

Diferentes tipos de higienización del verraco y su influencia sobre la calidad bacteriológica del eyaculado

Ricardo Toniolli, Robério Ferreira Fiúza, Paola Capibaribe Jatahy, Daniel Queiroz Barros y Breno Sampaio Santos
Laboratorio de Reproducción Porcina y Tecnología del Semen. Facultad de Veterinaria. Universidad Estadual de Ceará, Brasil

RESUMEN

El semen de cuatro cerdos reproductores fue extraído una vez por semana durante 10 semanas. Diluido en agua de coco sin antibiótico, se conservó en refrigeración a 17 °C durante 192 horas, y fue inoculado en placas de Petri con agar nutriente, a 37 °C. Toda la cristalería fue esterilizada previamente. Los tratamientos fueron: A= Lavado interno y externo del prepucio; B= Sin limpieza del prepucio y C= Lavado externo del prepucio (lote control). El uso solo del lavado externo del prepucio mostró el mejor resultado para la calidad bacteriológica del semen, con la media de 16 % del total de colonias contadas y una cantidad de colonias de bacterias más pequeña que los otros tratamientos ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Después de las primeras 24 horas de conservación, el tratamiento con el lavado interno del prepucio, presentó un número medio de colonias bastante alto ($9,5 \times 10^5$ UFC/mL). Después de 192 horas de conservación del semen en refrigeración a temperatura de 17 °C, se constató un decrecimiento en el número de colonias en todos los tratamientos. No obstante, en el tratamiento que consistió solamente en el lavado externo, el número de colonias de bacterias fue significativamente más pequeño ($P < 0,05$). Con la utilización solamente del lavado externo del prepucio, es posible una disminución de la contaminación del eyaculado con una cantidad más pequeña de UFC/mL en las placas inoculadas.

ABSTRACT

Semen from four boars was collected once a week for ten weeks. The semen diluted in coconut water without antibiotics was preserved at 17 °C for 192 hours and inoculated in Petri dishes with agar at 37°C afterwards. All lab instruments used were previously sterilized. Treatments applied were: A. washing of internal and external parts of genitals, B. No previous washing of genitals, C. Only external cleaning of genitals (control group). External cleaning of genitals proved to be the best treatment to obtain higher bacteriological quality of semen, with an average value of 16% out of the total counted colonies and a number of colonies with smaller bacteria compared to the other treatments ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL). The treatment consisting in internal cleaning of genitals showed an average number of colonies rather high ($9,5 \times 10^5$ UFC/mL) after being preserved for 24 hours. Semen preserved at 17°C showed a decrease in colony number after 192 hours in all treatments. However, the treatment consisting in external cleaning of genitals showed a significant low number of bacteria colonies ($P < 0,05$). Taking into account the above results, the external cleaning of genitals proved to be a better treatment to diminish semen contamination with a lower quantity of UFC/mL in the inoculated Petri dishes.

PALABRAS CLAVE: semen, verraco, calidad bacteriológica, contaminación

INTRODUCCIÓN

La técnica de la inseminación artificial ofrece a los criadores posibilidades de difusión y progreso del material genético. Por otro lado disminuyen los riesgos del problema sanitario, toda vez que reduce el número de reproductores (Madec, 1987); así y todo existe todavía un pequeño riesgo de contaminación con el propio semen en las dosis inseminantes (Thacker *et al.*, 1984; Connor *et al.*, 1984; Trayer, 1996).

La temperatura y el tiempo de almacenamiento del semen no impiden la multiplicación bacteriana en las dosis; así, se afecta la viabilidad de los espermatozoides, por el aumento de metabolitos bacterianos (Sone *et al.*, 1982), competición por el mismo sustrato (Rideout *et al.*, 1982), además de provocar defectos en la membrana celular (Diemmer *et al.*, 1996). Según Sánchez (1993) solamente la fracción rica del eyaculado debe ser usada después de la conservación del mismo por largos períodos, pues posee una menor contaminación.

Las secreciones prepuciales no deben tener contacto con el semen, evitación que permitirá la obtención de un eyaculado menos contaminado (Bortolozzo y Wentz, 1995; 1997). El semen obtenido en granjas y

preparado allí, está más sujeto a la contaminación bacteriana, e influye negativamente en la fertilidad (Madec, 1986). Varios son los factores que pueden intervenir en la calidad del semen, tales como: falta de higienización del reproductor previa a la extracción, método de extracción, y la acción mal conducida (Althouse *et al.*, 1998).

Waltz *et al.* (1968) plantean que conseguir un eyaculado libre de contaminación es prácticamente imposible, pues la misma ocurre principalmente durante la extracción (Bennemann *et al.*, 1997).

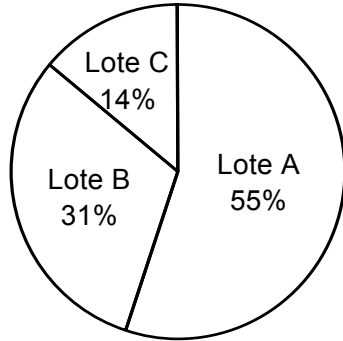
Cuando no son tomadas en cuenta las medidas se pueden presentar los problemas citados, por eso el objetivo de este trabajo fue evaluar cuantitativamente la flora bacteriana presente en el semen diluido de reproductores porcinos, según el método de higienización en el momento previo a la obtención del semen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del semen

El semen de cuatro verracos fue extraído una vez por semana durante 10 semanas a través de la técnica de la mano enguantada, en recipiente plástico (500 mL) protegido por vaso isotérmico.

Fig. 1. Proporción del número de colonias de bacterias después de 24 h de conservación del semen entre 15 y 17 °C



Tratamiento del semen:

Después de cada extracción se midió la concentración, volumen, total de espermatozoides y la temperatura del semen. El semen ya diluido en agua de coco sin antibiótico (1 mL de semen en 9 mL de diluyente), fue conservado en frío entre 15 y 17 °C durante 8 días, dentro de tubos de ensayo, en condiciones anaeróbicas. Las inoculaciones en placas de Petri se hicieron con semen de dos periodos distintos de conservación: 24 y 192 horas. La cristalería fue previamente esterilizada en estufa a 180 °C durante dos horas. Se formaron tres lotes:

Lote A: Lavado interno del prepucio, (se utilizó una pipeta con agua destilada) y externo con agua tratada y toallas de papel desechables.

Lote B: Sin limpieza previa del prepucio. El animal venía directamente para la sala de extracción.

Lote C: Lavado externo del prepucio con agua corriente (tratada) y uso de toallas de papel desechables (control).

Inoculación y lecturas

Se utilizaron placas de Petri estériles con agar nutriente (10 mL) para verificar el nivel de contaminación de los eyaculados, mediante el conteo de colonias presentes. Las placas se pusieron en estufa a 37 °C con 24 horas de antelación a la inoculación, para eliminar la

humedad. El semen fue rediluido en 9 mL de diluyente de agua de coco hasta 10⁴. De esta última se retiró un volumen de 0,1 mL de semen para la inoculación de las placas, y se realizaron movimientos circulares para que el semen se esparciera de forma homogénea por la placa. Las inoculaciones fueron realizadas con micropipetas asépticas con acceso a un mechero Bunsen y seguidamente se incubaron a 37 °C por un tiempo de 48 horas. Después de este período, se hizo conteo de colonias de bacterias por placa, y el resultado se expresó en UFC/placa (N).

Cálculo del número del total de colonias por mL de semen

El número de colonias (N) encontrado en cada placa, se multiplicó por el inverso de la dilución del semen (D=104) y también por el inverso del volumen utilizado en la inoculación de cada placa (I=101) con el resultado en UFC/mL. De esta forma tenemos la siguiente fórmula: número total de colonias por mL de semen (X): $X = N \times D \times I = x \ 105 \text{ UFC/mL de semen.}$

Análisis estadístico

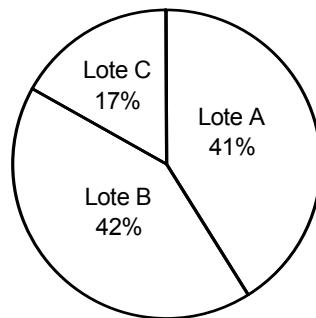
Los resultados fueron expresados por las medias y desviaciones estándares para cada tratamiento. El análisis entre las medias se realizó por un ANAVA multifactorial por el programa STATVIEW y el test de student. Los resultados expresados en por cientos, fueron analizados por chi-cuadrado corregido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El lote C con lavado externo obtuvo un mejor resultado de calidad bacteriológica del eyaculado, con apenas 14 % de colonias en las primeras 24 horas (Figura 1) y de 17 % a las 192 horas (Figura 2) de conservación del semen. Estos resultados fueron significativamente mejores (P<0,05) con relación al resto de los otros lotes experimentales. Curiosamente el lote sin limpieza de prepucio tuvo mejor calidad bacteriológica que el lote A.

Debido al menor número de colonias de bacterias en el lote B en relación con el lote A, se supone que esta manipulación de la parte interna del prepucio del verraco, favoreció una mayor diseminación de las bacterias presentes en ese lugar, permitiendo un aumento de la contaminación del eyaculado. Estas observaciones están acordes con las afirmaciones de Bortolozzo *et al.* (1999), que verificaron la influencia de varios

Fig. 2. Proporción del número de colonias de bacterias después de 192 h de conservación del semen entre 15 y 17 °C



factores, desde la extracción hasta el almacenamiento del semen. Estos mismos resultados los reportan Althouse *et al.* (1998).

De acuerdo con el número medio de colonias por placa, se observó que en las primeras 24 horas de conservación, el tratamiento con lavado interno presentó un número medio bastante elevado ($9,5 \times 10^5$ UFC/mL) en relación con el tratamiento sin lavado ($5,5 \times 10^5$ UFC/mL) ($P < 0,05$).

El lote donde fue realizado el lavado externo, presentó un número menor de colonias ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) (Figura 3). Este trabajo muestra una variación del número de UFC/mL cuatro veces mayor, en dependencia del método de higienización utilizado.

Madec y Varmnier (1989) encontraron una variación 6 veces mayor en el contenido de UFC/mL después de 48 horas de conservación del semen.

Autores como Bennemann *et al.* (1997) reportan variaciones mayores, atribuidas a diferentes métodos de extracción e higiene de los animales.

Después de las 192 horas de conservación del semen a 17°C , se verificó que ocurrió una disminución en las colonias en todos los tratamientos, o sea $4,1 \times 10^5$ UFC/mL para el lote con lavado interno; $1,7 \times 10^5$ UFC/mL para el lote con lavado externo y $4,3 \times 10^5$ UFC/mL para el lote sin lavado. A pesar de esto, después de este decrecimiento con el uso del lavado externo del prepucio, el número de colonias de bacterias fue significativamente menor ($1,7 \times 10^5$ UFC/mL) ($P < 0,05$) con respecto a los lotes A y B con $4,1 \times 10^5$ y $4,3 \times 10^5$ UFC/mL respectivamente (Figura 3).

Este decreciente desarrollo bacteriano durante el período de conservación del semen, fue observado por Bennemann *et al.* (1999), lo cual está relacionado con las modificaciones del medio diluyente durante este período (Chansilpa, 1987). Según Shelby y Foley (1966) este hecho se explica por un posible efecto antimicrobiano ejercido por el plasma seminal. En este trabajo el diluyente no tenía ningún antibiótico, hecho este que coincide con los planteamientos de los autores antes citados.

Todos los cuidados que deben tomarse, desde la preparación del verraco para la extracción del semen hasta su manipulación en el laboratorio, son extremadamente importantes para disminuir la contaminación bacteriana del eyaculado. Teniendo en consideración la alta temperatura de conservación del semen porcino (17°C), que no inhibe la multiplicación de bacterias, una consecuencia común es la acumulación de toxinas y productos del metabolismo bacteriano que disminuyen la supervivencia y capacidad fecundante de los nemaspermios (Bennemann, 1997). (Bortolozzo y Wentz, 1998).

Se observó que solo al lavar externamente el prepucio, se disminuye la carga bacteriana del semen obteni-

do, con una menor cantidad de UFC/mL, lo cual permite una mayor conservación.

Trabajos de Bennemann *et al.* (1999) comprobaron el efecto negativo del aumento de la concentración bacteriana sobre la motilidad espermática; de esta manera, eyaculados que presenten menores índices de contaminación bacteriana permitirán obtener mejores resultados de fertilidad.

CONCLUSIONES

- Una menor manipulación del prepucio del verraco en la etapa previa a la extracción del semen, está directamente relacionada con una menor contaminación del eyaculado.
- Un lavado externo del prepucio antes de la extracción es una práctica contraindicada en la higienización del reproductor; de cualquier forma, es necesaria para disminuir el número de colonias bacterianas en la dosis de inseminación.

REFERENCIAS

- ALTHOUSE, G. C.; C. KUSTER Y S. G. CLARK: Contaminant growth of spermicidal bacteria in extender porcine semen. In: Congress of International Pig Veterinary Society. 15., 1998, Birginghan, Proceedings International Pig Veterinary Society, p.37, 1998.
- BENNEMANN, P.E.; F.P. BORTOLOZZO, M. CARDOSO, I., WENTZ: Bacteriologia do sêmen de suínos mantidos em centrais de inseminação artificial no sul do Brasil. In: VIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, p.309-310, 1997.
- BENNEMANN, P. E.; F. P. BORTOLOZZO, I. WENTZ Y M. CARDOSO: Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com *E. coli* e *S. aureus*. In: IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, p.p. 309-310, 1999.
- BORTOLOZZO, F. P. E I. WENTZ: Incremento da eficiência reprodutiva em programas de inseminação artificial (IA) no suíno. In: XI Congresso Brasileiro de reprodução Animal, Belo Horizonte. v.1, p. p. 131-141, 1995.
- BORTOLOZZO, F. P. E I. WENTZ: Sucesso de um programa de IA em suínos. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 21 (3):15-21, 1997.
- BORTOLOZZO, F. P. E I. WENTZ: Viabilidade técnica e econômica da inseminação artificial (IA) em suínos: pontos críticos da IA. In: 3^o Seminário Internacional de Suinocultura, São Paulo. v.1, p. p.101-112, 1998.
- BORTOLOZZO, F. P.; C. P. DIAS, C. D. CASTAGNO, G. R. REIS, R. SIMONETTI, I. WENTZ Y M. CARDOSO: Contaminação bacte-

- riana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta In: IX Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em Suínos, Belo Horizonte. v.1, p.p. 335-336, 1999.
- CHANSILPA, T.: Die Bedeutung von Keimgehalt und antibiotikazusatz für die Haltbarkeit von Schweinefrischsperma bei +15 °C. Hannover, 99 p., 1987. (Tese. Doctor Medicinæ Veterinariæ).
- CONNOR, J. F.; W. T. CHRISTIANSON Y C. E., GLOSSOP: Biosecurity of gene dissemination through semen. In: International Pig Veterinary Society Congress, 13, Bangkok, p. 367, 1984.
- DIEMMER, T.; W. WEIDNER, H. W. MICHELMANN, H. G. SCHIEFER, E. F. ROVAN Y E. F. MAYER: Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. International Journal of Andrology, 19 (5):271-277, 1996.
- MADEC, F.: Étude de certaines caractéristiques bactériologiques de la semence de verrat, utilisée en insémination artificielle. Journées de Recherche Porcine en France, 19:91-98, 1987.
- MADEC, F.: Approche épidémiologique des troubles de la fécondité chez la truie en élevage intensif. Rennes, 111 p.p., 1986 (Thèse de Doctorat).
- MADEC, F. Y P. VARNNIER: La contamination de la semence du verrat: risques encourus et règles à respecter. Le Point Vétérinaire, 21 (121): 234-247, 1989.
- RIDEOUT, M. I.; S. J. BURNS Y R. B. SIMPSON: Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility, suppl. 32: 35-40, 1982.
- SANCHEZ, R. S.: Inseminación artificial de porcinos, en: Curso Internacional de Reproducción Animal, Madrid, v.16, p.p. 1-8, 1993.
- SHELBY, D. R. Y C. W. FOLEY: Influence of carbon dioxide absorbent on the consumption of oxygen by boar spermatozoa. Journal of Animal Science, 25: 352-354, 1966.
- SONE, M.; K. OHMURA Y K. BAMBIA: Effects of antibiotics on the control of bacterial in boar semen. Veterinary Record, 111: 11-14, 1982.
- THACKER, B. J.; R. E. LARSEN, H. S. JOO Y A. D. LEMAN: Swine diseases transmissible with artificial insemination. Journal of American Veterinary Medical Association, 185: 511-516, 1984.
- TRAYER, T. P.: Considerations in selecting boar stud service: Biosecurity and herd health. In: American Association of Swine Practitioners. V.27, American Association of Swine Practitioners. Proceedings, Nashville, p. p. 457-459, 1996.
- WALTZ, F. A.; C. W. FOLEY, R. C. HERSCHLER, L. W. TIFFANY, Y B. J. LISKA: Bacteriological studies of boar semen. Journal of Animal Science. 27: 1357-1362, 1968.