

# EVALUACIÓN DE SEMEN BOVINO CONGELADO

Catena, M. (1) y J. Cabodevila (1). 1999. Taurus, 1(3):18-31.

(1) Fac. de Cs. Veterinarias. Univ. Nac. del Centro de la Prov. de Bs. As. Campus Universitario, (7000) Tandil.  
Trabajo presentado en el Simposio Internacional de Reproducción Bovina (UNCPBA), Tandil, 6 de agosto de 1999.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Inseminación Artificial](#)

## RESUMEN

El resultado de la inseminación artificial (IA) es consecuencia de una serie de eventos concatenados. Uno de los factores que influye es la calidad seminal. Si bien no existe ningún examen *in vitro* altamente correlacionado con la fertilidad, hay diversas pruebas de laboratorio que permiten estimar la calidad seminal, muy útiles cuando son realizadas correctamente e interpretadas con criterio.

En la evaluación de semen congelado se tienen en cuenta al menos tres parámetros básicos: viabilidad Post-descongelación, morfología y número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante.

Algunos investigadores consideran conveniente realizar controles bacteriológicos y/o virológicos periódicos.

La IA tiene como objetivos mejorar la calidad genética y también prevenir o eliminar enfermedades venéreas. Sin embargo la técnica no está exenta de riesgos, pues puede convertirse en vía de diseminación o en fuente de propagación de enfermedades infecciosas. Por ello, los Centros de IA deben efectuar controles periódicos a los toros dadores de semen para que los mismos estén libres de enfermedades infecciosas.

## INTRODUCCIÓN

El resultado de la inseminación artificial (IA) es la consecuencia de una serie de eventos concatenados. Cuando se inseminan hembras fértiles, con una condición corporal adecuada, el programa de IA resultará exitoso si se cuenta con un sistema de detección de celos eficiente, si se utiliza semen de buena calidad y si la técnica la ejecutan inseminadores avezados.

En este trabajo, se hará referencia exclusivamente a uno de los aspectos señalados: *la calidad seminal*

La premisa a tener en cuenta cuando se evalúa semen es que no existe ningún examen *in vitro* que esté altamente correlacionado con la fertilidad. Existen sí diversas pruebas de laboratorio para “estimar” la calidad del semen que son extremadamente útiles si son realizadas correctamente e interpretadas con criterio.

Un hecho a tener en cuenta es que el semen congelado no es un producto uniforme, esto se debe a dos razones fundamentales:

1- Existe un rango de cierta amplitud entre los valores mínimos requeridos para liberar una partida de semen congelado al mercado y un semen de alta calidad.

Durante años, los organismos gubernamentales de nuestro país y de los países tradicionalmente exportadores de semen, establecieron exigencias para asegurar que los toros residentes en los Centros de Inseminación Artificial estén libres de enfermedades y por consiguiente que el semen congelado no sea portador de agentes patógenos. En cambio, no se establecieron exigencias mínimas respecto a características del semen tales como: viabilidad post-descongelación, anormalidades o número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis. Estas surgieron de la propia industria como una forma de garantizar calidad.

En los últimos años, se establecieron normas ISO 9002 de calidad para los Centros de Inseminación Artificial, contemplando exigencias mínimas respecto a los parámetros antes señalados. Dichas exigencias no son altas, al menos para la viabilidad post-descongelación, por lo tanto las diferencias de calidad en el semen existente en el mercado actualmente, posiblemente se reduzcan pero como es lógico de esperar no desaparecerán.

2- Aunque se parta de un semen de alta calidad, la viabilidad de los espermatozoides puede verse afectada durante la distribución y el almacenamiento, si en estas etapas no se realiza un cuidadoso manejo del producto.

Esta observación no se debe pasar por alto porque muchas veces la evaluación de dosis de semen congelado arroja resultados que desaconsejan su utilización y los mismos se atribuyen erróneamente al proceso de elaboración.

Teniendo en cuenta lo enunciado hasta aquí, a nadie le quedarán dudas de que el porcentaje de preñez a primoinseminación es el mejor indicador de la fertilidad. No obstante para hacer una interpretación correcta de los resultados de la IA, hay que tener en cuenta que la fertilidad de los rodeos varía aún durante períodos cortos. Esto quedó evidenciado claramente en un trabajo donde se evaluó durante 5 meses consecutivos, el porcentaje de preñez a primoinseminación obtenido en un mismo tambo y con un mismo inseminador, con una partida de semen congelado de calidad excelente, elaborada a partir de dos eyaculados de un mismo toro. Dicho parámetro osciló entre 40 % y 84,6%.

## EVALUACIÓN DE SEMEN CONGELADO

Para evaluar semen resulta esencial contar con un microscopio de calidad, preferentemente con adaptación para contraste de fase, una platina térmica y un baño María. Según Barth, en la evaluación del semen congelado se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos. Ellos son:

- Viabilidad post-descongelación.
- Morfología.
- Número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante.

Algunos investigadores consideran conveniente realizar controles bacteriológicos y/o virológicos a espacios de tiempo variables según el caso. Barth 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. En nuestro laboratorio efectuamos de rutina un control bacteriológico a partir del momento que registramos 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.

## VIABILIDAD POST-DESCONGELACIÓN

Se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. Es recomendable efectuar además, un examen directo del acrosoma.

El daño a la membrana puede no ser completamente expresado inmediatamente después de la descongelación. Por ello, el semen debe ser incubado a 37° C durante 2 horas. Esta evaluación es conocida como prueba de termorresistencia o de incubación.

Esta prueba puede ser realizada de distintas formas. En nuestro laboratorio normalmente descongelamos 2 pajuelas de la misma partida simultáneamente. A la hora 0, vaciamos el contenido de una de ellas en un tubo de vidrio que contiene un volumen de solución fisiológica equivalente al de la pajuela, procediendo de inmediato a evaluar la motilidad progresiva y el vigor espermático. La otra pajuela permanece en el baño María y es diluida en el momento de efectuar las determinaciones correspondientes a la hora 2.

Las pastillas se diluyen en 1 ml de solución fisiológica y el semen se mantiene tapado dentro del baño en un tubo de vidrio neutro.

**a) Examen de motilidad:** el porcentaje de motilidad progresiva y el vigor son determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación.

Diversos métodos pueden ser utilizados para determinar motilidad. Cuando se cuenta con experiencia, generalmente se realizan estimaciones visuales rápidas, sin efectivamente contar células.

Una gota de semen delgada y uniforme es colocada entre porta y cubreobjeto tibios procediendo a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y luego, la tasa de progresión (vigor). Esta, puede ser cuantificado utilizando la siguiente escala:

0= sin movimiento.

1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.

2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.

3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.

4= movimiento progresivo, rápido.

5= movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10- 15% y 1 punto, respectivamente.

Las normas mínimas para motilidad exigidas en nuestro laboratorio son las definidas por el Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá y que se corresponden con las de las normas ISO 9002. Ellas son:

0 hs= 25% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 3.

2 hs= 15% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 2.

En los últimos años han sido introducidos análisis por sistemas de computación, los cuales proporcionan un método objetivo de determinación de la motilidad espermática. Una cámara de circuito cerrado de televisión, montada sobre un microscopio alimenta información a un sistema de computación, el cual entrega inmediatamente el porcentaje de motilidad progresiva, el vigor, la concentración espermática y el número de espermatozoides móviles por mililitro.

El costo del equipamiento para este sistema es muy alto y no ofrece ventajas para predecir la fertilidad en forma más acabada que los métodos tradicionales

**b) Porcentaje de acrosomas intactos:** la determinación del porcentaje de acrosomas intactos es un método morfológico de medición de la viabilidad post-descongelación, el cual tiene correlación con la fertilidad. Es un valioso complemento de la motilidad, para determinar la viabilidad y fertilidad potencial del semen congelado.

Para examinar el acrosoma, el movimiento de los espermatozoides debe ser detenido. Esto se logra mezclando el semen con glutaraldehído bufferado al 0,2%, que fija las membranas y previene su deterioro posterior. La preparación puede ser hecha sobre el portaobjeto, colocando una pequeña dosis de semen próxima a una gotita de glutaraldehído mezclándolas bien y colocándoles un cubreobjeto. Doscientas células deben ser examinadas a 1000 aumentos, inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación. Los valores mínimos para una clasificación satisfactoria son:

0 hs= 50% de acrosomas intactos.

2 hs= 35% de acrosomas intactos.

Otra prueba que se utiliza para determinar integridad de membrana es el Test de resistencia osmótica. El semen es incubado, 2 hs a 37° C, en una solución hipoosmótica de fructosa y citrato de sodio. Se realizan observaciones seriadas (horas 0, 1 y 2) entre porta y cubreobjeto, determinándose el porcentaje de espermatozoides vivos. Estos reaccionan al shock osmótico enrollando la cola. Debe haber como mínimo un 40% de espermatozoides reaccionantes.

La viabilidad post-descongelación es el parámetro más importante y generalmente aparece comprometida en aquellos casos donde se ha producido algún inconveniente en la conservación del semen. En el Servicio de Evaluación de Semen que funciona en nuestra Facultad, periódicamente se registran casos en que se solicita dicha evaluación al comprobarse que, por descuido o accidente, el termo ha quedado sin nitrógeno líquido por algún período más o menos prolongado. También hemos comprobado que la viabilidad post-descongelación suele verse afectada en aquellos casos en que el análisis revela un elevado grado de contaminación con microorganismos inespecíficos que si bien son incapaces de provocar una enfermedad reproductiva, pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides al competir con ellos por el oxígeno y los nutrientes.

## MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

La coloración de eosina-nigrosina es ideal para evaluar la morfología espermática dado que al carecer de pasos de lavado, todo lo que está en el semen se descubrirá en el frotis.

El concepto de defectos primarios y secundarios sirve bien para evaluar la aptitud reproductiva de un toro pero no para predecir la fertilidad de cierta partida de semen congelado. Cabe recordar que por definición, un defecto primario es aquel que se origina durante la espermatogénesis dentro del testículo y un defecto secundario, el que se origina dentro del epidídimo o en el laboratorio.

Blom, citado por Barth, introdujo un sistema de clasificación en defectos mayores y menores. Un defecto mayor es aquél que, presente en gran número, ha sido asociado con infertilidad. Los defectos menores son desviaciones que hasta ahora no han sido asociadas con infertilidad. Este sistema de clasificación es abierto y deberá ser modificado a medida que avance el conocimiento.

Una nueva clasificación en defectos compensables y no compensables fue propuesta por Saacke y col. Los espermatozoides con defectos compensables son aquellos incapaces de alcanzar el oviducto o de participar del proceso de fertilización. Tales espermatozoides tendrían poco efecto sobre la fertilidad, si se insemina con un número suficiente de espermatozoides aptos. En cambio, los espermatozoides con defectos no compensables (cráteres y vacuolas nucleares -defecto diadema-) acceden al óvulo como los espermatozoides normales, son capaces de penetrar la zona pelúcida desencadenar la reacción cortical impidiendo la entrada de otros espermatozoides. La presencia de este tipo de defectos suele ser la causa de baja fertilidad dado que, luego de la fertilización, se desarrollan embriones de mala calidad que mueren durante los primeros días de gestación.

Si bien cada nueva clasificación parece más apropiada que la anterior, cuando se evalúa la morfología espermática siempre surgen interrogantes tales como:

¿Qué tipo de modificación en la estructura de los espermatozoides es realmente una anomalía y si constituye una causa significativa de infertilidad?

¿Qué nivel de anomalía es tolerable?

Un conteo de 100 células es satisfactorio cuando no existen problemas mayores. Cuando un gran número de defectos espermáticos está presente, hasta 500 células deben ser contadas para obtener un espermograma preciso. Se exige un 70% de células normales.

Con las colocaciones más comunes que se utilizan habitualmente en los laboratorios es difícil detectar alteraciones en la morfología espermática que no se vean reflejadas en parámetros más sensibles como lo es por ejemplo, la viabilidad post-descongelación.

## NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES CON MOTILIDAD PROGRESIVA POR DOSIS

Surge de multiplicar el número de espermatozoides totales por el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a la hora 0 pos descongelación.

Existen al menos 4 formas distintas de determinar el número de espermatozoides. En nuestro laboratorio, se utiliza el método hemocitométrico

Un criterio vigente durante años, basado en la definición de pubertad, indicaba que la dosis inseminante no debía ser inferior a 10 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Cuando el semen congelado en pastillas dominaba el mercado de la IA en nuestro país, esta cifra era superada con creces dado que las pastillas generalmente tenían 40 millones de espermatozoides, oscilando el porcentaje de motilidad progresiva generalmente entre un 30 y 40 %.

La descongelación de pajuelas, por tratarse de un proceso automatizado con tasas de enfriamiento estrictamente controladas, significó un gran avance. Al resultar menos traumáticos los procesos de congelación y descongelación fue posible disminuir de manera significativa el número de espermatozoides contenidos en cada dosis de semen.

La situación actual, caracterizada por una alta competencia, hace que cada Centro de Inseminación Artificial quiera obtener el máximo provecho de sus reproductores, sacando mayor cantidad de dosis de cada eyaculado. Esto es común de observar en el semen de toros de alto valor genético de razas lecheras, donde el número de espermatozoides por dosis se ajusta de acuerdo a los datos de no retorno que los Centros reciben periódicamente.

Las normas ISO 9002 establecen que la dosis inseminante debe tener un mínimo de 8 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Este número puede reducirse a 6 millones si el semen posee más de 30% de espermatozoides con motilidad progresiva y si la tasa de anomalías es inferior al 25% o si, el porcentaje de no retorno 60/90 de 300 primoinseminaciones resulta equivalente al obtenido con 8 millones.

A los efectos de una correcta interpretación de los análisis de laboratorio, se debe tener presente que la evaluación del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es subjetiva y que los toros difieren en el porcentaje en el que expresan su máxima fertilidad. Al mismo tiempo, hay que recordar que por más que se establezcan valores mínimos de referencia, no es conveniente ceñir eventos biológicos a la más pura matemática.

## TRANSMISIÓN DE PATÓGENOS MICROBIANOS EN SEMEN BOVINO

La IA tiene como objetivos mejorar la calidad genética y también prevenir o eliminar enfermedades venéreas. Sin embargo la técnica no está exenta de riesgos, pues puede convertirse en vía de diseminación o en fuente de propagación de enfermedades infecciosas a nivel nacional e internacional.

El semen criopreservado es un excelente mecanismo de control sanitario si se tienen en cuenta las siguientes premisas:

- Es necesario determinar el estado sanitario de los sementales utilizados como dadores.
- El semen puede vehiculizar 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 a posterior de la congelación, para determinar la presencia de 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 IA el semen es depositado en útero, por lo tanto, no es expuesto a los efectos bactericidas de las secreciones del cuello uterino y de la vagina durante el estro.

## CONTROL EN LOS CENTROS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Para cumplir con las premisas señaladas, los Centros de IA deben efectuar cuarentena a los reproductores previo a su ingreso y controlar periódicamente que los mismos estén libres de enfermedades infecciosas. El personal debe estar debidamente entrenado siendo necesario adoptar medidas de higiene que permitan la obtención de pajuelas y/o pastillas de calidad.

En Argentina, antes de ingresar a un Centro de IA, todo reproductor debe permanecer aislado durante 60 días de los toros residentes. Se realizan controles durante el período de cuarentena y posteriormente se llevan a cabo controles semestrales para asegurar que los reproductores estén libres de brucelosis, tuberculosis, paratuberculosis, leptospirosis, campilobacteriosis genital bovina, trichomoniasis, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea vírica bovina/enfermedad de las mucosas, leucemia bovina, de acuerdo con la metodología descripta posteriormente.

### - Controles durante el período de cuarentena

**Tuberculosis:** se efectúa una intradermoreacción con PPD bovina a los 50 días de haber ingresado el animal al período de cuarentena.

**Brucelosis:** se realizan dos pruebas serológicas, por el método de BPA, como prueba tamiz y posteriormente pruebas complementarias de Wright y 2 mercaptoetanol, y dos pruebas de Huddleson en plasma seminal negativas, efectuadas cada una de ellas con un intervalo de 45 a 60 días.

**Leptospirosis:** se debe efectuar un control serológico mediante la prueba de Martín y Pettit, se acepta un título de hasta 1/200.

**Trichomoniasis:** se deben realizar cuatro controles negativos, con intervalos de 7 días por cultivo de material prepucial.

**Campilobacteriosis:** se efectúan cuatro controles negativos por inmunofluorescencia directa de material prepucial, con intervalos de 7 días.

**- Controles para la exportación de semen**

Además del control de las enfermedades de rutina, se realizan análisis para:

**Paratuberculosis:** test de ELISA o cultivo de materia fecal con resultado negativo.

**Aftosa:** se procesan 2 muestras por partida de semen a exportar, para aislamiento viral.

**rinotraqueitis infecciosa bovina:** se procesan 2 muestras por partida de semen a exportar, para aislamiento viral.

**Diarrea viral bovina:** se procesan 2 muestras por partida de semen a exportar, para aislamiento viral.

En caso de ser solicitado por el país importador se realiza también diagnóstico de leucemia bovina y lengua azul.

**Leucemia bovina:** dos pruebas de inmunodifusión en gel de agar con resultado negativo, separadas 60 días.

**Lengua azul:** una prueba de inmunodifusión en gel de agar con resultado negativo.

**- Recomendaciones para la importación y exportación de semen**

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) efectúa las siguientes recomendaciones:

El semen debe provenir de países o territorios libres de aftosa, peste bovina y pleuroneumonía contagiosa. Los animales del Centro de IA deberán estar libres de brucelosis y tuberculosis y los toros dadores y el semen deberán estar libres de lengua azul y de las enfermedades que se controlan periódicamente en los Centros de IA.

Eaglesome y García proponen una clasificación de las enfermedades según el riesgo de transmisión en IA (Cuadro 1)

**Cuadro 1:** Riesgo de transmisión de enfermedades del bovino en inseminación artificial

Categoría	Enfermedad	Presencia del agente	Lista de enfermedades OIE
1	Enfermedades con evidencia de riesgo alta o moderada		
	Brucelosis bovina	+	B
	Campilobacteriosis genital bovina	+	B
	Diarrea vírica bovina	+	-
	Estomatitis vesicular	+	A
	Fiebre aftosa	+	A
	Haemophilus somnus	+	-
	Mycoplasmosis	+	-
	Rinderpest	+	A
	Rinotraqueitis infecciosa bovina	+	B
	Trichomoniasis	+	B
	Tuberculosis bovina	+	B
	Ubicuitarios (e.j. Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli)		+
1	Enfermedades de bajo riesgo de transmisión		
	Lengua azul	+	A
	Leucemia bovina	+	B
	Fiebre efímera bovina	NR	-
	Virus Akabane	+	-
Leptospirosis	+	B	
2	Enfermedades con pequeña o ninguna información de riesgo de transmisión		
	a) Transmisión probable a través de inseminación artificial		

Inmunodeficiencia bovina	+	-
Paratuberculosis bovina	+	B
Pleuroneumonía contagiosa bovina	+	A
b) Transmisión improbable a través de inseminación artificial		
Lumpy skin disease	+	
Fiebre del Valle del Rift	NR	A
Fiebre Q	+	B
Rabia	NR	-
Septicemia hemorrágica	NR	B
Fiebre catarral maligna	NR	B
Encefalopatía espongiiforme bovina	NR	B
Listeriosis	+	-
Anaplasmosis	NR	B
Babesiosis	NR	B
Chlamydia	+	-
Hongos, levadura	+	-

+: Presencia del agente infeccioso en semen; NR: No reportado

## MICROORGANISMOS ASOCIADOS CON LA TRANSMISIÓN POR SEMEN

### 1. Rinotraqueitis infecciosa bovina

El BHV-1 replica en la mucosa del prepucio, pene y parte distal de la uretra. Cuando se produce reactivación viral, se excreta virus por semen. En este caso, puede o no haber respuesta sérica y el virus puede estar presente en semen, sin que el animal manifieste signos clínicos de enfermedad.

Los toros liberan virus durante la fase aguda y también durante la infección latente, pudiendo el semen infectarse por infección local primaria del prepucio, con posterior producción de anticuerpos neutralizantes. Animales con infección latente pueden tener títulos muy bajos o ser seronegativos, principalmente cuando no se producen las causas predisponentes para la reactivación viral. La infección del tracto genital primario puede inducir baja respuesta o ninguna. En ensayos realizados, semen de toros seropositivos a BHV-1 puede estar libre de virus cuando los toros son apropiadamente manejados con escasas situaciones estresantes.

**Diagnóstico.-** de rutina para semen se realiza aislamiento viral e identificación en cultivos celulares de origen bovino. Experimentalmente, se puede realizar identificación del virus en semen por PCR. En Centros de IA es preferible usar toros seronegativos y extraer muestra de sangre a los reproductores para efectuar pruebas serológicas 21 días después de la recolección de semen. Además, se deben analizar por lo menos 2 pajuelas porque el semen es diluido antes de congelar y no todas las pajuelas necesariamente pueden contener virus.

### 2. Enfermedad de las mucosas- Diarrea viral bovina

El BVDV es excretado en semen de toros durante la fase aguda, en la infección transitoria y también en reproductores persistentemente infectados (PI).

**Diagnóstico.-** de rutina se realiza fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización para medir anticuerpos. Para determinación del agente se realiza aislamiento viral, ELISA con antígeno de captura y PCR transcriptasa reversa. El mejor método para identificar PI es la examinación virológica y dos muestras de sangre con 4 semanas de diferencia.

### 3. Brucelosis

Las brucelas en toros pueden localizarse principalmente en vesículas seminales, ampolla, testículos y epidídimo. Los reproductores infectados pueden ser serológicamente positivos o negativos, pudiendo aislarse brucelas en semen.

**Diagnóstico.-** se considera que para ingreso a un Centro de IA, las pruebas de aglutinación serían suficientes, pero teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, sería beneficioso procesar el semen para aislamiento y aglutinación del plasma seminal, particularmente en toros provenientes de áreas de riesgo.

### 4. Leptospirosis

En bovinos produce infertilidad, aborto temprano y tardío. La serovar *harjo* ha sido aislada de vesícula seminal, epidídimo, y testículo de animales naturalmente infectados. *Leptospira* spp ha sido aislada de semen de

toros naturalmente y experimentalmente infectados, siendo reportada la transmisión seminal. *Leptospira* sobrevive en extendidos de semen no congelado con o sin antibióticos.

Diagnóstico.- la prueba de laboratorio de referencia en leptospirosis es la microaglutinación. Se han desarrollado también enzimas inmunoensayos para detección de antígenos y anticuerpos. En semen han sido reportadas dificultades para el aislamiento de leptospirosis en toros experimentalmente infectados. Se están desarrollando pruebas moleculares para su detección e identificación.

5. Campilobacteriosis genital bovina.- El toro es portador asintomático de la enfermedad y no presenta modificaciones en las características del semen. La incidencia en los toros aumenta con la edad. Se localiza en la mucosa prepucial y en la mucosa del glande. Puede ser transmitido a la hembra a través del servicio natural o artificial.

Diagnóstico.- de rutina se realiza inmunofluorescencia directa del esmegma prepucial en la cuarentena previa al ingresar al Centro de IA. Luego, controles semestrales. También se puede realizar cultivo de semen fresco y congelado para aislamiento e identificación. En la actualidad se ha de desarrollado un análisis por PCR para detectar cantidades muy bajas por mililitro de semen diluido de toros experimentalmente infectados.

#### 6. Trichomoniasis

Al igual que campilobacteriosis, el toro se comporta como portador asintomático de la enfermedad y tampoco interfiere en la espermatogénesis, ya que se encuentra en el esmegma prepucial. El parásito puede sobrevivir en semen diluido y soportar la congelación, sin embargo la transmisión de la infección por IA no ha sido reportada.

Diagnóstico.- de rutina se realiza cultivo de esmegma prepucial en medios apropiados, durante la cuarentena del reproductor previo al ingreso al Centro de IA. Posteriormente se realizan controles semestrales. También se puede realizar cultivo de semen fresco y congelado para aislamiento, considerando que los antibióticos presentes en semen congelado no afectan al protozoo. Una prueba de DNA específica y sistema de amplificación por PCR han sido también utilizados para detectar *Tritrichomonas foetus* en esmegma prepucial.

#### 7. *Haemophilus somnus*

En nuestro país no existen datos de prevalencia de la enfermedad en los rodeos. Produce infecciones en el aparato reproductor del macho y de la hembra, puede ser aislado de semen y de la cavidad prepucial en toros, sin que estos presenten manifestaciones clínicas. En el tracto reproductor existen cepas comensalistas, sin acción patógena, no pudiendo distinguirse de las cepas virulentas. Los órganos urogenitales son el reservorio del organismo, pudiendo transmitirse a la hembra a través del semen infectado, siendo éste un mecanismo de difusión muy directo.

Diagnóstico.- se realiza aislamiento e identificación. Inoculación experimental en terneros para reproducción de la meningoencefalitis trombotica causada por las cepas patógenas.

#### 8. *Chlamydia psittaci*

Produce infecciones en machos y hembras bovinas. En la hembra causa placentitis, abortos, y mortalidad perinatal. En toros produce principalmente vesiculitis. Storz, citado por Eaglesome y García, hace referencia a la excreción de clamidias en semen de toros con pioespermia y a un alto porcentaje de espermatozoides con morfología anormal. Bicknell y col. citan aislamientos en toros clínicamente normales y con semen de calidad satisfactoria. Cuando el microorganismo hace septicemia, las clamidias se liberan por semen en forma intermitente, durante aproximadamente 3 semanas. Los toros pueden permanecer como portadores con o sin presencia de anticuerpos séricos.

Diagnóstico: se realizan colocaciones para determinar cuerpos elementales o inclusiones a partir de frotis, para posteriormente realizar el aislamiento e identificación en cultivos celulares o huevos embrionados. Se encuentran en desarrollo técnicas de peroxidasa, enzimas inmunoensayo y PCR utilizadas en *Chlamydia trachomatis* para identificación de *Chlamydia psittaci*.

#### 9. Patógenos potenciales y contaminantes del semen

La presencia de ciertos microorganismos en el medio ambiente en que se encuentran los toros dadores (cavidad prepucial, instalaciones, personal, etc.) pueden actuar como patógenos potenciales del semen. Numerosos trabajos determinan la presencia de: *Actinomyces pyogenes*, *Pasteurella hemolyticum* y *multocida*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, hongos, entre otros. La presencia de microorganismos en semen usados para IA es un tema controvertido por los diferentes efectos de su presencia en relación con la fertilidad y/o el desarrollo embrionario. Al respecto, las normas ISO 9002 y la OIE recomiendan que debe haber menos de 500 unidades formadoras de colonias (UFC) por pajueta.

Para el control de los gérmenes oportunistas se recomienda: higiene en la extracción y recolección del semen, uso de material estéril, control de termos y nitrógeno líquido.

Diagnóstico: se realiza por aislamiento e identificación de los diferentes géneros bacterianos a partir del semen fresco o congelado.

## RUTINA DE CONTROL BACTERIOLÓGICO

En la Facultad de Ciencias Veterinarias siempre que se recibe semen para analizar se destina una dosis del mismo al Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. La muestra se procesa siguiendo las recomendaciones del Comité para la Examinación Microbiológica del Semen de la Asociación Americana de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario.

Se investiga la presencia de patógenos de la reproducción tales como: *Brucella spp*, *Campylobacter fetus*, *Listeria monocitógenas*, *Haemophilus somnus*, *Tritrichomona foetus*, *Chlamydia spp* y *Leptospira spp*. y de otros patógenos tales como *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

También se investiga la presencia de oportunistas tales como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulase negativo*, *Pseudomonas ssp*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp*, *Actinomyces spp*, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium spp*. entre otros, hongos y levaduras.

En los casos en que hubo desarrollo bacteriano, predominaron gérmenes oportunistas tales como *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus SPP*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Mycobacterium spp* y hongos. También se aisló *Haemophilus somnus* en una muestra y se detectaron 3 muestras positivas a *Chlamydia spp* por una prueba inmunoenzimática.

En los últimos años hemos observado una disminución en el porcentaje de muestras con un número alto de UFC (>10.000). De 9,3% en el 97, declinó a 5,5% en el 98 y a un 3% en lo que va del corriente año. Este hecho, puede deberse a las siguientes razones:

1 - En un principio, nuestro servicio era requerido cuando se detectaba algún problema luego de la inseminación, mientras que actualmente la mayoría de los colegas solicitan evaluar el semen antes de comenzar la inseminación.

2- En las muestras que se reciben, día a día aumenta la proporción de pajuelas. Es conocido que en esta forma de presentación el grado de contaminación es menor.

## CONCLUSIÓN

Las pruebas de laboratorio disponibles hoy en día no determinan si los espermatozoides cuentan con todos los atributos necesarios para llevar a cabo la fertilización. No obstante, la sumatoria de la información que cada una de ellas brinda, correctamente interpretada, permite efectuar una predicción de la fertilidad potencial de un determinado semen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida, G. 1985. Evaluación de la fertilidad seminal por métodos in vitro. Su relación con la fertilidad. CADIA, 1:32-37.
2. Amann, R.P.; Hammerstedt, R.H. 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. Biol. Reprod., 23: 647.
3. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 1979. Recommended Procedures for the Microbiologic Examination of Semen. Published by the 6101 Mineral Point Road Madison, Wisconsin 53705 1:51
4. Barth, A. D. 1990. Evaluación de semen bovino congelado. CABIA, 21: 28-36.
5. Barth, A. D. 1994. Evaluación de semen congelado. Manual del Ier. Curso de Evaluación de Semen. Río Cuarto, Córdoba, pág. 74.
6. Bicknell, E.J.; Reggiardo, C.; Noon, TH 1986. Diagnostic studies on semen from Arizona range bull. Proceedings of Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 29 17-24
7. Capdevielle, E. 1997. Semen bovino congelado: Calidad y evaluación. Therios. Suplemento especial, 27-34.
8. De Cuadro- Hansen. 1997. Apuntes de] Curso de evaluación y congelación de semen bovino. Centro de Inseminación Artificial CLIA S.A.
9. Eaglesome, M.D.; García, M.M. and Stewart R.B. 1992a. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. Veterinary Bulletin, 62, 8: 743-769
10. Eaglesome, M.D.; García, M.M. and Stewart R.B. 1992b. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II: *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma spp* and *Ureaplasma spp*, *Chlamydia*, Pathogens and Semen Contaminants; Treatment of bull semen with antimicrobial agents. Veterinary Bulletin, 62, 9: 887-910
11. Eaglesome, M.D.; García, M.M. 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. Sej. Tech. Off. Int. Epiz., 16:215-225.



12. den Daas, N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science*, 28: 97-94.
13. Foote, R.H. 1992. Preservación y predicción de fertilidad del semen. *CABIA*, 25: 22-27.
14. Fortín, M.R. 1998. Evaluación del semen comercial al descongelado. Resúmenes Cuartas Jornadas Nacionales CABIA y Primeras del Mercosur: 241-246.
15. Johnson, L.; Berndison, W.E.; Pickett, B.W. 1976. An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa. *J.An. Sej.*, 42: 951-954.
16. O'Connor, M.T.; Arnann, R.P.; Saacke, R.G. 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory test and their use for predicting fertility. *J. An. Sej.*, 53: 1368-1376.
17. Saacke, R.; Nadir, S.; Nebel, R. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41: 45-50.
18. Witt, A.C. 1998. Estudios de fertilidad de semenes comerciales en tambos. *Revista Cuenca Lechera Mar y Sierras*. Mayo/Junio.

Volver a: [Inseminación Artificial](#)