

Evaluación de la contaminación bacteriana de semen porcino puro y diluido

M Acosta, M Ruedas, T Arias, R Paez, I Espinosa, V Martinez y R Perdigón

Instituto de Investigaciones Porcinas.
Gaveta Postal No1 Punta Brava 19200. Ciudad de la Habana. Cuba
iip@enet.cu

Resumen

La contaminación del semen puede producirse por diferentes vías, esta influye directamente sobre la calidad del mismo y ocasiona generalmente una disminución considerable de la eficiencia reproductiva. El objetivo del presente trabajo fue determinar el nivel de contaminación y las bacterias que la producen, al momento de la extracción y posterior a su dilución. Para complementar este propósito se realizó un estudio bacteriológico a 30 muestras de semen (15 puro y 15 diluido) procedentes de 15 verracos de los genotipos CC21, Yorkshire, L35, y Duroc, del Centro de procesamiento de semen porcino del Instituto de Investigaciones Porcinas de la Habana durante los meses de Enero - Abril de 2009. Los resultados fueron transformados a $\text{Log}_{10} (X+1)$ y para el procesamiento de los datos se realizó un análisis de comparación de proporciones.

El conteo promedio de células bacterianas en los eyaculados fue de $3,6 \times 10^4$ y $3,2 \times 10^4$ ufc/ml para semen puro y diluido respectivamente, lo cual sobrepasa los límites permitido para semen fresco. Se determinó la presencia de varios géneros bacterianos entre flora normal y potencialmente patógena. *Micrococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, y *Streptococcus sp* fueron las bacteria más frecuentemente aislada en semen puro y *Pseudomonas spp*, *Micrococcus spp*, y *Proteus spp* en semen diluido, lo cual indicó falta de higiene durante el proceso de colección y manipulación en el laboratorio. Se recomendó efectuar de forma periódica el control bacteriológico de los eyaculados, comprobar la efectividad de los antibióticos empleados sobre los gérmenes aislados y extremar las medidas higiénicas durante la extracción y el procesamiento de las dosis seminales.

Palabras claves: Cerdos, contaminación, microorganismos

Evaluation of the bacterial contamination of pure and diluted swine semen

Summary

The contamination of sperm can be produced by different ways, this has a direct influence over the quality of the same and generally, it causes a considerable decrease of the reproductive efficacy. The objective of this research was to determinate the level of contamination and bacteria which produce this one, at the moment of the extraction and after its dilution. To fulfill this purpose, it was made a bacteriological study to 30 sperm samples (15 pure and 15 diluted) proceeding from 15 boars of the genotypes CC21, Yorkshire, L35, and Duroc from the Processing Center of Swine Semen of the Swine Research Institute from Havana City, during the months of January-April, 2009. The results were transformed into $\text{log}_{10} (X+1)$ and there were developed a comparison of proportion analysis for the data processing through the statistical pack (Labiofam 1997).

The result of the quantitative analysis was, the average count of bacterial cells on the ejaculated was $3,6 \times 10^4$ and $3,2 \times 10^4$ ufc/ml to pure and diluted sperm respectively, which exceed the available limits for fresh sperm. It was determined the existence of different bacterial genus between normal and potentially pathogenic flora. Micrococcus spp, Pseudomonas spp, Staphylococcus spp, and Streptococcus sp, were the most isolated bacteria in pure sperm; and Pseudomonas spp, Micrococcus spp and Proteus spp in diluted sperm, which indicated a lacking of hygiene during the process of collection and manipulation in the lab. It was recommended to carry out, in a periodical way, the bacteriological control of the ejaculated, to test the effectiveness of the antibiotics used over the isolated germs and to increase the measurement of hygiene during the extraction and the processing of seminal doses.

Keywords: Contamination, microorganisms, pigs, semen

Introducción

Existen muchos factores que pueden influir directamente sobre la calidad y conservación del semen porcino, dentro de ellos, uno de los más importantes es la contaminación por microorganismos (García et al 1998). Esta contaminación ocurre habitualmente durante el proceso de la extracción (Arauz et al 2000) o puede provenir del aparato génito-urinario del semental, la cual puede ocasionar una disminución de la fertilidad (Serrano et al 1994, Conza et al 2004).

Se conoce que en condiciones normales, los testículos y las glándulas sexuales accesorias del verraco están libres de bacterias. Sin embargo se ha demostrado que la contaminación bacteriana ocurre en el proceso previo a la deposición del semen en el cervix y el útero de la cerda (Mateusen et al 2004).

Investigaciones realizadas indican que los microorganismos presentes en el semen afectan la viabilidad de los espermatozoides, debido a la competencia por el mismo sustrato y por el efecto nocivo que los metabolitos bacterianos provocan sobre la membrana celular (Tiniolli et al 2002), y que debido a la contaminación se presentan fenómenos de aglutinación, disminución del tiempo de conservación, retorno de las cerdas al estro y descargas vaginales posteriores a la inseminación. Para disminuir esta contaminación Sánchez (1994) ha recomendado coleccionar solamente la fracción rica del eyaculado.

En la actualidad para aspirar a obtener un semen con excelente calidad higiénico sanitaria es necesario cumplir con medidas de mínima contaminación durante la extracción y la manipulación en el propio laboratorio y realizar periódicamente un examen microbiológico que permita monitorear la eficiencia de estas medidas (Maroto 2006). De los resultados de este análisis, en conjunto con otros análisis de laboratorio, será posible establecer un diagnóstico acerca de los problemas relacionados con la disminución de la calidad de las dosis producidas y la posible disminución de la eficiencia reproductiva como ha sido determinado por PIC (2004)

El objetivo del presente estudio fue evaluar la contaminación bacteriana de los eyaculados porcinos al momento de la extracción y posterior a su dilución

Materiales y Métodos

Durante el periodo de enero - abril de 2009, se realizó un estudio bacteriológico a 30 muestras de semen (15 puro y 15 diluido) procedentes de 15 verracos de los genotipos CC21, Yorkshire, L35, y Duroc. El muestreo se realizó en el Centro de procesamiento de semen porcino (CPSP) del Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP) de la Habana, Cuba. Estos verracos son utilizados en la inseminación de las cerdas de productores dispersos de la provincia Habana y Ciudad de la Habana. Los sementales están mantenidos en corrales individuales, y sometidos a un régimen de extracción, manejo y alimentación según lo dispuesto en (IIP 2008).

Las muestras fueron tomadas al azar en el horario de 6 a 7 a.m., de forma aséptica utilizando guantes quirúrgicos. Se tomaron 3 ml de semen puro durante la monta al maniquí (fracción rica), desechándose la primera porción del eyaculado y una vez diluido este se tomo la misma cantidad para su análisis microbiológico. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas inmediatamente hacia el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de la Habana.

Análisis microbiológico

Para el análisis cuantitativo de las muestras se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril, se determinó el conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables, anaerobios y microaerófilos en Agar nutriente, Agar sangre y Agar Mc Conkey respectivamente. La tipificación se realizó a través de la observación de la morfología de las colonias y la confirmación mediante pruebas bioquímicas de acuerdo con la (OIE 2007)

Los resultados fueron transformados a $\text{Log}_{10}(X+1)$, y para el procesamiento de los datos se realizó un análisis de comparación de proporciones a través del paquete estadístico (Labiofam 1997)

Resultados y Discusión

El conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables en los eyaculados fue 3.6×10^4 y 3.2×10^4 ufc/ml para el semen puro y diluido respectivamente, lo cual sobrepasa los límites permitidos (OIE 2007) para semen fresco. Estas cifras evidencian la alta carga contaminante de bacterias que están presentes en los eyaculados evaluados y la necesidad de tomar medidas urgentes en aras de mejorar la calidad higiénica de las dosis seminales. La presencia de altas cargas microbianas está relacionada con la pérdida de motilidad espermática, reducción de la fecundación y muerte embrionaria (Martínez *et al* 1984). Los resultados obtenidos pudieran explicar porque en ocasiones no existe correspondencia entre un semen aparentemente normal o de buena calidad, el cual no tiene un control microbiológico del cual se espera buenos resultados y por el contrario se obtiene una baja efectividad.

Se conoce que, la presencia de bacterias ocasiona alteraciones en los espermatozoides al alterar el plasma seminal, y al mismo tiempo lo convierte en una fuente de contaminación para el tracto genital de la hembra. Mirjyn (1999) determinó que más de 4,000 colonias de bacterias producen una reducción de la calidad del semen y de su capacidad de conservación. Recientemente Kozdrowski *et al* (2005) y Le Coz (2006) han comprobado que niveles de contaminación de 10,000 colonias por ml tiene graves repercusiones sobre la prolificidad.

El análisis cualitativo de los microorganismos aislados de semen fresco y diluido coincide con los reportados por Conza et al (2004) y se muestran en la Tabla 1. No hubo crecimiento en dos de las muestras de semen puro y diluido respectivamente. El resto presentó entre uno y tres microorganismos contaminantes

Tabla 1. Géneros bacterianos presentes en el semen puro y diluido

Genero	Semen puro	%	Semen diluido	%
<i>Micrococcus spp</i>	8	42.1a	4	28.6b
<i>Pseudomonas spp</i>	4	21.1b	6	42.8a
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	1	7.14d
<i>Streptococcus suis</i> II	1	5.26d	0	0
<i>Streptococcus spp</i>	2	10.5c	1	7.14d
<i>Staphylococcus spp</i>	2	10.5c	0	0
<i>E. coli</i>	1	5.26d	0	0
<i>Citrobacter frurundii</i>	1	5.26d	0	0
<i>Proteus spp</i>	0	0	2	14.3c
<i>Bacillus spp</i>	0	0	0	0
Total	19	100	14	100

Letras distintas en la misma columna difieren significativamente para ($p < 0.001$)

El *Micrococcus spp* fue el germen que más se encontró como contaminante del semen puro ($p < 0.001$), seguido de *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, y *Streptococcus sp*, estos tres últimos han sido relacionados con descargas vaginales y retorno al estro en cerdas reproducidas por inseminación artificial (Althouse et al 2000; Bielanski et al 2003; Conza et al 2004), lo que puede sugerir la relación de estos géneros bacterianos con procesos de infertilidad de las cerdas. Otras bacterias como el *Streptococcus suis* II, la *E. coli*, y *Citrobacter frurundii* se presentaron en menor grado pero aun así revela la presencia de gérmenes patógenos condicionales que disminuyen la calidad higiénica de los eyaculados y se convierten en contaminantes potencialmente productores de enfermedades infecciosas del tracto reproductivo

En el semen diluido la bacteria que más contaminó fue *Pseudomonas spp* ($p < 0.001$), seguida de, *Micrococcus spp*, y *Proteus spp*. En menor grado *Pseudomonas fluorescens*, y *Streptococcus spp* fueron diagnosticadas. Diferentes autores han señalado que los componentes nutritivos de los diluentes facilitan la supervivencia y multiplicación de las bacterias en el semen diluido, incluso a las temperaturas de conservación recomendadas (Almond y Poolperm, 1996; Althouse et al 2000; Toniolli et al 2002). De acuerdo con estos autores y adicionando la posible resistencia microbiana al antibiótico presente en el diluyente (Althouse, 1999; Althouse et al., 2000; Althouse y Lu, 2005) se puede inferir que ambos factores condicionaron la supervivencia de estas bacterias en las muestras de semen diluido. La presencia de estas bacterias hace que la inseminación no desempeñe a cabalidad su papel de barrera sanitaria pues como se ha puesto de manifiesto es capaz de vehiculizar microorganismos potencialmente patógenos.

Investigaciones realizadas por Maroto (2006) sugieren que la fertilización puede verse afectada por la presencia en el semen de bacterias potencialmente patógenas. Pineda

y Santander (2007) refieren que además de las endometritis, es un hecho que la contaminación bacteriana reduce no solo la calidad del semen, sino que reduce todas las posibilidades de éxito de un programa de inseminación artificial. En este sentido el nivel de contaminación, dependerá de la higiene y el cuidado durante la recolección y procesamiento del semen, y de las medidas de saneamiento y desinfección en los centros de inseminación artificial.

Conclusiones y recomendaciones

- La evaluación bacteriológica del semen puro y diluido evidenció un alto nivel de contaminación y la presencia de varios géneros bacterianos entre flora saprofita y potencialmente patógena. Estas evidencias permiten sugerir que el semen es un vehículo para la producción de problemas reproductivo de índole infeccioso en la unidad objeto de estudio.
- Se recomienda efectuar de forma periódica el control bacteriológico de los eyaculados, comprobar la efectividad de los antibióticos empleados sobre los gérmenes aislados y extremar las medidas higiénicas durante la extracción y el procesamiento de las dosis seminales.

Bibliografía

Almond G y Poolperm P 1996 Semen contamination and choosing antibiotics. Proc. North Carolina Healthy Hogs Seminar. North Carolina Swine Veterinary Group. Disponible en línea: http://mark.asci.ncsu.edu/HealthyHogs/book1996/book96_5.htm

Althouse GC 1999 Orígenes y efectos de la contaminación microbiológica en el semen porcino conservado. Revista Anaporc, 192: 83-93.

Althouse GC, Kuster SG, Clark C y Weisiger RM 2000 Field investigation of bacterial contaminants and their effects in extended porcine semen. Theriology 53(5):1167-1176.

Althouse GC y KG Lu 2005 Bacteriospermia in extended porcine semen. Theriology 63(2): 573-584.

Arauz S, Stomelli A, Williams S 2000 Estudio bacteriológico del semen porcino. Congreso Mercosur de Producción Porcina. Buenos Aires, Argentina.

Bielanski A, Bergeron H, Lau PC y Devenish J 2003 Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. Cryobiology, 46(2): 146-152.

Conza L, Calle S, Echevarría L, Falcón N y María Cerón 2004 Evaluación bacteriológica de semen de verracos usados como reproductores en granjas porcinas de la zona de lurín, lima. Revista Investigaciones Veterinarias Perú 2004; 15 (2): 163-165

García JS, La puente D, Corcuera A y Martín Rillo S 1998 Evaluación práctica del semen. Importancia de los resultados de fertilidad Memorias del V Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial en Porcinos. León, México.

IIP 2008 Manual de Procedimientos Tecnicos para la Crianza Porcina. La Habana. CIMA.137p

Kozdrowski R , Staroniewicz Z y Dubiel A 2005 Bacterial flora of semen of wild boar and their hybrids with domestic pig, ejpau 8(2), #08. Available

Online: <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-08.html> Consulta Enero 2008

Labiofam 1997 Paquete estadístico Compapro. Departamento de Investigación y Desarrollo. La Habana.

Le Coz F 2006 Las enfermedades y el semen. Disponible en

http://3tres3.com/inseminacion_artificial/index.php?id_ficha=30&id_rel=22. En línea Noviembre 2006. Consulta Enero 2008

Pineda Y y Santander J 2007 Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. Revista Zootecnia Tropical 25(3):173-177.

Maroto L O 2006 Escherichia coli as contaminant of boar semen: Role of F1 fimbrial lectins in the sperm agglutination phenomena. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor(Ph.D.) in Applied Biological Science. Faculty of Sciences. Institute of Molecular Biology and Biotechnology. Laboratory of Protein Chemistry. Bruselas. 150p

Martínez E N, Peraza P y García R 1984 Evaluación bacteriológica de semen. Bovino. I. Sementales de la raza Holstein. Revista Cubana de Reproducción Animal. 10: 7-15.

Mateusen B, Deuchande R, Maes D, Van Soom A, Deley W y Kruif1 A 2004 Effect of extender and bacterial contamination on boar sperm motility parameters assessed by computer assisted sperm analysis (CASA). Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, (2):458

Mirjyn A 1999 Nuevas alternativas en la Inseminación Artificial. I curso internacional de reproducción porcina. México. 22-24.

OIE 2007 Semen de verracos. Código Sanitario para los Animales Terrestres. [Parte 3. Título 3.2.](#) Anexo 3.2.2. Disponible en: <http://www.oie.int/> En Línea Noviembre 2006. Consulta Enero 2008

PIC 2004 La contaminación del semen porcino 1era parte. [en línea] Enero 2008. Disponible en: <http://www.engormix.com>. Consulta. Enero 2008.

Sánchez R 2000 Estudio y control de la patología seminal en porcino.1994. [en línea] febrero2006. Disponible en: <http://www.3tres3.com/opinion/ficha.php?id=1451>. [Consulta: mayo, 26 2008].

Serrano M, Pérez M C, Miguel J y Milán J 1994 Estudio de las anomalías espermáticas de los verracos en relación a raza, tipo y época. Revista Anaporc. 139: 40-57.

Tonioli R, Ferreira R, Capibaribe P, Queiroz D y Sampaio B 2002 Diferentes tipos de higienización del verraco y su influencia sobre la calidad bacteriológica del eyaculado. Revista Producción Animal, 13 (2 8 1):84

Received 12 October 2010; Accepted 12 January 2011; Published 1 April 2011