

A bakteriospermia hatása a penetrációra

In vitro kísérletek bovinnyákban

CORRADI GYULA DR.¹, NAGY BÁLINT DR.²,
MOLNÁR GYÖNGYVÉR DR.³, LINDEISZ FERENC⁴,
GIMES REZSŐ DR.²

A Semmelweis Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikája, (igazgató: Frang Dezső dr.)¹, I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikája (igazgató: Papp Zoltán dr.)², a Johan Béla Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest Bakteriológiai Laboratóriuma (osztályvezető: Lányi Béla dr.)³, és a Népjóléti Minisztérium Informatikai Osztálya (osztályvezető: Lindeisz Ferenc)⁴ közleménye

Összefoglalás: A szerzők az andrológiai betegek ondójából kitenyésztett baktériumok hatását vizsgálták meg a spermiumok penetrációjára. Vizsgálati módszerként az általuk korábban kifejlesztett bovin penetrációs modellt használták. Megállapították, hogy a baktérium törzsek, amelyeket az andrológiai betegek ondójából tenyésztettek ki, különböző mértékben hatnak a spermiumok penetrációs képességére. A baktérium-koncentráció növelése fokozza a penetráció gátlását.

Kulcsszavak: bakteriospermia, penetrogram, bovinnyák

A bakteriospermiának a fertilitásra gyakorolt hatását különféle módon vizsgálták, és különféle módon ítélték meg; a szerzők egy része nem tudta igazolni a baktériumok káros hatását, mások és saját megfigyeléseink is arra utaltak, hogy a bakteriospermia befolyásolja a fertilitást [4, 5, 6, 7, 13, 23]. A kérdéses hatás mérésére egyesek hagyományos módszereket, mások újabb funkcionális próbákat használnak [3, 9, 10]. Úgy gondoltuk, hogy az általunk kidolgozott bovin penetrációs teszt, mint kísérleti modell, alkalmas lesz a baktériumok hatásának tanulmányozására [7, 18, 19].

Korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy a meddő házasság miatt vizsgált férfiak 51,9%-a bakteriospermiás anélkül, hogy ennek klinikai tünetei volnának. Mennyiségi csíraszám-vizsgálatokkal a bakteriologikailag pozitív ondók több csoportba oszthatók: kisebb részük a 10^4 – 10^5 /ml vagy több baktériumot tartalmazó csoportokba sorolható, ami jelen anyagunkban 5,4% ill. 9,6%-ban fordult elő és a pozitív mintáknak mintegy 30%-a. Az esetek fennmaradó nagyobb része pedig a 10^3 vagy annál kevesebb csírárt tartalmazó csoportba tartozik.

Anyag és módszer

A vizsgálatokhoz felhasznált ondót öt nap carentia után onanizációval ürítették a férfiak.

Fél óra elfolyósodási idő után a WHO által javasolt módszerekkel vizsgáltuk a sejtszámot, motilitást, szerkezetet, valamint a biokémiai és mikrobiológiai analíziseket is elvégeztük. Ez utóbbi aerob baktériumokra, valamint Chlamydia trachomatisra, Mycoplasma hominisre és Ureaplasma urealyticumra terjedt ki [25]. A továbbiakban csak normozoospermiás és bakteriologikailag negatív ondók kerültek felhasználásra. A baktériumok káros hatását az általunk 1982-ben publikált bovin penetrációs tesztben vizsgáltuk.

Ennek lényege, hogy a bovin nyákszerkezete igen hasonlít az emberi nyák felépítéséhez és standardizált formában alkalmas a spermiumok penetrációs képességének mérésére.

Escherichia coli, Streptococcus alpha és beta-haemolyticus, Proteus mirabilis, Streptococcus faecalis, Streptococcus non-haemolyticus, Staphylococcus coagulase negatív törzsek „overnight” kultúrájából baktérium sejtszámot határoztunk meg [14, 23], majd a spermákkal úgy mértük össze, hogy 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 -en sejtszámú koncentrációkat állítsunk be [14, 21, 22]. A felhasznált baktérium törzsek andrológiai betegek ondójából származtak. Kontrollként baktériummentes tápoldatot mértünk össze spermával. Fél órai előinkubáció után 37 °C-on, az ondómintákba bovin nyákot tartalmazó vékony műanyag csöveket állítottunk.

Egy órai inkubálás után a kiindulástól számított 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 cm-re elvágtuk a műanyag csöveket és mikroszkóppal megvizsgáltuk az egyes mintákban a felhatoló spermiumok számát.

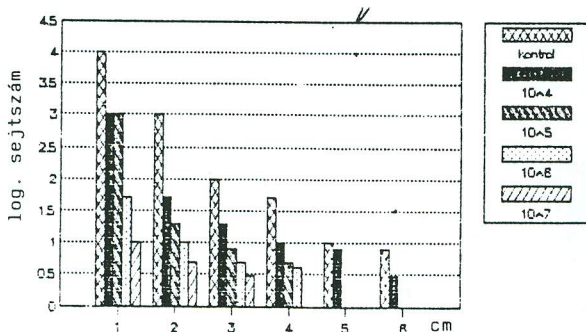
A penetrációs vizsgálat után a minták baktérium számát táptalaj lemezen ellenőriztük és megállapítottuk, hogy a telepkepező egységek száma azonos nagyságrendben maradt-e.

Statisztikai elemzésünket a χ^2 -es illesztés-vizsgálattal végeztük, személyi számítógéppel, táblázat-kezelő program segítségével. A szignifikanciát $p < 0,1$ szinten értékeltük [1]. A kontrollminta penetrogrammja ismeretében kiszámítottuk a vizsgált minta sejtszámához tartozó ún. „várt” penetrogrammokat. A megfigyelt penetrogrammnak a „várt” penetrogrammhoz való értékére χ^2 szignifikanciát számítottunk [1].

Eredmények

A baktériumok penetrációra való hatásának a vizsgálatokor a baktérium-mentes ondóban (kontroll) és a 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 -en baktérium-koncentrációt tartalmazó ondóban a felhatoló spermiumok számát határoztuk meg, meghatározott távolságokon.

A legélesebb hatás a *Proteus mirabilis*-nél jelentkezett (1. ábra). 3 cm-es távolságra a kontrollcsoportnál 100 spermium jutott el, addig a 10^4 -en csoportnál 20, a 10^5 -en csoportnál 8, 10^6 -on csoportnál 4, a 10^7 -en csoportban 1. A további távolságoknál hasonló tendencia figyelhető meg, 4, 5, 6 cm-eknél egyre csökken a penetráló spermiumok száma. A 10^5 csoportban valamint a magasabb koncentrációjú cso-



1. ábra. *Proteus mirabilis* hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.

portokban 5 cm-re 1—1 spermium jutott fel, 6 cm-re már nem is hatolt fel spermium.

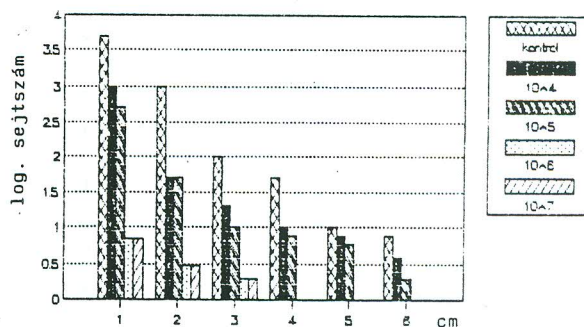
A különbségek szignifikánsak ($p < 0,01$ és 10^4 és 10^5 csoportban).

Az *Escherichia coli* és *Streptococcus faecalis*, valamint a *Streptococcus beta-haemolyticus* esetében az eredmények hasonló tendenciát

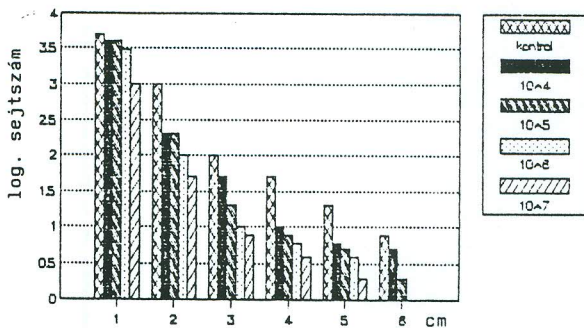
mutatnak, a 2., 3. és 4. ábrákon ez jól megfigyelhető (2., 3., 4. ábra). A 10^4 és 10^5 -en baktérium-koncentráció már élesen csökkenti a penetráló spermiumok számát, 6 cm-re a *Streptococcus beta-haemolyticus*-nál 2 spermium hatolt fel, a másik két baktérium csoportban egy sem.

7 cm-re egyik baktérium csoportban sem jutott el spermium. A kontrollhoz viszonyítva minden egyes penetrációs távolságnál láthatók a különbségek ($p < 0,001$).

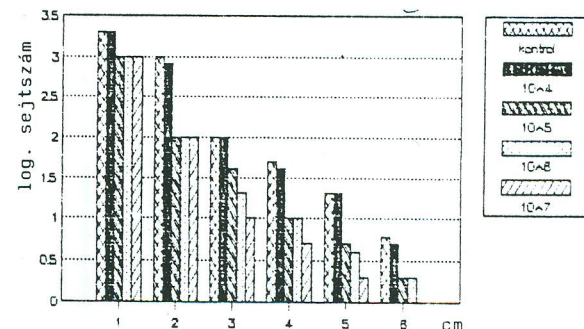
A statisztikai vizsgálatoknál *E. coli*-nál a kö-



2. ábra. *Escherichia coli* hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.



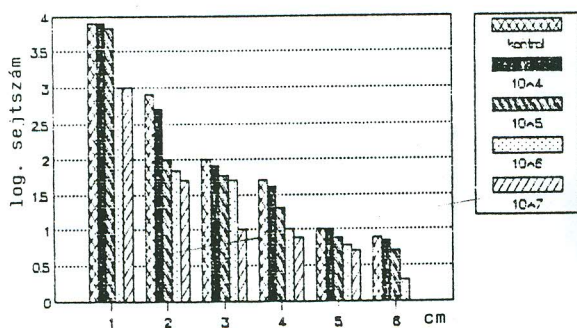
3. ábra. *Streptococcus faecalis* hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.



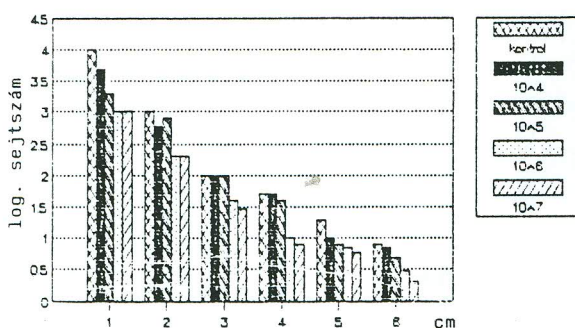
4. ábra. *Streptococcus beta-haem.* hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.

vetkező p-értékek adódtak: a 10^4 -en csoportnál $p < 0,001$, a 10^5 -en csoportnál magasabb koncentrációnál kevés az értékelhető adat, mivel kevés spermium penetrált. A vizsgálatra került további három baktériumfajta a *Streptococcus* alpha-haemolyticus, a *Streptococcus* non-haemolyticus és a *Staphylococcus* coag. negatív 10^4 , 10^5 és magasabb koncentrációi egyaránt gátolták a spermiumok felhatolását, bár nem olyan intenzíven, mint az előbbi négy baktérium, mégis a kontrollhoz képest (5., 6., 7. ábrák) a különbségek minden esetben szignifikánsak ($p < 0,001$).

Tehát az eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált baktériumok befolyásolják az in vitro modellben a penetrogrammokat, és a koncentráció függvényében befolyásolják a penetrációs távolságokat.



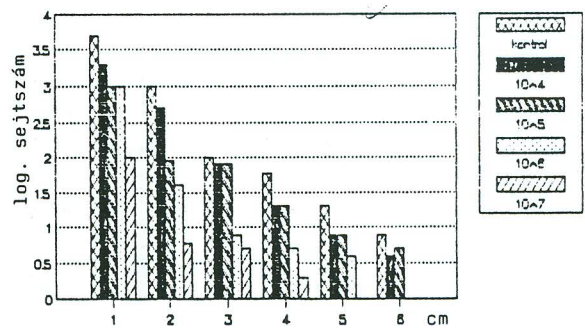
5. ábra. *Streptococcus* alpha-haem. hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.



6. ábra. *Streptococcus* non-haem. hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.

Megbeszélés

A meddőségi vizsgálatok során az ondók mikrobiológiai analízisekor a férfiak 51,9%-ában baktériumok mutathatók ki. A baktéri-



7. ábra. *Staphylococcus* coag.-neg. hatása a penetrációra 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 baktérium/ml koncentráció esetén. Az abszcisszán a penetrációs távolságot jeleztük cm-ben, az ordinátán a spermiumok számának logaritmusát.

umok által termelt toxinok vagy anyagcsere-termékek befolyásolhatják a spermiumok motilitását és egyéb hatásuk is lehet (pl. membránkárosító, tápanyagelszívó) [10]. Így a megtermékenyítő képességre feltételezésünk szerint mindenképpen hatással vannak [11, 13, 16, 21].

Egy in vitro modellt dolgoztunk ki [7], amely segítségével baktériumok, vírusok, gombák, de más kémiai anyagok hatása a spermiumok penetrációs képességére jól kimutatható. A spermiumokat a vizsgálandó anyaggal való inkubálás után csövekben penetráltattuk és a penetrogrammok leolvasása után statisztikailag analizáltuk a penetrációs képességre gyakorolt hatást.

Munkánk során az andrológiai betegek ondójából leggyakrabban kitenyészített baktériumtörzsek különböző koncentrációinak hatását vizsgáltuk meg.

Megállapítható, hogy minden egyes törzs befolyásolja a spermiumok penetrációs-képességét a baktérium-koncentráció emelése fokozza ezt a gátló hatást. A bovin penetrációs modellben megvizsgált baktérium-koncentrációk közül a 10^4 és a 10^5 koncentráció az általunk vizsgált klinikai anyagban 5,4% ill. 9,6%-ban fordul elő [6]. Tehát olyan baktérium-koncentrációknál (10^4 , 10^5) is sikerült kimutatni a penetrációs képességre gyakorolt negatív hatást, mely baktérium-koncentrációk a klinikailag tünetmentes andrológiai betegek ondójában gyakran előfordulnak.

Különböző szerzők (Paulson és Polakowski, Eliasson, Mardh, Mathews és Buxton), [11, 12, 15, 16, 17, 20] „immobilizációs faktorról”, „toxikus metabolittal”, „spermicid hatással”, a „járulékos nemi mirigyek károsodásával” próbálják magyarázni a baktériumok káros hatását, más szerzők pl. Berger és Comhaire ezt nem tudták igazolni, vagy ha igen, akkor olyan töménységű baktérium suspensiókkal, melyek in vivo nem fordulnak elő [2, 4, 5, 20]. Saját vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy amennyiben kellő érzékenységgel kísérleti mo-

dehlt használunk, akkor a káros hatást ki tudjuk mutatni. Ezt igazolták Busolo és Soffer munkái is, akik petesejt penetrációs modellt használtak, és így tudtak káros hatást kimutatni, míg a hagyományos módszerekkel nem [3, 22].

Az általunk kidolgozott és 1982-ben angol, majd 1983-ban német nyelvterületen publikált bovin penetrációs-próba további előnye, hogy amellet, hogy kellő érzékenységu kísérleti modellt; könnyen kezelhető és rendkívül olcsó eljárás.

Irodalom

1. Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. 2nd Edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987; 405—407.
2. Berger RE, Alexander ER, Monda GD, Ansell J, McCormick G, Holmes KK. Chlamydia trachomatis as a cause of acute "idiopathic" epididymitis. N Engl J Med 1978; 298: 301—304.
3. Busolo F, Zanchetta R, Lanzone E, Cusinato R. Microbial flora in semen of asymptomatic infertile men. Andrologia 1984; 16: 269—75.
4. Comhaire F, Carlier A, Verschraegen G, Vermeulen L. Spermogramme et infection genitale. In: Suchet-Henry I, Steg A, Constantin A, eds. Infection et fécondité Paris: Masson, 1977: 59—65.
5. Comhaire F, Verschraegen G, Vermeulen L. Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. Int J Androl 1980; 3: 32—45.
6. Corradi Gy, Molnár Gy, Légrádi J, Pánovics J, Szita J, Balogh F. Asymptomatikus bakteriospermia és a fertilitás. Orv Hetil 1982; 123: 3071—73.
7. Corradi Gy, Gimes R, Süle I, Balogh F. In Vitro Bovin-Penetrationstest. In: Schirren C, Semm K, eds. Fortschritte der Fertilitätsforschung. Berlin: Grosse Verlag, 1983: 696—701.
8. Dahlberg B. Asymptomatic bacteriospermia. Cause of infertility in men. Urology. 1976; 8: 563—66.
9. Danioire V, Qoerci-Danioire R. A comparative study in sperm penetration tests. Scandinavian ESHRE Congress, Malmö, 25—28 Jun. 1989.
10. Davis ML, McCune WW. Metabolism of human spermatozoa in semen. Fertil Steril 1950; 1: 158—68.
11. Eliasson R, Rajka G. Involvement of the prostate and seminal vesicles in urethritis with special reference to semen analysis. Andrologia 1970; 2: 179—82.
12. Eliasson R. Seminalplasma, accessory genital glands and infertility. In: Cockett E T K, Urry R L, eds. Male Infertility. New York: Grune and Stratton, 1976: 189—204.
13. Fowler IE, Kessler R. Genital tract infection. In: Lipshultz LI, Hovard SS, eds. Infertility in the male. New York—Edinburgh—London—Melbourne: Churchill-Livingstone, 1983: 283—293.
14. Lányi B, Mihályfi I, Kubinyiné Schwanner M. Az aerob és a fakultatív anaerob baktériumok vizsgálatának módszerei. In: Lányi B, ed. Járványügyi és Klinikai Bakteriológia. Budapest: OKI, 1980: 426—430.
15. Mardh PA, Colleen S. Search for urogenital tract pathogens in patients with symptoms of prostatitis. Scand J Urol Nephrol 1975; 9: 8—16.
16. Mardh PS, Colleen S. Antibacterial activity of human seminal fluid. Scand J Urol Nephrol. 1975; 9: 17—23.
17. Matthews CS, Buxton CL. Bacteriology of cervix in cases of infertility. Fertil Steril. 1951; 2: 45—52.
18. Nagy B, Corradi Gy, Gimes R, Pulay T, Csömör S. Spermium izolálási módszerek összehasonlító vizsgálata. Magy Nőorv L 1990; 53: 227—29.
19. Nagy B, Corradi Gy, Vajda Z, Gimes R. Occurrence of Chlamydia trachomatis in the semen of men participating in an IVF programme. Human Reproduction. 1989; 4: 53—55.
20. Paulson JD, Polakowski KL. Isolation of spermatozoal immobilization factors from Escherichia coli filtrates. Fertil Steril. 1972; 28: 182—85.
21. Schlegel HG. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme Verlag, 1972: 161—73.
22. Soffer Z, Ron-El R, Gola A, Herman A, Caspi E, Samra Z. Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. Fertil Steril. 1990; 53: 331—36.
23. Sós I. Laboratóriumi diagnosztika. Budapest: Medicina Kiadó, 1974: 884—85.
24. Swenson CE, Tóth A, Tóth C, Wolfgruber L, O'Leary WM. Asymptomatic bacteriospermia in infertile men. Andrologia. 1980; 12: 7—10.
25. Who. Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Eliasson R, Gallegos AJ, eds. Singapore: Singapore Press Concern, 1980.

Corradi Gy, Nagy B, Molnár Gy, Lindeisz, F, Gimes R.: *The effect of bacteriospermia on penetration: in vitro investigations using bovine mucus*

The effect of different bacteria on the penetration ability of spermatozoa was investigated by the method of bovine mucus penetration, formerly published by the authors. The inhibitory effect differed with the investigated bacterial types and showed a good correlation with the bacterial concentration ranging from 10^4 to 10^7 CFU/ml. All the investigated bacteria were cultured from the ejaculates of patients attending the andrology clinic.

Key-words: bacteriospermia, penetration, bovine mucus

Közlésre elfogadva: 1992. április 17.