

Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela

Yuraima Pineda* y Jorge Santander

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal. Apartado Postal 70. Maracay 2101, Aragua. Venezuela. *Correo electrónico: ypineda@inia.gob.ve

RESUMEN

Se realizaron estudios bacteriológicos de 226 muestras de semen de verracos sanos utilizados como reproductores procedentes de cinco granjas porcinas provenientes de dos estados de Venezuela. La evaluación bacteriológica del semen fresco y diluido indico la presencia de una amplia variedad de géneros bacterianos entre flora normal y potencialmente patógena. *E. coli* fue la bacteria más frecuentemente aislada seguida por *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp. β hemolítico*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos aislados fueron resistentes a los antimicrobianos utilizados en los diluentes comerciales de semen.

Palabras clave: Flora bacteriana, semen, cerdos, contaminación

Evaluation of bacterial flora of boar semen in pig farms in Venezuela

ABSTRACT

A bacteriological study was performed on 226 semen samples from healthy boars collected from five pig farms in two Venezuelan states. The evaluation of fresh and diluted semen showed a wide variety of bacteria range from normal and potentially pathogenic flora. *E. coli* was the most common bacteria isolated, followed by *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp. β hemolytic*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The bacteria were found to be resistant to the antimicrobials normally used in commercial diluents semen.

Keywords: Bacterial flora, semen, boars, contamination.

INTRODUCCIÓN

Los testículos y las glándulas sexuales accesorias de los verracos sanos son libres de bacterias. Sin embargo, los genitales externos transportan diferentes microorganismos. Aunque la mayoría de ellos son parte de la microflora normal también existen bacterias oportunistas o patógenos potencialmente capaces de producir infecciones genitales en hembras susceptibles y disminuir la sobrevivencia y capacidad fecundante de las células espermáticas (Almond y Poolperm, 1996; Sone *et al.*, 1982).

La contaminación bacteriana del eyaculado es inevitable y puede considerarse un componente natural del mismo. Esta contaminación puede deberse a una infección del tracto urogenital del macho o provenir del ambiente, personal y del agua utilizada para la preparación del diluyente de semen en casos de inseminación artificial. Se considera anormal cuando el conteo de bacterias por mililitro sobrepasa los 1×10^4 o cuando una bacteria específica logra sobrevivir en el semen (Althouse, 1999; Martínez, 1998).

La respuesta de la hembra en los casos donde el semen contiene bacterias potencialmente patógenas

dependerá de la condición de los mecanismos de defensa uterina, directamente relacionados con la actividad hormonal cuyo efecto inmunoestimulante determina el establecimiento o no del proceso infeccioso. Es frecuente observar que las infecciones bacterianas del útero en las cerdas son frecuentes cuando se realiza la monta en etapas tardías del estro. Otras condiciones que influyen en la aparición de cuadros infecciosos en las hembras va a depender de la dosis y virulencia de la bacteria involucrada, excesiva contaminación bacteriana puede resultar en problemas de infertilidad (Alexopoulos *et al.*, 2003; Althouse, 1999; Martínez, 1998; Sone *et al.*, 1989; Wongtawan *et al.*, 2006).

En el caso de semen diluido criopreservado, la contaminación bacteriana suele producir efectos negativos sobre los espermatozoides. Los componentes nutritivos utilizados en los diluentes de semen favorecen el desarrollo y supervivencia de las bacterias, lo que trae como consecuencia acumulación de toxinas y productos del metabolismo bacteriano. Los productos metabólicos como endotoxinas y metabolitos ácidos que estos contaminantes producen tienen un efecto espermicida directo (Almond y Poolperm, 1996; Althouse *et al.*, 2000; Althouse y Lu, 2005; Bielanski *et al.*, 2003; Sone *et al.*, 1989; Thacker *et al.*, 1984).

Dentro de las bacterias que se consideran en un momento determinado patógenas y se encuentran en el semen de forma frecuente están: *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, y *Actinomyces suis*. Menos frecuentes están *Lestospira spp.*, *Brucella suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella spp.*, *Mycoplasma*, *Actinobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Aerobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Salmonella spp.*, y *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Althouse, 1999; Martínez, 1998).

El presente estudio se realizó con el objetivo de conocer la flora bacteriana del eyaculado y del semen diluido criopreservado de verracos utilizados como reproductores en granjas porcinas de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron un total de 226 muestras de semen, 131 de semen fresco (eyaculado) y 95 de semen

diluido y criopreservado. Las muestras procedían de verracos aparentemente sanos, utilizados regularmente como reproductores de cinco granjas porcinas ubicadas en dos estados de Venezuela donde se concentra la mayor población porcina nacional. Estas granjas reportaron en sus cerdas descargas vaginales repetidas.

Previo a la monta, se recolectaron de 2 a 3 mL de semen fresco y posterior a su dilución, igual cantidad. La toma de la muestra se realizó de manera aséptica. Se procedió a la limpieza de la zona, estimulación del verraco y se descartó la primera porción del eyaculado, para posteriormente recolectar la muestra en envases estériles, luego fue separada una porción para diluir y conservar las dosis de inseminación. La totalidad de las muestras de semen fresco y diluido fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio para su posterior procesamiento. Las muestras de semen diluido se mantuvieron refrigeradas y fueron procesadas con la finalidad de evaluar la actividad del antimicrobiano del diluyente sobre la flora bacteriana presente.

La composición del antimicrobiano indicada en los sobres del diluyente comercial de semen era especificada como aminoglucósidos y gentamicina antimicrobiano que también forma parte del tipo de los aminoglucósidos.

Estudio bacteriológico

El análisis bacteriológico se realizó por siembra directa de las muestras en agar tripticosa soya adicionado de 5% de sangre ovina, agar Mac Conkey, agar *Salmonella shigella* y caldo tioglicolato. Estos medios fueron incubados en aerobiosis y microaerofilia por 1 a 3 días a 37°C. Las muestras que no revelaron crecimiento en 72 h de incubación fueron consideradas negativas.

La metodología para aislamiento e identificación bacteriana siguió los procedimientos convencionales de diagnóstico bacteriológico (Koneman *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de células bacterianas en los eyaculados alcanzó un promedio de $3,5 \times 10^5$ ufc/mL, sobrepasando los límites establecidos. Sin embargo, la limpieza externa de la zona previa a la toma de las muestras pudo haber contribuido a una disminución

en la contaminación del eyaculado, tal como ha sido expresado por otros autores (Althouse, 1999; Thacker *et al.*, 1984; Tonioli *et al.*, 2002). Se ha comprobado el efecto negativo del aumento de la concentración bacteriana sobre la motilidad espermática de esta manera eyaculada que presentan menores índices de contaminación bacteriana, lo que permite obtener mejores resultados de fertilidad (Bennemann *et al.*, 1999).

Los agentes bacterianos aislados de semen fresco y diluido aparecen señalados en el Cuadro 1. En el eyaculado, *E. coli* (33,6%) fue la bacteria más frecuentemente aislada, seguida por *Staphylococcus epidermidis* (28,1%), *Proteus vulgaris* (10,3%), *Streptococcus spp. β hemolitico* (5,5%), *Staphylococcus aureus* y *S. intermedius* (5,5%) y

Pseudomonas aeruginosa (4,8%). En semen diluido, *Staphylococcus epidermidis* (35,1%), *E. coli* (24,6%), *Staphylococcus aureus* (14,0%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,8%), *Bacillus spp.* (7,0%) y *Streptococcus spp. β hemolitico* (5,3%).

Una amplia variedad de géneros bacterianos fueron aislados, 9 géneros en el eyaculado y 7 en el semen diluido. En el eyaculado se observó un predominio (74%) de cultivos bacterianos puros sobre el desarrollo en cultivos mixtos o asociaciones bacterianas. El 12,9% exhibieron dos o más géneros bacterianos y en 12,9% de las muestras no hubo desarrollo bacteriano. Igualmente, para el semen diluido se observó predominio de cultivos bacterianos puros (Cuadro 2).

Cuadro 1. Bacterias presentes en el eyaculado (n=146) y en el semen diluido (n=57) de verracos.

Géneros bacterianos	Eyaculado	%	Semen diluido	%
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0,7	0	
<i>Bacillus spp.</i>	4	2,7	4	7,0
<i>Corynebacterium spp.</i>	1	0,7	1	1,8
<i>Escherichia coli</i>	49	33,6	14	24,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0,7	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,7	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	15	10,3	2	3,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	4,8	5	8,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	5,5	8	14,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41	28,1	20	35,1
<i>Staphylococcus intermedius</i>	8	5,5	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	2	1,4	0	0
<i>Streptococcus spp. B hemolítico</i>	8	5,5	3	5,3

Cuadro 2. Relación entre muestras en cultivos puros, mixtos y sin desarrollo presentes en el eyaculado (n=131) y en el semen diluido (n=95) de verracos.

Tipo de cultivo	Eyaculado	%	Semen diluido	%
Cultivo Puros	97	74,0	51	53,6
Cultivo Mixtos	17	12,9	9	9,4
Sin Desarrollo Bacteriano	17	12,9	35	36,8

De los aislados del eyaculado, la mayoría correspondió a bacterias Gram negativas (50,7%) y en menor proporción a Gram positivas (49,3%), patrón que coincide con lo reportado por otros autores (Althouse, 1999; Althouse *et al.*, 2000).

Entre los géneros más frecuente aislados del eyaculado de los verracos, *E. coli*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas aeruginosa* han sido relacionados con procesos piométrales en cerdas inseminadas artificialmente en periodos fuera del estro con semen contaminado con estos agentes (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 descargas e infertilidad de la hembra.

En semen diluido, los aislados presentes en mayor frecuencia fueron *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus spp. β hemolitico*. Existe información que indica que los componentes nutritivos de los diluentes facilitan la sobrevivencia y multiplicación de las bacterias en el semen diluido, incluso a las temperaturas de conservación recomendadas. Se combina a esto, la resistencia de las bacterias a los antimicrobianos presentes en el diluyente (Almond y Poolperm, 1996; Althouse *et al.*, 2000; Toniolli *et al.*, 2002), lo que indudablemente condicionaron la supervivencia de éstas bacterias en las muestras de semen diluido analizadas.

La bacteriospermia es un hallazgo frecuente en el semen diluido y puede resultar en detrimento de la longevidad y calidad del semen, si esta no es controlada (Althouse y Lu, 2005). Aunque la inseminación artificial ofrece a los productores posibilidades de difusión del mejor material genético, los procesos de recolección, dilución e inseminación deben ser realizados conservando las mejores condiciones higiénicas con el fin de evitar la contaminación bacteriana que puede interferir y afectar la fertilización (Martínez, 1998; Thacker *et al.*, 1984; Toniolli *et al.*, 2002)

La supervivencia de algunos aislados en el semen diluido nos indica que las bacterias son resistentes a los agentes antimicrobianos incorporados en el diluyente. Los aminoglucósidos son la clase de antimicrobianos más populares utilizados en los diluentes de semen y dentro de estos, la gentamicina (Althouse y Lu, 2005; Mazurova y Vinter, 1991; Sone

et al., 1982). Sin embargo, hay referencias de algunas bacterias que contaminan el semen que han creado resistencia a este antimicrobiano (Althouse, 1999; Althouse *et al.*, 2000; Althouse y Lu, 2005). Lo recomendable es evaluar la contaminación en cada explotación mediante un control bacteriano rutinario del semen para tomar la decisión adecuada acerca de que antimicrobiano utilizar.

Aunque el rol dañino de la contaminación bacteriana del semen no ha sido completamente evaluado, varias investigaciones sugieren que la fertilización se reduce en presencia de bacterias potencialmente patógenas en el semen y la infección de los oviductos es común en hembras con endometritis después de la monta natural. Sin tomar en cuenta, sí la contaminación bacteriana reduce la calidad del semen, interfiere con la fertilización o causa infecciones uterinas, debemos estar claros que el semen infectado reduce todas las posibilidades de éxito de un programa de inseminación artificial (Almond y Poolperm, 1996).

CONCLUSIONES

1. La contaminación bacteriana de un eyaculado de verraco debe ser asumida como un inconveniente, tanto para el proceso de monta natural, como para la inseminación artificial.
2. Es necesaria la aplicación de un protocolo de mínima contaminación durante la recolección y procesamiento del semen.
3. El control bacteriano rutinario del eyaculado y semen diluido, así como la utilización de antimicrobianos de calidad en los diluentes de semen en una explotación porcina, contribuyen a mejorar su calidad.
4. Todas estas consideraciones contribuirán al aumento de la productividad en la explotación.

LITERATURA CITADA

Alexopoulos C., G.C. Fthenakis, A. Burriel, E. Bourtzi-Hatzopoulou, S.K. Kritas, A. Sbiraki, S.C. Kyriakis. 2003. The effects of the periodical use of in-feed chlortetracycline on the reproductive performance of gilts and sows of a commercial pig farm with a history of clinical and

- subclinical viral and bacterial infections. *Reprod. Domest. Anim.*, 38(3): 87-192.
- Almond G. y P. Poolperm. 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 G.C. 1999. Orígenes y efectos de la contaminación microbiológica en el semen porcino conservado. *Anaporc*, 192: 83-93.
- Althouse G.C., C.E. Kuster, S.G. Clark y R.M. Weisiger. 2000. Field investigation of bacterial contaminants and their effects extended porcine semen. *Theriog.*, 53(5):1167-1176.
- Althouse G.C. y K.G. Lu. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriog.*, 63(2): 573-584.
- Bennemann P.E., F.P. Bortolozzo, I. Wentz y M. Cardozo. 1999. Motilidade espermática e integridade accrossomal em doses de semen suino refrigeradas e inoculadas com *E. coli* e *S. aureus*. IX Congresso Brasileiro do Veterinários Especialistas em Suínos. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos. Belo Horizonte, Brasil. pp. 309-310.
- Bielanski A., H. Bergeron, P.C. Lau y J. Devenish. 2003. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryob.*, 46(2): 146-152.
- Conza L.B., S.E. Calle, L.C. Echevarria, N.P Falcón y M.C. Cerón. 2004. Evaluación bacteriológica de semen de verracos usados como reproductores en granjas porcinas de la zona de Turín, Lima. *Rev. Invest. Vet. Perú*, 15(2):163-165.
- Koneman E.W., S.D. Allen, W.N. Janda, P.C. Schreckenberger y W. Winn. 2001. Diagnóstico Microbiológico. 5^{ta} ed. Medica Panamericana. Argentina.
- Martínez R. 1998. Principales factores que afectan la reproducción del cerdo. *Rev. Ciencia Vet. Mexico*, 8: 187-222.
- Mazurova J. y P. Vinter. 1991. The effect of selected antibiotics on microorganisms contaminating boar ejaculate. *Vet. Med.*, 36(4): 213-223.
- Sone M., K. Ohmura y K. Bamba. 1982. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet. Rec.*, 111(1): 11-14.
- Sone M., T. Kawarasaki y A. Ogasa. 1989. Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35: 159-164.
- Thacker B.J., R.E. Larsen, H.S. Joo y A.D. Leman. 1984. Swine diseases transmissible with artificial insemination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 185(5): 511-516
- Tonioli R., R.F. Ferreira, P.J. Capibaribe, D.B. Queiroz y B.S. Sampaio. 2002. Diferentes tipos de higienización del verraco y su influencia sobre la calidad bacteriológica del eyaculado. *Rev. Prod. Anim.*, 13(2): 81-84.
- Wongtawan T., F. Saravia, M. Wallgren, I. Caballero y H. Rodríguez-Martínez. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriog.*, 65(4): 773-787.