



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN LAS DOSIS SEMINALES DE  
VERRACO UTILIZANDO DILUYENTES DE LARGA DURACIÓN XT-R® y  
MR-A®.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA  
ZOOTECNISTA

PRESENTA:

**ANDREA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

**ASESORES:**

MVZ. MC. SUSANA ESPINOSA HERNÁNDEZ  
MVZ. MCV. GERARDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ



México D.F.

SEPTIEMBRE 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

## AGRADECIMIENTOS

El comienzo de este proyecto de vida parte de la unión de dos fuerzas: Mis padres. Con su cariño, comprensión y apoyo incondicional han logrado que en este camino se hayan unido grandes personas, amigos y familiares a mi vida.

Mis hermanas, quienes han enriquecido este proceso con sinceros y sabios consejos; su compañía alimentó mi espíritu, compartiendo el mismo sueño e ímpetu por la vida.

Al realizar este trabajo, no imaginé que un ser lleno de luz aparecería en este apartado, ahora tú Andrea Yamanic, formas parte de mi presente y te recreas en mis pensamientos y mi corazón. De manera inesperada surgen las cosas buenas, que te dejan una enseñanza, una sensación o un olor; pero hay otras que no llegan solas, que las buscas y las obtienes cuando tu optimismo y tenacidad te conducen a los objetivos que forman parte de ese sueño inicial. Es el caso de mis Asesores de Tesis MC. Susana Espinosa Hernández y MCV. Gerardo Ramírez Hernández quienes a través de su confianza, apoyo y sobre todo comprensión lograron que estés aquí, leyendo una parte de mi vida.

Existen diversos obstáculos que determinan la capacidad de fuerza y perseverancia del ser humano, las enseñanzas que recibí del Doctor Sócrates, me han inspirado a ser una mejor persona en mi labor como Médica Veterinaria. Pero la comprensión y la empatía no solo puede provenir de los amigos, de la familia, de los profesores; Word Media es un ejemplo de ello, gracias.

La investigación es una actividad que parte de una voluntad inspirada por un cuestionamiento, pero considero que llevar a cabo esta actividad forma parte de un privilegio. La Doctora Nelly Peña logró enseñarme e inspirarme en este proceso vital.

Como parte de la investigación para este trabajo profesional, conté con el apoyo especial del Doctor Juvencio García Sánchez que facilitó la elaboración del enfoque práctico de este proyecto, en las instalaciones de la Granja “La Nopalera” y colaboración del señor Gerardo; y como parte fundamental para la realización de este trabajo conté con el apoyo del MVZ. Arturo Cervantes quien me apoyó con los implementos de ésta investigación.

Por último y no de menor importancia, quiero expresar mi agradecimiento a los Sinodales de esta tesis, ya que su disponibilidad y sus comentarios, aportaron precisión a este trabajo hecho en base a todas las motivaciones que son de gran importancia para mí.

En general puedo decir que tengo la gracia de contar con personas a mi alrededor llenas de virtudes, las cuales han apoyado, comprendido y forjado una parte muy importante de mi vida Aline, Adriana, Erica, Gris saben que aprecio su amistad, apoyo y tiempo que me han dado.

Gracias a todos los que forman parte de mí vida.

---

## CONTENIDO

INDICE	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	10
HIPOTESIS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31

---

**LISTA DE CUADROS****PÁGINA**

<b>1.</b> Mecanismos de acción de diferentes antibióticos empleados en distintos diluyentes comerciales.	<b>7</b>
<b>2.</b> Sensibilidad bacteriana a diversos antibióticos.	<b>8</b>
<b>3.</b> Calidad del movimiento individual de los espermatozoides.	<b>15</b>
<b>4.</b> Evaluación de dosis seminales antes de su conservación.	<b>21</b>
<b>5.</b> Evaluación de dosis seminales después de su conservación.	<b>21</b>
<b>6.</b> Resultados encontrados en los diferentes muestreos.	<b>22</b>
<b>7.</b> Bacterias aisladas durante el muestreo	<b>25</b>
<b>8.</b> Resultados en las diluciones décuples.	<b>26</b>

---

## **I. RESUMEN**

**ANDREA GONZÁLEZ MARTÍNEZ. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN LAS DOSIS SEMINALES DE VERRACO UTILIZANDO DILUYENTES DE LARGA DURACIÓN XT-R® y MR-A®.** (Dirigido por: la MVZ MC. Susana Espinosa Hernández y el MVZ MCV. Gerardo Ramírez Hernández.)

El objetivo de éste estudio fue aislar e identificar bacterias presentes en dosis seminales almacenadas a temperatura ambiente y a 17 °C utilizando dos diluyentes de larga duración (XT-R® y MR-A®) con diferentes combinaciones de antibióticos. Para la obtención de las muestras se hicieron colectas con un intervalo de quince días, en las cuáles se evaluaron sus características macroscópicas y microscópicas. Posteriormente se prepararon las dosis seminales con el diluyente correspondiente y se envasaron en recipientes de 80 ml a una concentración de 3000 millones de espermatozoides cumpliendo con los parámetros permitidos; de estas, unas se almacenaron por duplicado a una temperatura de 18 °C y otro juego a temperatura ambiente. Se procedió al aislamiento e identificación bacteriana de cada muestra. En los diversos materiales no se aisló bacteria alguna. En semen fresco, se identificó *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Micrococcus spp*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. En las dosis preparadas con el diluyente MR-A®, se observó el crecimiento de *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. En dichas dosis, se mantuvo el crecimiento durante el tiempo de conservación

---

(ocho días). Con respecto al conteo de enterobacterias, se observó el crecimiento de 3 UFC el cuál se detuvo a partir de la sexta dilución. En cuanto a las dosis preparadas con el diluyente XT-R<sup>®</sup> se aislaron *Proteus spp* y *Staphylococcus aureus*; sin embargo, el crecimiento se detuvo a partir de las 72 horas de conservación y se observó el crecimiento bacteriano de 3 UFC, la cual disminuyó en la segunda dilución a 2 UFC. Se concluye que el diluyente XT-R<sup>®</sup> es de uso confiable para mantener las dosis seminales libres de crecimiento bacteriano durante su conservación comparándolo contra un diluyente de uso frecuente en la industria porcina.

---

# **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN LAS DOSIS SEMINALES DE VERRACO UTILIZANDO DILUYENTES DE LARGA DURACIÓN XT-R® Y MR-A®.**

## **II. INTRODUCCIÓN**

La Inseminación Artificial (IA) es una técnica reproductiva que tiene la ventaja de aprovechar al máximo el potencial genético de los mejores sementales, con el fin de mejorar los parámetros reproductivos en las explotaciones porcinas.

Para lograr lo anterior es necesario considerar varios aspectos, entre ellos es proveer de dosis de alta calidad. Dentro del proceso de producción de dosis seminales son numerosos los puntos y factores en los que se debe de poner atención para lograr éxito en la técnica de IA y no comprometer la viabilidad de las dosis elaboradas.<sup>1, 2</sup> Estos factores se pueden incorporar en tres pilares fundamentales: el primero es la calidad del agua de laboratorio y del diluyente, el segundo es la temperatura ambiental del área de trabajo, así como de la conservación de las dosis seminales; el tercero es la bioseguridad, higiene y desinfección.

A continuación se explica cada uno de ellos:

**Calidad del agua.-** El agua empleada para la preparación de las dosis deberá cumplir con características mínimas recomendadas en cuanto a sus propiedades y contenidos los cuales



---

son: conductividad <10 microsiemens/cm, pH entre 5 y 8, dureza cálcica < 3 mg CaCo<sub>3</sub> /l y presencia de bacterias < 50 ufc/ml. <sup>3</sup>

**Diluyente.-** Para poder conservar a los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario reducir su actividad metabólica, mediante la dilución en un medio adecuado como es el diluyente, el cuál es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado y preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo el nivel de fertilidad adecuado, entre sus componentes los antibióticos son un factor importante ya que evitan el crecimiento bacteriano en las dosis seminales preservando por más tiempo éstas.

**Temperatura.-** Hay dos momentos en los cuales la temperatura juega un papel importante, los cuales son: **1)** Durante la colecta, el procesado y el envasado a una temperatura de 35-37 °C. **2)** La conservación de las dosis seminales a una temperatura de 15 - 18 °C.<sup>3</sup>

**Bioseguridad, higiene y desinfección.-** A pesar de que los testículos y las glándulas accesorias de los verracos sanos son libres de bacterias, la colecta seminal es un proceso que está inevitablemente involucrado en una contaminación microbiana; ya que se incluye la microflora de la piel del verraco, el prepucio, el divertículo prepucial, la vejiga y de origen fecal, los cuales son probablemente los contaminantes del eyaculado. Otras fuentes de contaminación que se consideran importantes son las de origen ambiental que provienen de diversas fuentes como son: el agua utilizada en el laboratorio, los envases de las dosis

---

seminales, el diluyente, así como todo el manejo durante el proceso en la preparación de las dosis.<sup>3, 4, 5</sup>

La mayoría de estos contaminantes son bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Pseudomonas spp* que tienen la capacidad de sobrevivir y crecer a la temperatura de almacenamiento de las dosis (15 - 18 °C), utilizando el diluyente como sustrato y saturando la capacidad buffer de la dosis preparada. Los efectos negativos de la bacteriospermia parece ser dependiente de la concentración bacteriana, la cual afecta la calidad y la longevidad del semen produciendo un ambiente espermicida. Si se deja sin control, el resultado final de la contaminación disminuirá el desempeño productivo del hato.<sup>3, 4</sup>

Los diluyentes fueron diseñados específicamente para brindar a las células espermáticas el medio adecuado para prolongar la vida de éstas células; estas mismas propiedades marcan el nivel de contaminación bacteriana ya que las bacterias son organismos que poseen grandes habilidades para adaptarse a diferentes medios de exposición incluyendo la temperatura. Al inocular un cultivo conocido de bacterias a una dosis seminal, podemos observar un notable crecimiento, ya que con ayuda de los nutrientes se favorece la duplicación del Acido Ribonucleico (ARN) bacteriano y de esta manera la multiplicación en la concentración bacteriana, limitando el espacio y a su vez disminuyendo la disponibilidad de nutrientes. En un estudio, se demuestra el daño que causa la presencia de *E. coli* en las dosis seminales, la cual crea una aglutinación muy

---

notable debido a que los espermatozoides poseen una superficie rica en glicoproteínas y *E. coli* tiene una superficie llamada Fimbria Tipo I y su receptor específico gal-gal Manosa. Existe una unión entre la superficie de la célula espermática y las fimbrias de la bacteria, causando una aglutinación marcada que dependiendo del tipo de unión causa aglutinación cabeza-cabeza y/o cola-cola.

Estas uniones interfieren con la motilidad espermática debido a la adhesión y aglutinación.<sup>6</sup>

En el caso de semen diluido, la contaminación bacteriana suele producir efectos negativos sobre los espermatozoides, ya que diversos estudios indican que los productos metabólicos como las endotoxinas y metabolitos ácidos de algunas bacterias tienen efectos detrimentales; dentro de estos efectos se encuentran: una disminución de la motilidad, aglutinaciones espermáticas, aumento del porcentaje de acrosomas alterados y una reducción del pH hasta niveles ácidos (5.7 - 6.4), que conducen a una reducción en el tiempo de conservación de las dosis seminales. Por lo tanto, la adición del antibiótico en una adecuada concentración favorecerá la supervivencia espermática y se incrementarán los resultados de fertilidad.<sup>7, 8</sup> Además de la aplicación del antibiótico en la concentración óptima, también se puede lograr un avance importante si se mejoran las condiciones higiénicas en las que se produce la colecta seminal y el proceso de elaboración de las dosis seminales.<sup>9, 10</sup>

Los antibióticos de elección que en la actualidad se usan en la elaboración de diluyentes son de los grupos de aminoglucósidos, tetraciclinas y macrólidos. Ya que se busca interferir en una reacción bioquímica vital para el ciclo de vida de las bacterias,

---

evitando la resistencia bacteriana lograda por algunas que son capaces de cambiar la permeabilidad bacteriana (**Cuadro 1 y 2**).

**Cuadro 1.** Mecanismos de acción de diferentes antibióticos empleados en distintos diluyentes comerciales.

<b>Antibiótico</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Mecanismos de acción</b>
Gentamicina	Aminoglucósido de 2 <sup>a</sup> generación	Se unen de forma irreversible a la subunidad 30S de ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria
Espectinomicina	Aminoglucósido de 2 <sup>a</sup> generación	
Lincomicina	Tetraciclina de 3 <sup>a</sup> generación	Se unen de manera definitiva a la subunidad 30S ribosómica, provocando inhibición de la síntesis de proteínas. Para llegar a su sitio blanco las tetraciclinas tienen que penetrar la pared celular a través de poros o por un proceso de transporte
Tilosina	Macrólido	Obstaculizan la síntesis de proteínas en la bacteria a nivel ribosómico, se fijan a la unidad 50 S del mismo, e impiden la reacción de translocación

**Cuadro 2.** Sensibilidad bacteriana a diversos antibióticos.

Antibiótico	Sinergia	Bacterias sensibles
Gentamicina	-----	<i>Escherichia coli</i> , especies de <i>Proteus</i> (prueba del indol - positivo e indol - negativo), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , especies de <i>Klebsiella</i> – <i>Enterobacter</i> - <i>Serratia</i> , especies de <i>Citrobacter</i> , y especies de <i>Staphylococcus</i> (incluyendo cepas resistentes a <i>penicilina</i> - y <i>metilicina</i> ) <i>coagulasa</i> - positiva y <i>coagulasa</i> - negativa).
Espectinomicina	Lincomisina	<i>E. coli</i> , <i>C. perfringens</i> y <i>Actynomices piógenes</i>
Lincomicina	Espectinomicina	<i>Rickettsiae</i> sp., <i>Coxiella burnetti</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Borrelia</i> sp., <i>T. pallidum</i> , <i>Treponema pertenue</i> , <i>Chlamydia</i> sp., <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Plasmidium</i> sp., <i>E. histolytica</i> .
Tilosina	-----	Actúa contra gérmenes Gram negativos de los géneros: <i>Vibrio spp</i> , <i>Escherichia spp</i> , <i>Moraxella spp</i> . <i>Spherophorus necrophorus</i> ( <i>Fusobacterium necrophorus</i> ), <i>Chlamydia spp</i> y <i>Mycoplasma spp</i> .

En este estudio, se evaluó la acción de los antibióticos que se encuentran en dos diluyentes de larga duración, el MR-A<sup>®</sup> en el cuál los antibióticos empleados son: Enrofloxacina, Colistina y Neomicina; en el caso del diluyente XT-R<sup>®</sup> fabricado para México con una nueva presentación, el cual contiene cuatro antibióticos: Tilosina, Lincomicina, Espectinomicina y Gentamicina.

---

## **JUSTIFICACIÓN:**

La eficacia de las dosis seminales está íntimamente relacionada con la calidad de cada componente de los diluyentes que se emplean en la actualidad. Uno de los elementos que en ocasiones causan controversia son los antibióticos, ya que se ha observado que algunos de ellos no cubren las necesidades requeridas en el campo; favoreciendo la disminución de la calidad seminal debido a un crecimiento exacerbado de bacterias por lo cual, se hace necesario evaluar la efectividad de los antibióticos contenidos en los diluyentes utilizados.

---

### **III. OBJETIVO**

Aislar e identificar bacterias presentes en dosis seminales almacenadas a temperatura ambiente y a 17 °C utilizando dos diluyentes de larga duración (dosis con XT-R<sup>®</sup> y dosis con MR-A<sup>®</sup>).

---

#### **IV. HIPOTESIS**

El uso de los diluyentes de larga duración en dosis preparadas con XT-R<sup>®</sup> y dosis preparadas con MR-A<sup>®</sup> no evitan la proliferación bacteriana a temperatura ambiente y a 17 °C.



---

## V. MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en una granja porcina de ciclo completo ubicada en el Municipio de Yautepec, Edo de Morelos.

En una primera etapa, se tomaron de su laboratorio de procesamiento de semen las siguientes muestras: agua bidestilada (100ml), semen fresco de tres sementales raza Duroc de dos años de edad 1ml de cada uno vertiendo cada muestra en un tubo de ensaye estéril, vaso de precipitado (**Figura 1**), matraces, envases para dosis seminales (**Figura 2**) y termómetro (muestreo con hisopos estériles y transportados en medio de transporte stuart), diluyentes de larga duración dos de MR-A® y dos de XT-R® 1 gramo de cada uno vertiendo la cantidad en un tubo de ensaye estéril. Para evaluar cada material y determinar si estos no serian la fuente de contaminación.

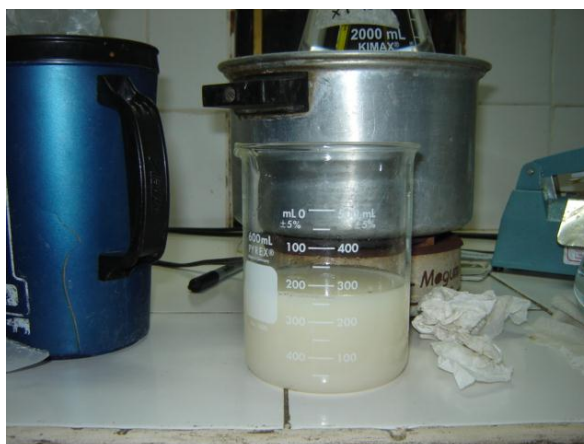


**Figura 1.** Toma de muestra de un vaso de precipitado con ayuda de un hisopo estéril.



**Figura 2.** Toma de muestra de un envase para dosis seminal con ayuda de un hisopo estéril.

En una segunda etapa, se colectó el semen (**Figura 3**) para evaluar sus características para la elaboración de las dosis seminales (**Figura 4**), de las cuales se tomó una muestra para el aislamiento bacteriano.



**Figura 3.** Vaso de precipitado con eyaculado.



**Figura 4.** Dosis seminales de las cuales se tomaron muestras para el aislamiento bacteriano.

### **Características Macroscópicas**

**Color.-** Se observó la tonalidad y consistencia del eyaculado. El color normal de un eyaculado es blanco, variando de acuoso transparente a cremoso amarillento, dependiendo de la concentración espermática presente. <sup>1</sup>

**Olor.-** El semen debe ser inodoro, cualquier olor representa alguna alteración. <sup>1</sup>

**Volumen.-** Varía de acuerdo a la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico, el promedio es de 200 ml. Esta característica se midió con una balanza digital, para lo que se consideró la conversión de un gramo equivalente a un mililitro (ml). <sup>1</sup>

**pH.-** Los valores normales varían de 7.2 - 7.8. Para la evaluación de esta característica se utilizaron tiras reactivas con un rango de 0 a 14. <sup>1</sup>

---

**Temperatura.-** La temperatura del eyaculado para ser procesado se encuentra en el rango de 35 – 37 °C.<sup>1</sup> La cual se midió con un termómetro de vidrio propio del laboratorio.

### **Características Microscópicas**

**Motilidad y Vigor.-** El valor mínimo aceptado es de 70 % con un vigor de 3. Para observar la motilidad general de los espermatozoides (en masa), se colocó una gota de semen fresco sobre un portaobjetos de vidrio, sobre ella un cubreobjetos (ambos atemperados a 37 °C en una termoplatina) y se observó a través de un microscopio óptico con el objetivo 10x (seco débil). Posteriormente con el objetivo 40x (seco fuerte), se determinó el movimiento individual (Vigor) otorgando un valor de acuerdo a la escala de calidad del movimiento, cuyos rangos son de cero (sin movimiento) a cinco (movimiento progresivo absoluto y rápido) (**Cuadro3**).<sup>1</sup>

**Cuadro 3.** Calidad del movimiento individual de los espermatozoides.

<b>Valor</b>	<b>Descripción</b>
0	Sin movimiento (Necropermia)
1	Sin movimiento progresivo, girando sobre su eje
2	Con movimiento anormal y algunos progresivos
3	Con movimientos progresivos lentos y sinuosos
4	Con movimientos progresivos rápidos
5	Con movimientos progresivos muy rápidos

Tomado de Espinosa H. S. Inseminación Artificial Editores Trujillo OM, Martínez GR, Herradora LMA. La Piara Reproductora. 1ª ED. México: Mundi-Prensa, 2002

---

**Concentración.-** La concentración espermática es variable, dependiendo de las características productivas y reproductivas presentes en la explotación. El promedio de concentración es de 300 millones de espermatozoides por ml. <sup>1</sup>

Para determinar esta variable se empleó la cámara de Neubauer, realizando una dilución 1:100 en una solución de citrato formol, de esta dilución se tomó con una pipeta de transferencia de plástico (Pirex) una gota y se depositó en dicha cámara. El conteo se realizó en un microscopio óptico con el objetivo de 40x y solamente se contaron los espermatozoides que se encontraron dentro de los cinco cuadros de cada cuadrante y que no presentaron alguna anomalía para obtener la concentración espermática por mililitro. <sup>1</sup>

**Anormalidades y daño acrosomal.-** En cuanto a las anomalías se permite un máximo de 25 % y de acrosomas normales mayor a 80 %. Esta evaluación se llevó a cabo por medio de un frotis teñido con Azul de Coomassie.

El procedimiento consistió en tomar una gota de semen fresco con una pipeta de transferencia (Pirex), se colocó en el extremo de una laminilla de vidrio atemperada a 37 °C y con otra laminilla, deslizando la gota, para obtener un frotis, el cual se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco el frotis, se sumergió en la tinción Azul de Coomassie durante cinco minutos, pasado este tiempo, se enjuagó con agua bidestilada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente. <sup>1,2</sup>

Después de determinar mediante la evaluación seminal que se cumplieran con los

---

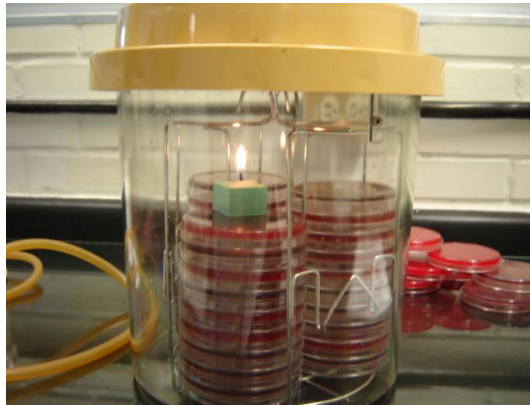
estándares mínimos, se realizó la dilución con los diluyentes MR-A<sup>®</sup> y XT-R<sup>®</sup>, obteniendo cuatro dosis seminales por cada diluyente a una concentración de 3,000 millones en un volumen final de 80 ml cada una.

Para evitar la modificación en la cantidad de bacterias, las muestras se trasladaron en una caja de poliuretano con refrigerantes al laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La evaluación seminal consistió en:

### **Aislamiento bacteriano**

Una vez en el laboratorio de las muestras de la primera etapa se tomaron se sembró todo el material muestreado para determinar si estaba estéril y descartar si no es la fuente de contaminación y alterar los resultados. De las muestras de la primera etapa se tomaron 50 µl de agua bidestilada, diluyente, semen fresco y de los hisopos, se sembraron en dos cajas con Agar Sangre (AS) y Mc Conkey (MC) por duplicado: un juego se incubó a 37 °C por 24 h en aerobiosis y el otro juego de cajas se depositó en una jarra de velobiosis (**Figura 5**), para proporcionar las condiciones de microaerofilia, incubándose durante 48 hrs, el periodo de incubación fue de 48 h.<sup>10,11 12</sup>



**Figura 5.** Jarra de velobiosis conteniendo cajas con agar sangre previamente sembradas con las muestras.

Una vez que se cumplió con el tiempo de incubación, las cajas se examinaron y al notar presencia de colonias bacterianas, se les realizó un frotis, los cuáles se tiñeron con la tinción de Gram para determinar el tipo de morfología y posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para determinar el género.<sup>13</sup> Se realizó el mismo procedimiento para las cuatro muestras de semen diluido que se conservaron a 18 °C y las cuatro a temperatura ambiente. La toma de muestras se hizo a las 24, 72, 120 y 192 horas, tomando 50 µl. Se realizaron tres muestreos con un intervalo de 15 días entre cada uno.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la descripción de las colonias, al realizar la tinción de Gram y realizar las bioquímicas según Cowan.<sup>14</sup> Para las bacterias Gram negativas se hicieron las siguientes bioquímicas: triple azúcar hierro (TSI), manitol indol producción de ácido sulfhídrico (SIM), citrato, urea y bioquímicas complementarias,

---

tales como Nitratos y Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP).

Después de la siembra se incubaron a 37 °C durante 24-48 hrs. en la estufa bacteriológica, posteriormente se realizó la lectura e identificación.

Para los bacilos Gram positivos se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: nitratos, oxidasa, catalasa, glucosa, maltosa, manitol, xilosa, lactosa, salicin, trealosa, urea y SIM. Después de la siembra se incubaron a 37 °C durante 24 hrs en la estufa bacteriológica para realizar la lectura e identificación correspondiente.

Para las bacterias sugerentes a *Staphylococcus spp.* se sembraron en Manitol Sal Agar (MSA), dependiendo de la utilización de manitol que al virar a color amarillo se sospechó de *Staphylococcus aureus*, comprobándose al realizar la prueba de coagulasa la cual fue positiva.

## **2ª Fase**

### **Procesamiento de laboratorio**

Para cada muestra de dosis seminal preparada con los diluyentes XT-R® y MR-A® se realizaron diluciones decuples seriadas colocando 1 ml de muestras en 9 ml de solución salina fisiológica (SSF) estéril con pH de 7, se homogenizó y transfirió 1 ml a otro tubo para hacer la dilución siguiente y así sucesivamente hasta el tubo con la dilución 1<sup>11, 15</sup>



---

A partir de cada dilución se tomaron 50 µl y se sembraron en agar sangre, agar Tripticasa Soya (ATS) y agar Mc Conkey por duplicado: una se incubó a 37 °C por 48 hrs en una jarra de velobiosis para proporcionar las condiciones de velobiosis <sup>15, 16</sup>, la otra muestra se incubó en condiciones aerobias para no interferir en los requerimientos del crecimiento bacteriano.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la descripción de las colonias, al realizar frotis y teñirlos con la tinción de Gram y realizar las bioquímicas según Cowan.<sup>14</sup> Para las bacterias Gram negativas se hicieron las siguientes bioquímicas: Triple Azúcar Hierro (TSI), Manitol Indol producción de Ácido Sulfhídrico (SIM), citrato, urea, oxidasa, catalasa y pruebas bioquímicas complementarias.

Después de la siembra se incubaron a 37 °C durante 24 hrs a en la estufa bacteriológica posteriormente se realizó la lectura e identificación.

Para las bacterias sugerentes a *Staphylococcus spp.*, se sembraron en MSA, dependiendo de la utilización de manitol, al virar a color amarillo se sospecho de *Staphylococcus aureus*, para comprobar que fuese *Staphylococcus aureus* se realizó la prueba de coagulasa la cual fue positiva.<sup>16, 17</sup>

---

## VI. RESULTADOS

Antes y después de la conservación de las dosis seminales se evaluaron sus características macroscópicas y microscópicas, obteniendo los siguientes resultados detallados en los siguientes cuadros:

**Cuadro 4.** Evaluación de dosis seminales antes de su conservación

MUESTRA	EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS SEMINALES MACROSCÓPICAS			EVALUACION DE CARACTERISTICAS SEMINALES MICROSCOPICAS					
	DOSIS SEMINAL	COLOR	OLOR	pH	MOTILIDAD	AGLUTINACION	VIGOR	CONCENTRACION	ANORMALIDADES
XT-R	normal	inoloro	7	80%	MODERADA	3	3,000,000,000	15	10
MR-A	normal	inoloro	7	85%	MODERADA	2	3,115,000,000	15	15

**Cuadro 5.** Evaluación de dosis seminales después de su conservación

MUESTRA	EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS SEMINALES MACROSCÓPICAS			EVALUACION DE CARACTERISTICAS SEMINALES MICROSCOPICAS					
	DOSIS SEMINAL	COLOR	OLOR	pH	MOTILIDAD	AGLUTINACION	VIGOR	CONCENTRACION	ANORMALIDADES
XT-R	normal	inoloro	7	80%	MODERADA	3	2,725,000,000	15	15
MR-A	normal	inoloro	7	75%	LEVE	2	2,420,000,000	15	20

En la primera etapa se determinó que los materiales utilizados para la colecta y procesamiento de las dosis seminales se encontraron libres de agentes bacterianos, ya que las muestras no mostraron presencia de crecimiento bacteriano (**cuadro 6**).

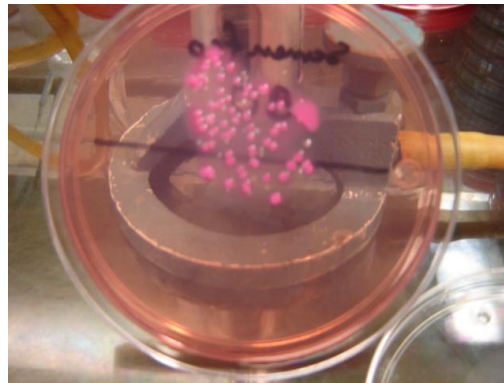
**Cuadro 6.** Resultados encontrados en los diferentes muestreos.

MUESTRA	Aerobiosis 24 h		Velobiosis 24 h		Aerobiosis 72 h		Velobiosis 72 h		Aerobiosis 120 h	Aerobiosis 192 h
	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	Velobiosis 120 h	Velobiosis 192 h
	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
Diluyente XT-R <sup>®</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diluyente MR-A <sup>®</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaso de precipitado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Matraz XT-R <sup>®</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Matraz MR-A <sup>®</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Termómetro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frasco para dosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bolsa para colecta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agua purificada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agua destilada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

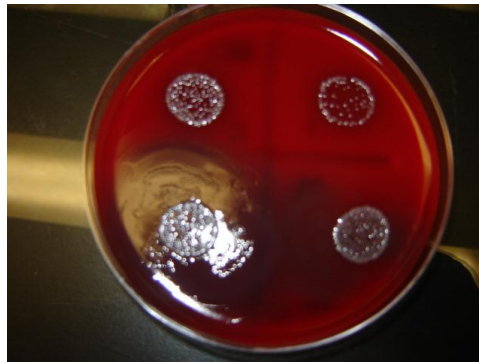
AS: Agar Sangre  
MC: Agar McConkey

---

En cuanto al semen fresco de los tres sementales muestreados, hubo crecimiento de colonias bacterianas identificadas como *E. coli* (**Figura 6**), *Klebsiella spp*, *Micrococcus spp*, *Proteus spp* (**Figura 7**). , *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.



**Figura 6.** Agar Mc Conkey con presencia de colonias sugestivas de *E. coli*.



**Figura 7.** Agar sangre con presencia de colonias sugestivas de *Proteus spp*.

Respecto a las dosis seminales se observó crecimiento bacteriano, las cuales se identificaron como: *Klebsiella spp*, *Micrococcus spp*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus* y

---

*Staphylococcus epidermidis*. En las dosis preparadas con el diluyente MR-A®, se observó el crecimiento de las siguientes colonias bacterianas: *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* en dichas dosis se mantuvo un crecimiento durante el tiempo de conservación (ocho días); en cuanto a las dosis preparadas con el diluyente XT-R® las colonias bacterianas encontradas fueron: *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus* y el crecimiento se detuvo a partir de las 72 horas de conservación **(Cuadro 7)**.

**Cuadro 7.** Bacterias aisladas durante el muestreo.

	Aerobiosis 24 h		Velobiosis 24 h		Aerobiosis 72 h		Velobiosis 72 h		Aerobiosis 120 h	Aerobiosis 192 h
	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	Velobiosis 120 h	Velobiosis 192 h
<b>Muestra</b>	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
<b>Semen fresco (Semental 30)</b>	<i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i>	<i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i>	<i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>
<b>Semen fresco (Semental 70)</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Klebsiella spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Klebsiella spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>
<b>Semen fresco (Semental 80)</b>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>
<b>Dosis XT-R®</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Dosis MR-A®</b>	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Proteus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> .	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	-

AS: Agar Sangre  
MC: Agar McConkey

Respecto al conteo de enterobacterias, se observó el crecimiento de 3 UFC en la muestra preparada con MR-A® el cuál se detuvo a partir de la sexta dilución, en la muestra preparada

con XT-R<sup>®</sup> se observó el crecimiento bacteriano de 3 UFC la cuál disminuyó en la segunda dilución a 2 UFC y deteniéndose a partir de la cuarta dilución (**cuadro 8**).<sup>17</sup>

**Cuadro 8.** Resultados en las diluciones décuples.

MUESTRA	DILUCIONES									
	1x10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>10</sup>
Dosis preparadas con XT-R <sup>®</sup>	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Dosis preparadas con MR-A <sup>®</sup>	3	3	2	1	1	-	-	-	-	-

---

## VII. DISCUSIÓN

En este estudio las muestras de semen fresco presentaron bacteriospermia, la cual, se presenta desde que se realiza la colecta del semen en el verraco donde se tienen efectos perjudiciales sobre la calidad y conservación del semen si ésta no se controla. Así lo demuestra **Althouse et al. 2004**, al realizar el examen bacteriano de rutina en 250 muestras donde el 71% de ellas dieron positivo determinando que la principal fuente de contaminación es el mal manejo del verraco al momento de realizar la colecta seminal, es por eso que se debe de seguir un buen procedimiento para mantener la higiene dentro de este proceso y un buen control antimicrobiano.

Las dosis seminales se conservaron a una temperatura de 17°C para mantener la viabilidad de las células espermáticas lo que concuerda con lo reportado por **Arlegui. 2007**, donde menciona que el intervalo de conservación de las dosis seminales es de 15-17°C, ya que por encima de éstas temperaturas (21°C) se producen alteraciones en la membrana citoplasmática de los espermatozoides y por debajo de 14° C aumenta el riesgo de shock térmico en las células espermáticas, considerando que en la especie porcina son sensibles por la composición de su membrana (fosfolípidos, ácidos grasos saturados e insaturados y colesterol). Por otra parte las dosis seminales conservadas a temperatura ambiente fue con la finalidad de permitir el crecimiento bacteriano y observar el efecto de los antibióticos contenidos en ambos diluyentes XT-R<sup>®</sup> y MR-A<sup>®</sup>.

Otro factor a considerar es que con la IA se creía que las infecciones bacterianas en el útero de la hembra disminuirían, sin embargo el descuido y falta de higiene en cada uno de los



---

pasos que intervienen en el proceso durante la IA ha producido un problema de descargas vulvares en algunas granjas, **Almond et al. 1996** demostraron lo contrario al experimentar con fertilizaciones in vitro.

La contaminación bacteriana reduce el éxito en los programas de ésta práctica interfiriendo a su vez en la fertilización. Una de las medidas para evitar al máximo la contaminación bacteriana es imprescindible masajear el divertículo prepucial para liberar el líquido del prepucio ya que contiene carga bacteriana que puede mezclarse con el semen fresco y la vulva de la cerda debe estar limpia y seca.

Las bacterias que se aislaron en semen fresco fueron *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Micrococcus spp.* y *Proteus spp.* lo cual coincide con los resultados obtenidos que reporta Althouse. et al .2004 donde trabajó con 250 muestras de semen porcino y compara los mismos resultados con los siguientes autores: Tamuli et al. , Danowski, Dagnall y Sone et al 1982. Encontrando los mismos generos bacterianos además de *Enterococcus spp.*, *S. maltophilia*, *A. xilosoxidans*, entre otras.

Diversos estudios indican que los productos metabólicos como las endotoxinas de algunas bacterias tienen efectos detrimentales para la sobrevivencia del espermatozoide, por lo que la cantidad de células espermáticas viables se ve reducida, por lo tanto la calidad de las dosis seminales se ve comprometida ya que aumenta el crecimiento bacteriano al mismo tiempo que se almacenan las dosis por periodos largos de tiempo antes de su uso lo que puede actuar como un periodo de incubación, lo cual fue demostrado por **Almond G. et al 2001**, al incubar 250 muestras de semen, de las cuales solo el 14% de ellas controlaron el crecimiento bacteriano sin afectar la calidad de la dosis.

---

Una vez que prolifera el crecimiento bacteriano, éste impide la motilidad de las células espermáticas por la adhesión y la aglutinación que las bacterias desencadenan al adherirse a la superficie de los espermatozoides, esto se traduce en la incapacidad de fertilización de acuerdo a los resultados obtenidos al realizar la contaminación seminal in vitro de *E. coli* y monitorear el comportamiento de las células espermáticas en varios ensayos de los cuales **Monga M. et al 1994**, determinaron la influencia bacteriana sobre la habilidad de la motilidad; la cuál es indispensable para lograr una fertilización con éxito.

Entre las bacterias encontradas en la muestra de semen fresco fueron *E. coli*, resultado que coincide con lo reportado por **Althouse et al. 2004**, donde el 66% de los 250 casos estudiados se aisló dicha bacteria.

El comportamiento del diluyente XT-R<sup>®</sup> detuvo el crecimiento bacteriano a las 24 hrs de conservación, lo cual probablemente se debe a que contiene una mezcla de cuatro antibióticos de los que en su mayoría son aminoglucósidos, los que trabajan de forma eficiente a 17 °C, inhibiendo el desarrollo bacteriano y a su vez contiene antioxidantes que retardan las aparición de alteraciones no deseadas en la estructura y función de las membranas plasmáticas de los espermatozoides, manteniendo su integridad lo que es fundamental para la viabilidad espermática. Lo anterior concuerda con lo reportado por **Sone M. 1982**, al realizar un estudio durante la conservación de dosis seminales en un periodo de 4-5 días y evaluar las características que determinan su viabilidad.

---

## VIII. CONCLUSIONES

El diluyente de larga duración XT-R® detuvo el crecimiento bacteriano a partir del tercer día en las dosis seminales y mantuvo las características seminales dentro de los parámetros normales en un periodo de 5 días a una temperatura de 17°C.

El diluyente MR-A® mantuvo las características seminales normales en un periodo de 5 días a una temperatura de 17°C, sin embargo no detuvo el crecimiento bacteriano, además se observó la presencia de *Proteus spp* durante el tiempo de conservación.

---

## **IX. LITERATURA CITADA**

1. Espinosa H. S. Inseminación Artificial Editores Trujillo OM, Martínez GR, Herradora LMA. La Piara Reproductora. 1ª ED. México: Mundi-Prensa, 2002: 165-186.
2. Rodríguez Jiménez E. Comparación de las características motilidad, anormalidades y daño acrosomal en semen diluido de verraco, empleando dos diferentes tipos de diluyente de larga duración (tesis licenciatura). México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
3. Arlegui González R. Principales puntos críticos en un centro de Inseminación. Departamento Técnico Magapor S.L. 2007.
4. Pineda Y. Santander J. Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. Zootecnia Tropical. Venezuela, 2007.
5. Gary C. Althouse, Kristina G. Lu. Bacteriospermia in extended porcine semen. Theriogenology 2004; 573-584.
6. Manoj M, Roberts J. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. Department of Urology School of Medicine, Louisiana. 1994.
7. PIC México. Contaminación del Semen porcino. Inseminación Artificial. 2006 Sep 18: 8 pág. Disponible en <http://www.pic.com>. 2000-2003.
8. Althouse GC, Kuster CE, Clark SG and Weisiger. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Theriogenology 1999; 1167-1176.

- 
9. Australian Quarantine and Inspection Service. Porcine semen import risk analysis. Technical Issues Paper. April 1999.
  10. Almond, Poolperm. Semen contamination and choosing antibiotics. Collage of Veterinary Medicine North Carolina State University. 1996.
  11. Quinn PJ, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. London, Great Britain:Wolfe, 1994.
  12. Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984.
  13. Mac Feddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México, D.F.: Panamericana, 1991.
  14. Cowan ST. Manual for the identification of medical bacteria. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press , 1974.
  15. Ramírez HG. Evaluación microbiológica de excretas porcinas solidas y frescas de 10 granjas ubicadas en la región central de México (tesis de maestría). México, D.F. FMVZ, UNAM, 2002.
  16. Carter GR. Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinarias. Zaragoza, España: Acribia. 1969.
  17. Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of sistematic Bacteriology. Vol2. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984.
  18. Sone M. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. Veterinary Record 111: 11-14, 1982.