

## **Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación** (Bacterial flora of bull semen before and after freezing process)

**Enrique A. Silveira Prado<sup>1</sup> y Roberto Machado Pérez<sup>2</sup>** . (1) Médico Veterinario. Profesor Consultante. Dpto. de Registros de Medicamentos y Ensayos Clínicos. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. (2) Lic. en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigador. Dpto. de Control de Calidad. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba.

Contacto: [esilveira@cbq.uclv.edu.cu](mailto:esilveira@cbq.uclv.edu.cu) y [esilveira@comunidad.veterinaria.org](mailto:esilveira@comunidad.veterinaria.org)

### **Resumen**

Se investigó por bacteriología general el semen fresco y después de la congelación de 50 toros de inseminación artificial y se efectuó el conteo total de unidades formadoras de colonias (UFC). A 15 de los toros se les realizó el examen bacteriológico de sus lavados prepuciales. En todas las muestras de semen fresco se obtuvo crecimiento bacteriano y los gérmenes más frecuentemente aislados fueron: *Escherichia coli* (50,0%), *Staphylococcus aureus* (36,0%) y *Staphylococcus* coagulasa negativa (28,0%). En el semen congelado solamente se obtuvo crecimiento en el 20,0%. El 74,0% del semen fresco alcanzó conteos  $\leq 1 \times 10^4$  UFC/mL antes de ser procesado; después de la congelación el 80,0% fue estéril. En el total de lavados prepuciales se obtuvo crecimiento y se detectó en mayor proporción el *Staphylococcus* coagulasa negativa (60,0%), microorganismo también aislado en el semen fresco de estos toros. Se concluyó que la adición de antibióticos al menestruo y posterior congelación en pastillas, disminuye notablemente la carga microbiana presente en el semen.

**Palabras claves:** Inseminación artificial. Bovinos. Semen fresco. Semen congelado. Semen criopreservado. Flora bacteriana.

### **Abstract**

It was investigated through general bacteriology both fresh semen and after the freezing process, carried out in 50 bulls of artificial insemination, total counting of colony forming units (CFU) was made. A bacteriological analysis of the prepuccial washing was made on 15 of these bulls. In all samples of fresh semen there was bacterial growing. The most frequently germs were: *Escherichia coli* (50,0%), *Staphylococcus aureus* (36,0%) and coagulase negative *Staphylococcus* (28,0%). In samples of frozen semen growth was only obtained in the 20,0%. The 74,0% of samples of fresh semen reached counts  $\leq 1 \times 10^4$  CFU/mL before being processed; after freezing 80,0% of the samples were sterile. In all prepuccial washings it was obtained growth and mostly detected coagulase negative *Staphylococcus* (60.0%), was also isolated in the fresh semen of these bulls. We concluded

that the addition of antibiotics to the menses and later freezing in pills, diminishes the load microbial present notably in the semen

**Keys words:** Artificial insemination. Bovines. Fresh semen. Frozen semen. Cryopreserved semen. Bacterial flora.

## **INTRODUCCIÓN**

La inseminación artificial contribuye al control y prevención de ciertas enfermedades de los animales domésticos, sin embargo, cuando sus fundamentos son violados en su uso práctico, puede convertirse en un serio peligro por la diseminación más intensa de éstas, aún con mayor frecuencia que la monta natural.<sup>[1-2]</sup> La introducción del semen congelado, práctica generalizada en la actualidad, agravó el problema debido a que facilita el intercambio del material seminal sin limitaciones geográficas y sin afectar la supervivencia de los agentes infecciosos. Sólo mediante una estricta supervisión y control veterinario de la salud de los machos donantes, unido a un competente laboratorio de diagnóstico, es posible garantizar la seguridad necesaria para obtener un semen libre de contaminaciones microbianas.<sup>[3]</sup>

Investigaciones sobre la flora bacteriana del material espermático de toros han puesto en evidencia la presencia de microorganismos patógenos y saprofitos de varios géneros y especies. A pesar de las medidas higiénicas que se toman en los centros de inseminación artificial para la manipulación y preparación del semen, en éste pueden encontrarse especies bacterianas saprofitas, con mayor frecuencia, pero también pueden estar presentes algunas especies patógenas como *Actinomyces pyogenes bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* (grupos A y D de Lancefield), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>[4-8]</sup>

A la presencia en el semen fresco o congelado de microorganismos de la flora normal del tracto reproductor del macho y la adquirida durante la recolección y procesamiento del semen e incluso durante el almacenaje de éste, no debe restársele importancia como aspecto a considerar en la calidad del material seminal, debido a su influencia en la fertilidad y potencialidad infecciosa. En este sentido las medidas de carácter higiénico que se toman durante el proceso tecnológico, desde la recolección hasta el almacenaje, garantizan la calidad sanitaria del semen.<sup>[3-4]</sup>

El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la microflora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación en las condiciones de explotación en Cuba.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se tomaron para la investigación bacteriológica general, mediante el método de la vagina artificial, muestras del eyaculado de 50 toros de inseminación artificial de la raza Holstein, de 3 a 5 años de edad, clínicamente sanos y de 50 pastillas del mismo semen después de congelado. Se realizó, además, el conteo total de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL de semen y el examen bacteriológico de 15 lavados prepuciales de éstos toros. Las

investigaciones bacteriológicas se realizaron según la metodología establecida para los Centros de Inseminación Artificial de Cuba.<sup>[9]</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras de semen fresco se aislaron un total de 68 cepas de 5 especies bacterianas consideradas patógenas facultativas y no patógenas entre las cuales *Escherichia coli* (50,0%), *Staphylococcus aureus* (36,0%) y *Staphylococcus coagulasa negativa* (28,0%), fueron las de mayor frecuencia (Tabla 1).

**Tabla 1. Frecuencia de microorganismos aislados en semen fresco y congelado**

Microorganismo	Semen fresco		Semen congelado	
	n	%	n	%
<i>Escherichia coli</i>	9	18,0	3	6,0
<i>E. coli</i> + <i>Aerobacter aerogenes</i>	3	6,0	1	2,0
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	8	16,0	1	2,0
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus coag. negativa</i>	5	10,0	1	2,0
<i>A. aerogenes</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	2	4,0		
<i>Aerobacter aerogenes</i>			1	2,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	16,0	1	2,0
<i>Staphylococcus coag. negativa</i>	9	18,0	2	4,0
<i>Arcanobacterium sp.</i>	6	12,0		
Totales	50	100	10	20,0

Los hallazgos en las muestras de semen fresco se corresponden con los obtenidos por investigadores en Cuba<sup>[10-12]</sup> y en otros países.<sup>[6-7]</sup> Obtener semen estéril es imposible, los toros sanos poseen una flora saprofita en el prepucio que puede contaminar el semen durante el eyaculado y su colecta; bajo condiciones ambientales apropiadas algunas de estas bacterias pueden comportarse como patógenos oportunistas y ser un riesgo importante para las hembras inseminadas,<sup>[5]</sup> por lo que en cualquier eyaculado siempre hay microorganismos que deben ser controlados para evitar introducir enfermedades en lugares donde nunca han existido.<sup>[8]</sup> Otros factores relacionados son los problemas de manejo de los sementales y las deficiencias en la higiene de la recolección del semen y manipulación del mismo.<sup>[3-4,6-8,13-14]</sup>

En las muestras de semen congelado solamente se obtuvo crecimiento bacteriano en diez (20,0%), correspondiendo la mayor frecuencia a la *E. coli* (12,0%) (Tabla 1). En un estudio realizado en Colombia<sup>[6]</sup> se encontró que el porcentaje de contaminación de pajillas de semen congelado importadas de Canadá y Estados Unidos fue del 14,5% mientras que el porcentaje de contaminación del semen nacional fue del 20,5%.

A pesar de que los antibióticos añadidos a los menstros actúan sobre los gérmenes presentes en el semen fresco, la contaminación con patógenos no específicos puede ocurrir durante el procesamiento y almacenaje del semen, a través de la atmósfera o por medio de las sustancias que se usan para diluirlo. Otras fuentes de contaminación son los equipos y materiales que tienen contacto directo o indirecto con el semen como los recipientes donde se almacena.<sup>[3-4,6-8,13-14]</sup> El nitrógeno líquido puede ser una fuente insospechada de contaminación ya que puede criopreservar patógenos; debido a esto se debe hacer especial énfasis en el sellaje de las pajillas y en el manejo de los termos de almacenaje.<sup>[15]</sup>

El 74,0% de las muestras de semen fresco alcanzó conteos  $\leq 1 \times 10^4$  UFC por mL antes de ser procesado. En el semen congelado el 80,0% fue estéril, resultados que demuestran que en nuestras condiciones de producción la higiene de la recolección y procesamiento del semen son satisfactorias (Tabla 2).

**Tabla 2. Conteo total de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL en semen fresco y congelado**

UFC por mL	Semen fresco		Semen congelado	
	Muestras	%	Muestras	%
0	0	0,0	40	80,0
$1 \times 10^2$	8	16,0	4	8,0
$1 \times 10^3$	13	26,0	2	4,0
$1 \times 10^4$	16	32,0	2	4,0
$> 1 \times 10^4$	13	26,0	2	4,0

En las mejores condiciones de recolección el semen de toro presenta una contaminación superior a  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Ningún dato científico permite establecer una relación significativa entre la cantidad de bacterias comunes normalmente presentes en el semen y la fertilidad del mismo; esto último no parece afectarse por la abundancia de bacterias. Las investigaciones en vacas, realizadas tanto durante el estro como durante la fase luteínica con motivo de transferencias de embriones, han revelado la presencia de una población de bacterias comunes en el cuello del útero y en el útero propiamente dicho, especialmente en las vacas multíparas, cuantitativa y cualitativamente semejante a la que se encuentra en el prepucio del macho. No obstante, la introducción de cantidades masivas o de combinaciones particulares de esa microflora exógena puede debilitar las defensas del sistema inmune y desencadenar un proceso infeccioso.<sup>[4]</sup>

Los recuentos de las colonias de bacterias (UFC/mL) presentes en el semen tratado son valiosos indicadores de las normas de higiene observadas en el laboratorio de tratamiento del semen.

En los últimos años, en Argentina, se ha observado una disminución en el porcentaje de muestras con un número alto de UFC/mL ( $> 1 \times 10^4$ ). De 9,3% en el 97, declinó a 5,5% en el 98 y a un 3% en lo que va del corriente año (1999).<sup>[7]</sup>

A lo largo de años de investigación se han logrado identificar un amplio número de agentes que se pueden transmitir a través del semen. Debido a esto también se han estudiado los puntos críticos en la producción del mismo y se han creado las medidas de control necesarias para disminuir este riesgo. De esta manera el semen utilizado en inseminación artificial debe ser libre de agentes infecciosos y no debe tener riesgos de transmisión de enfermedades. Para alcanzar esto se deben realizar exámenes de calidad cubriendo dos aspectos: evaluación periódica del producto final y continua vigilancia de la salud de los toros antes y después de la producción de semen. Además se deben identificar claramente todos los factores que podrían contribuir a la contaminación del semen, desde el toro hasta la transferencia del semen en los genitales de la hembra. Así, existe un gran compromiso de todas las personas que trabajan en el área, no sólo en la línea de producción sino también las que trabajan como organismos reguladores, para asegurar un control efectivo.<sup>[8,15-16]</sup>

Algunos investigadores consideran conveniente realizar controles bacteriológicos y/o virológicos a espacios de tiempo variables según el caso. Barth<sup>[17]</sup> recomienda determinar la presencia de microorganismos patógenos únicamente cuando hembras fértiles fracasan en ser preñadas con semen de buena viabilidad y morfología, en dosis adecuada o cuando una historia de infertilidad implica una posible causa infecciosa. Catena y Cabodevila<sup>[7]</sup> efectúan de rutina un control bacteriológico a partir del momento en que se registra un caso donde un semen que había superado la evaluación de los parámetros básicos, pero que tenía un elevado grado de contaminación con gérmenes inespecíficos, afectó seriamente la fertilidad de un lote de vaquillonas inseminadas.

Hay varias formas en que los microorganismos pueden llegar al semen. Por vía sanguínea o directamente por infecciones localizadas del tracto genital. También pueden estar asociados a inflamación o trauma del tracto urinario y la cavidad prepucial. Por consiguiente la presencia de estos patógenos puede ser intermitente en el semen, lo cual se debe tener en cuenta cuando se hacen los monitoreos del mismo.<sup>[15]</sup>

En la producción de semen para apuntar a que los reproductores sean libres de patógenos específicos (bacterias, virus, parásitos) se podría pensar en evaluar cada eyaculado de cada toro, lo cual es prácticamente imposible. Por consiguiente, se debe buscar la forma de que los reproductores donadores nunca estén en contacto con estos patógenos y estén bien protegidos de un posible contagio. El principio es que se puede garantizar semen libre de patógenos si el toro y los animales con los que convive son libres de ellos. El sistema de monitoreo debe incluir un sitio exclusivo para colectas y procesamiento de semen, personal bien entrenado y con experiencia y un programa riguroso de control del estado de salud de los toros.<sup>[8]</sup>

El semen criopreservado es un excelente mecanismo de control sanitario si se tienen en cuenta las siguientes premisas:<sup>[7]</sup>

- Es necesario determinar el estado sanitario de los sementales utilizados como donadores.

Silveira, Prado, Enrique; Machado Perez, Roberto - Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. - **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 10, Octubre/2005, **Veterinaria.org**® - **Comunidad Virtual Veterinaria.org**® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual.

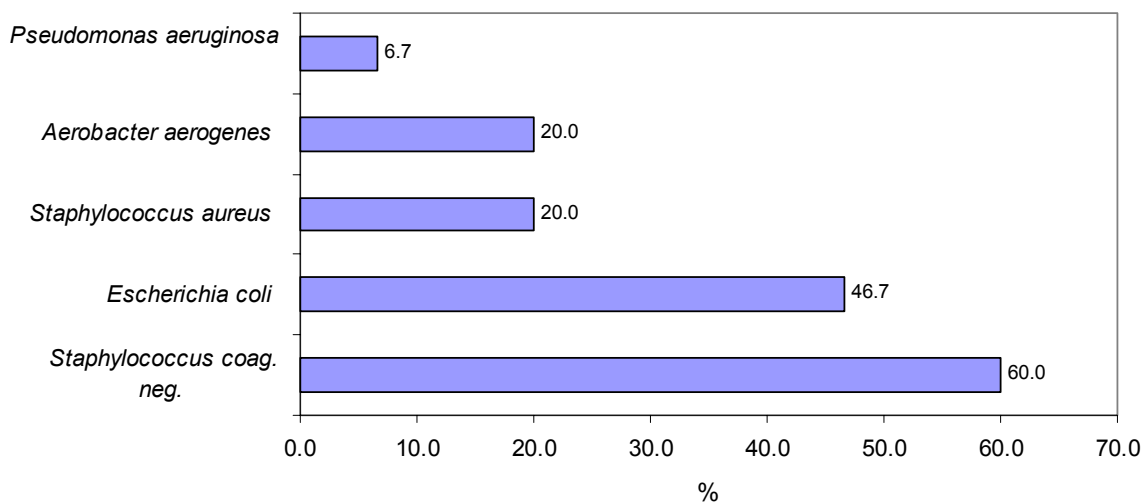
Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>



- El semen puede vehicular bacterias, virus, hongos patógenos u oportunistas.
- La mayoría de estos microorganismos sobreviven al proceso de congelación y a los antibióticos que se añaden al diluyente.
- Es posible controlar el eyaculado previo y posterior a la congelación para determinar la presencia de los gérmenes citados anteriormente.
- De un eyaculado se obtienen generalmente muchas dosis de semen, por lo que el riesgo de diseminación de enfermedades en diferentes rodeos es elevado.
- En inseminación artificial el semen es depositado en el útero, por lo tanto, no es expuesto a los efectos bactericidas de las secreciones del cuello uterino y de la vagina durante el estro.

En los lavados prepuciales de 15 toros se aislaron 23 cepas de cinco especies bacterianas, correspondiendo la mayor proporción al *Staphylococcus coagulasa negativa* (60,0%). Estos microorganismos también se aislaron en el semen fresco de estos toros (Gráfico 1).

Gráfico 1. Microorganismos aislados en lavados prepuciales (%)



Las bacterias de la flora prepucial con frecuencia contaminan el eyaculado de los toros. En investigaciones sobre la eficacia de lavados prepuciales con soluciones desinfectantes previo a la extracción del semen, se ha obtenido una disminución significativa en el nivel de contaminantes en el semen, lo que confirma lo anteriormente expuesto.<sup>[8,13-14]</sup>

## CONCLUSIONES

En las condiciones de la investigación, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa fueron las especies bacterianas más frecuentemente aisladas en los eyaculados frescos de los toros. La adición de antibióticos al menestruo y posterior congelación en pastillas, disminuye notablemente la carga microbiana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wattiaux MA. Detección de celo, servicio natural e inseminación artificial. En: Esenciales lecheras. Instituto Babcock para el Desarrollo y la Investigación Internacional de la Lechería. University of Wisconsin-Madison. 2003. USA. [http://babcock.cals.wisc.edu/spanish/de/pdf/09\\_s.pdf](http://babcock.cals.wisc.edu/spanish/de/pdf/09_s.pdf)
2. Vásquez LA. Cuidando los detalles de su programa de inseminación artificial. En: Inseminación Artificial. Publicaciones Profesionales C.A. 2002. Valencia. Venezuela. <http://www.pzca.com.ve/vb/articulos/vb49p33.htm>
3. Norma Oficial Mexicana NOM-027-ZOO-1995, Proceso Zoosanitario del Semen de Animales Domésticos. SAGARPA® 2003 [http://www.gro.sagarpa.gob.mx/Normas\\_oficiales/Catalogo\\_de\\_normas/NOM\\_ZOO/027-zoo.htm](http://www.gro.sagarpa.gob.mx/Normas_oficiales/Catalogo_de_normas/NOM_ZOO/027-zoo.htm)
4. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Parte 3 Anexos. Título 3.2 Toma y tratamiento del semen. Anexo 3.2.1 Semen de bovinos. 2004 [http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E\\_00127.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E_00127.htm)
5. Wierzbowski S. Bull semen opportunistic pathogen and ubiquitous microflora. Expert consultation on animal disease control in International Movement of Semen and Embryos. FAO. 23-27 february. 1981. Roma.
6. Ramos J, López de Herrera I. Contaminación microbial del semen bovino congelado. Rev Univ La Salle 1996; 1:17-20.
7. Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado Taurus 1999; 1(3):18-31.
8. Jiménez C, Robayo I. Bioseguridad en el procesamiento del semen bovino. Rev Electrón Vet REDVET 2004; V(10). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101004.html>
9. Manual de procedimientos para los centros de inseminación artificial. 49 p. Empresa de Inseminación Artificial. Ministerio de la Agricultura. 1997. C. de La Habana.

10. Alba LO, Silveira EA. Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilina-estreptomocina en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas. *Visión Veterinaria*. En prensa 2005.
11. Nápoles E, Gómez Isabel, Remón Silvia, Laporte Georgina. Microorganismos aislados del aparato reproductor de sementales bovinos. III Congreso Cubano de Ciencia Veterinaria. 6-9 de marzo. 1986. La Habana.
12. Gómez Isabel, Nápoles E, Laporte Georgina, Peñate Onelia. *Pseudomonas aeruginosa* en semen bovino. III Congreso Cubano de Ciencia Veterinaria. 6-9 de marzo. 1986. La Habana.
13. Peraza Nayda, García Paulina, Martínez E. Evaluación del uso de una solución desinfectante, relacionándola con la contaminación bacteriana del semen bovino. *Rev Cub Reprod Anim* 1984; 10:49-51.
14. Martínez E, Peraza Nayda, García Paulina. Soluciones desinfectantes usadas en lavados prepucciales para disminuir la contaminación bacteriana del semen. III Congreso Cubano de Ciencia Veterinaria. 6-9 de marzo. 1986. La Habana.
15. Thibier M, Guerin B. Higienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Rep Sci* 2000; 62:2-251.
16. Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JED, van den Berg Th. Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Liv Prod Sci* 2000; 62:207-220.
17. Barth AD. Evaluación de semen congelado. Manual del I<sup>er</sup> Curso de Evaluación de Semen. p. 74. 1994. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Trabajo recibido el 02/08/2005, nº de referencia 100508\_RED VET. Enviado por la Comisión de Arbitraje para REDVET en la Universidad de Santa Clara. Publicado en REDVET® el 01/10/05. (Copyright) 1996-2005.

[Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - [www.veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) y REDVET® [www.veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html)