego que es un caso de Leucozoospermia.



Aumento: 1000x

Tabla N°3. Incidencia de oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, oligoastenoteratozoospermia y azoospermia entre muestra seminales positivas a *Enterococcus faecalis* (Grupo A), Enterobacterias potencialmente patógenas (Grupo B), Especies coagulasa negativa (Grupo C) y muestras seminales negativas (Grupo D).

Diagnóstico	Grupo A (n = 27)	Grupo B (n =17)	Grupo C (n =2)	Grupo D (n = 18)
Oligozoospermia	7	3	0	3
Astenozoospermia	8	5	0	8
Teratozoospermia	7	5	0	4
Oligoastenoteratozoospermia	5	2	0	2
Azoospermia	0	2	2	1

Tabla N°4. Parámetros seminales en pacientes con cultivos positivos para *Enterococcus faecalis*, enterobacterias potencialmente patógenas, especies coagulasas negativas y cultivos negativos

Parámetros seminales	Grupo A n = 20	Grupo B n = 10	Grupo C n = 2	Grupo D n = 68
Volumen seminal (ml)	2.5 ± 0.6	2 ± 0.5	3.5 ± 0.4	2.1 ± 0.6
Concentración espermática (x 10⁶/ml)	41.4 ± 33.9	24.1 ± 34.1	0	61.9 ± 33.9
Motilidad Total (%)	40 ± 17.3	31.5 ± 17.2	0	48.3 ± 17.1
Morfología normal (%)	6.2 ± 3.9	4.6 ± 3.9	0	7.8 ± 3.9
Vitalidad (%)	75.6 ± 18.7	69.6 ± 19.3	0	78.5 ± 18.9

Fig. N°9. Número de cultivos positivos vs Frecuencias de bacterias aisladas.

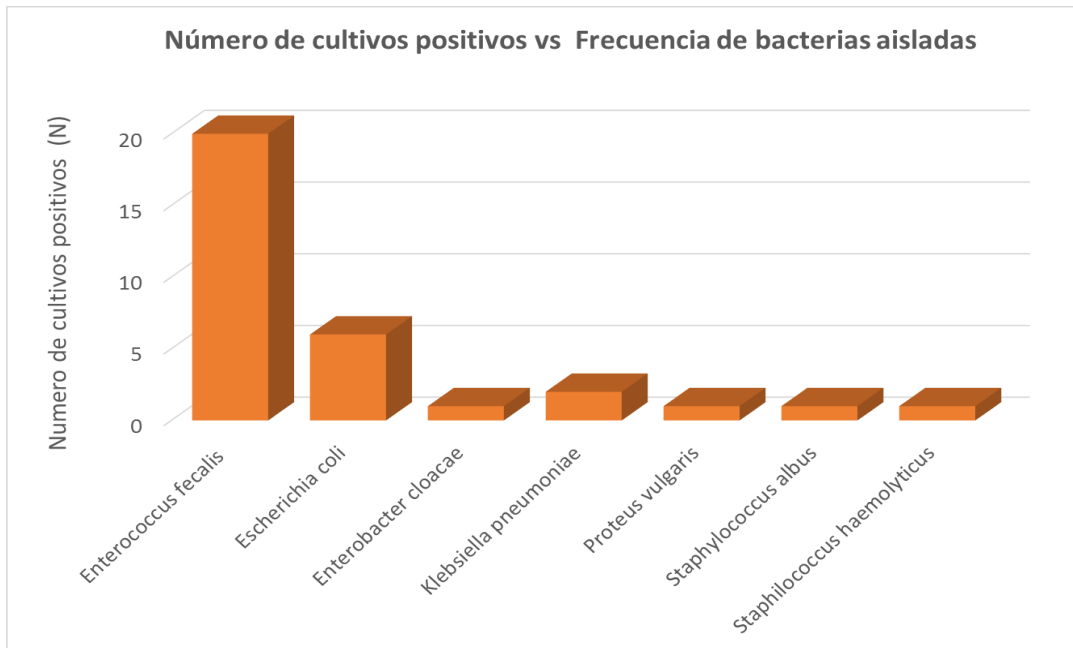


Fig. N°10. Diferencia de los parámetros seminales de las muestras según el cultivo

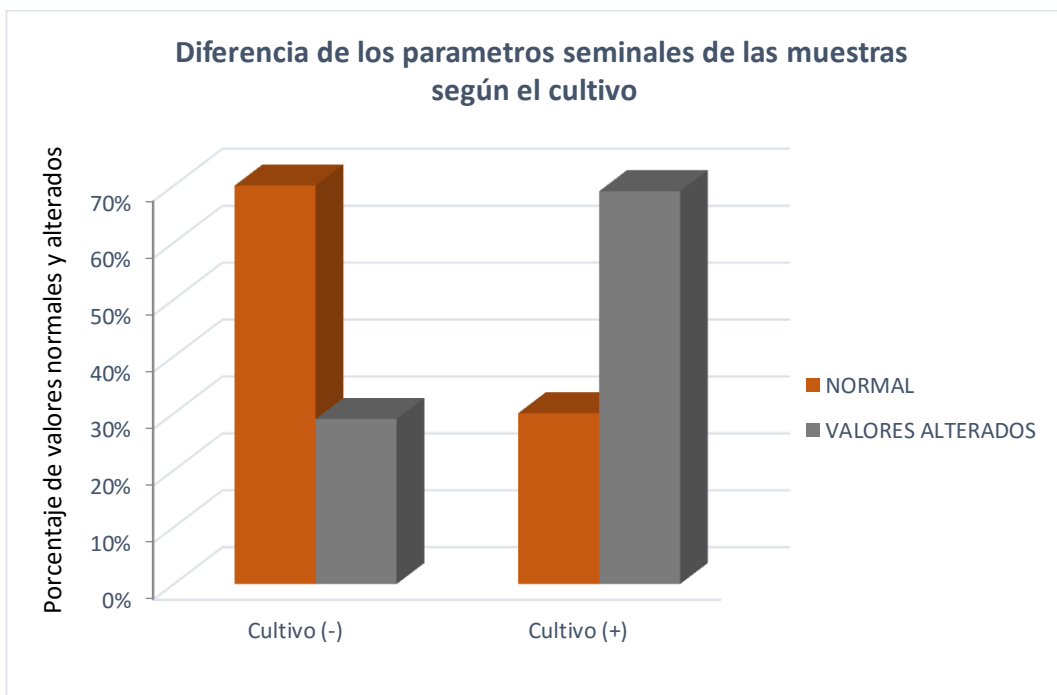
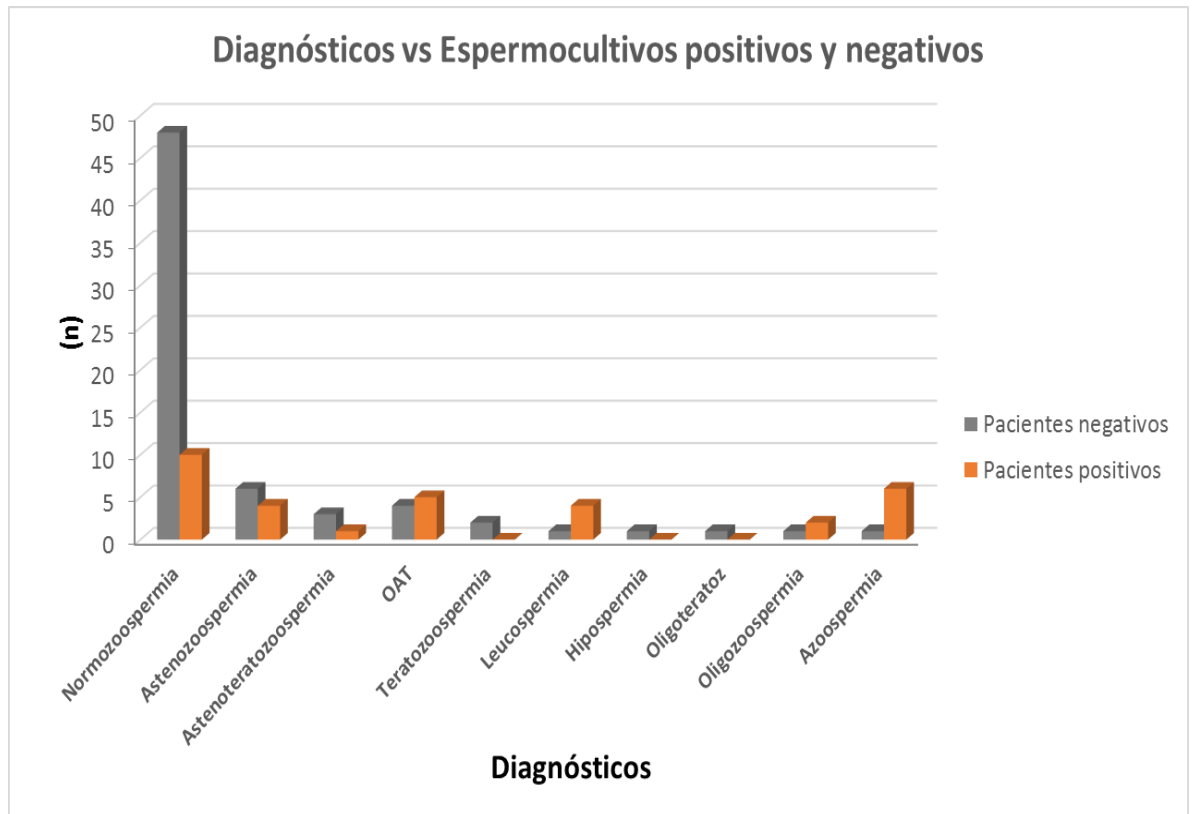


Fig. N°11. Diagnósticos vs Espermocultivo positivos y negativos



Anexo N° 1: Instructivo para la toma de muestra seminal.

INDICACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

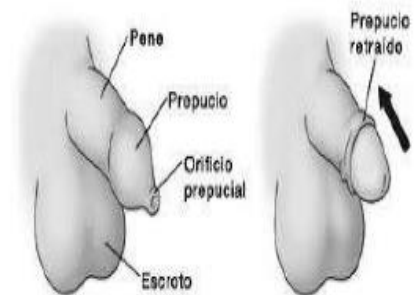
1. La muestra debe tomarse cumpliendo las siguientes condiciones:

- Mínimo 72 horas de abstinencia sexual.
- Ausencia de antisépticos, talco o desodorantes locales.
- Previa consulta con su médico, evitar la toma de antibióticos las 72 horas previas al estudio.

2. Descargar la vejiga (orinar).

3. Efectuar una minuciosa higiene de las manos y genitales con jabón y abundante agua (con retracción de prepucio).

Fig. RETRACCION DEL PREPUCIO



4. Obtener la muestra semen por masturbación en el frasco estéril.

5. La toma de muestra se realizará en nuestra institución, caso contrario se enviará la muestra al laboratorio de inmediato en un tiempo no mayor a una hora, no refrigerar.

RECOMENDACIONES:

- ☞ *Lea atentamente estas instrucciones, su cumplimiento es imprescindible para garantizar la calidad de sus resultados.*
- ☞ *Abrir el envase en el momento de la recolección de la muestra, tratando de no tocar el interior del frasco, ni el borde de la tapa.*
- ☞ *No realizar prácticas sexuales para la toma de muestra por el alto riesgo de contaminación bacteriana.*

Anexo N° 2: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ con DNI
_____, (Paciente).

Autorizo el análisis de mi muestra de semen, obtenida por masturbación, siguiendo las recomendaciones previamente sugeridas y además,

Acepto participar voluntariamente en esta investigación, conducida por: el bachiller en biología MARIO ALONSO AGUAYO CERNA.

He sido informado de que la meta de este estudio es:

“IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE MUESTRAS SEMINALES EN PACIENTES CON PROBLEMAS DE FERTILIDAD, UTILIZANDO EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK ®2 DURANTE EL 2016”

Me han indicado también que tendré que responder cuestionarios y preguntas en una entrevista, lo cual tomará unos minutos.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He recibido una explicación satisfactoria sobre los procedimientos del estudio y su finalidad. He quedado satisfecho con la información recibida, la he comprendido y se me han respondido todas mis dudas. Comprendo que mi decisión de participar es voluntaria. Presto mi consentimiento para la recolección de datos/la realización de la encuesta propuesta y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al responsable del estudio.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido.

Nombre del Participante Firma del Participante Fecha

Anexo N°3: Informe del Espermocultivo del paciente



CONTUJE :
PACIENTE :
FECHA :
MUESTRA : Cultivo De Semen
INDICACION : DR.

ESPERMACULTIVO

COLORACION GRAM

Gérmenes : No se observa
Leucocitos : 0 - 1 x campo
Hematies : Ausentes
Otros : No se observa

EXAMEN MICROBIOLÓGICO

CULTIVO: NEGATIVO A LAS 72 HORAS.

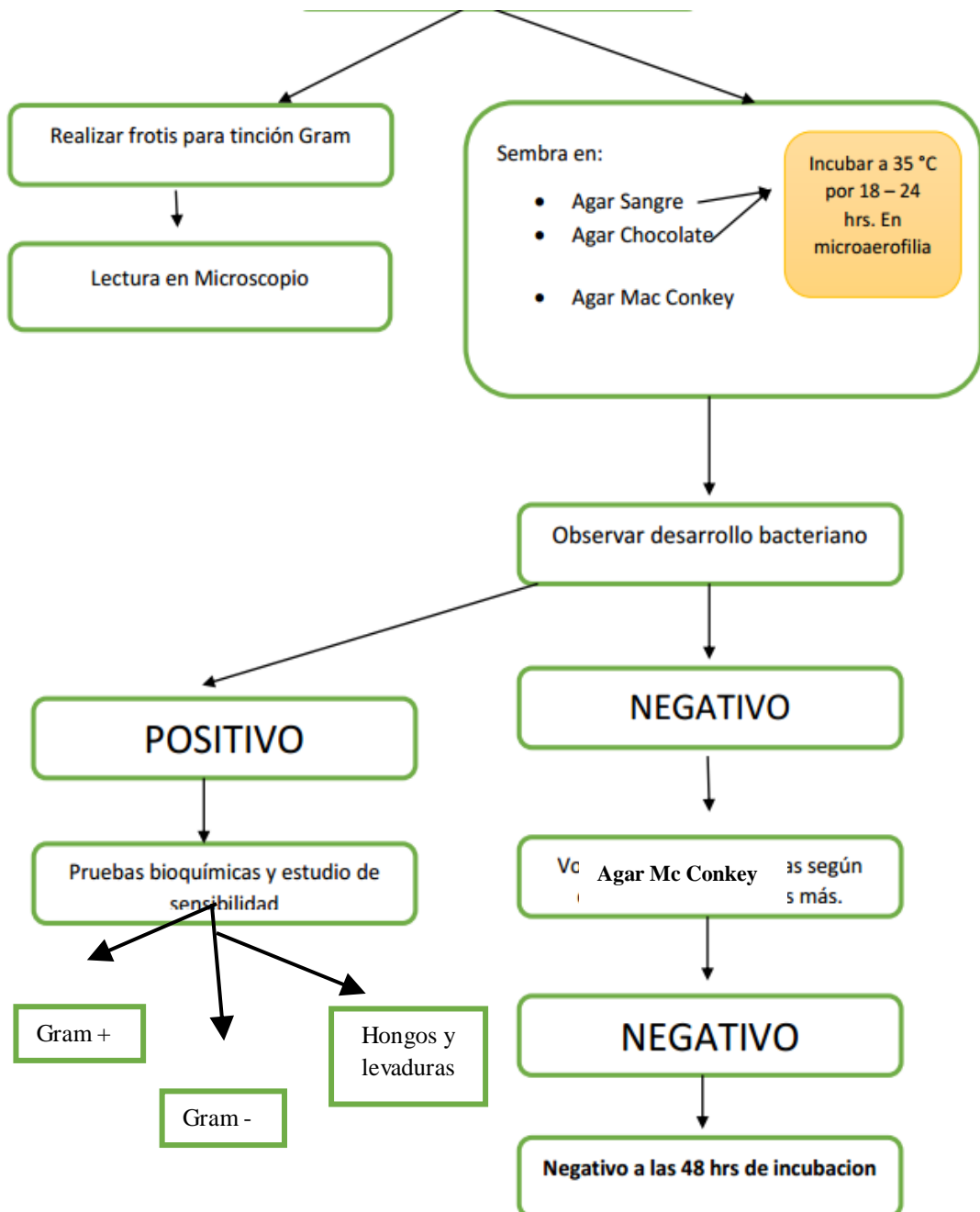
Biogénesis

Laboratorio de análisis clínicos

BIOGÉNESIS
BIOLOGÍA ART. ARRILAGA BONIBO
CNP 400

Anexo N°4: Flujograma de trabajo

ESPERMACULTIVO



Pruebas bioquímicas y estudio de sensibilidad utilizando VITEK ®