

Capítulo LXXI

Avances en bioseguridad para centros de congelación de semen

Jorge Luis Rubio-Guillén
Oriana Portillo-Guevara

Una de las biotecnologías reproductivas con mayor difusión a nivel mundial es la Inseminación Artificial (IA), la cual ha sido implementada eficientemente por más de 50 años (Thibier & Guerin, 2000). Los factores que han contribuido a este gran desarrollo son principalmente el avance en el mejoramiento genético de los animales y el bajo riesgo de transmisión de patógenos.

Los médicos veterinarios, ganaderos y personal encargado del mejoramiento genético vía IA deben conocer las regulaciones existentes sobre la obtención, procesamiento y comercialización del semen. Deben estar capacitados para analizar si es conveniente o no, la adquisición de semen criopreservado (germoplasma) que no esté adecuadamente certificado, motivado al hecho que se han logrado identificar un amplio número de agentes que se pueden transmitir a través del semen. Por esta razón, se han postulado puntos críticos en la cadena de producción y se han creado medidas de control necesarias para disminuir este riesgo. De esta manera el semen utilizado en IA debe estar libre de agentes infecciosos y sin riesgo de transmisión de enfermedades. Para alcanzar ese nivel, se deben realizar pruebas de calidad, cubriendo dos aspectos: la evaluación periódica del producto final y una continua vigilancia de la salud de los toros antes y después de la producción de semen (Wentink, 2000). Así mismo, se debe identificar claramente todos los factores que podrían contribuir a la contaminación, desde el toro hasta la transferencia del semen en los genitales de la hembra (Thibier, 2000).

De poco sirve que el ganadero realice grandes inversiones en programas de mejoramiento genético y reproductivo, cuando no se cumplen las medidas preventivas necesarias para evitar la contaminación de los sementales como de las hembras inseminadas y de sus crías dentro de la unidad de producción. Este Capítulo ofrece una breve revisión de las posibles fuentes de contaminación del semen, de las enfermedades con potencial riesgo de transmisión venérea y de las medidas profilácticas, de control y bioseguridad para acercarnos cada vez más al riesgo cero en la producción de semen bovino. Todo esto aplicado, en el ámbito de funcionamiento de los Centros de

Congelación de Semen (CCS) que tienen a cargo la labor de colección, manipulación, almacenamiento y transporte del germoplasma, sin el riesgo de difundir cualquier patógeno por esta vía.

PATÓGENOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO

Obtener semen estéril es imposible. En cualquier eyaculado siempre hay microorganismos presentes que deben ser controlados para evitar introducir enfermedades en lugares donde nunca han existido. Las enfermedades de transmisión sexual pueden causar epidemias, las cuales pueden ser diseminadas fácilmente en cualquier parte del mundo debido al continuo y creciente mercado de semen y embriones. Por esta razón, se han realizado numerosas investigaciones para identificar los patógenos asociados al semen, encontrándose una división dicotómica en patógenos específicos y no específicos (Jiménez & Robayo, 2004).

Patógenos no específicos

Dentro de los patógenos no específicos presentes en la cavidad prepucial y en la uretra están: *Mycoplasma sp*, *Haemophilus somnus* y *Ureaplasma diversum* que pueden volverse patógenos en condiciones desfavorables. Otros patógenos aislados con frecuencia del semen fresco son *E. Coli*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Bacillus sp*, *Pseudomona sp*, *Corynebacterium sp*, *Micrococcus sp*, *Proteus sp*, levaduras y hongos. El control de estos microorganismos se puede alcanzar mediante el uso de antibióticos específicos y la realización de procedimientos higiénicos (Shin *et al.*, 1988). También se ha encontrado el virus de la papilomatosis bovina en el semen y puede ser transmitido por esta ruta. A toros que han presentado papilomas, no se recomienda colectar semen durante 2 a 3 semanas después de la aparición de los mismos (Thibier, 2000).

Patógenos específicos

Como patógenos específicos tenemos los virus de IBR, DVB, bacterias originarias de enfermedades como Lepstospirosis, Brucelosis, Campilobacteriosis genital bovina, parásitos causantes de Tricomoniasis y hongos como *Chlamydia psittaci*, que pueden ser transmitidos mediante el semen utilizado para la IA.

La Rinotraqueítis infecciosa bovina (BHV-1) es producida por un virus que se replica en la mucosa del prepucio, pene y parte distal de la uretra. El virus puede estar presente en el semen, sin que el animal manifieste signos clínicos. El diagnóstico de rutina para semen se realiza a través cultivos celulares y PCR (Wang *et al.*, 2008). Es conveniente usar sólo toros seronegativos.

En casos de Diarrea viral bovina, el virus es excretado en el semen durante la fase aguda. El mejor método para identificar reproductores persistentemente infectados es una prueba de ELISA para la captura de antígenos y detección del RNA viral (Givens, 2009). Este último autor demostró que el virus puede persistir en el tejido testicular después de una infección aguda hasta 2,7 años.

La *Brucella abortus* en toros puede localizarse en glándulas vesiculares, ampollas, testículos y epidídimo. Para el diagnóstico se utilizan pruebas de aglutinación,

especialmente en reproductores que provienen de zonas endémicas, utilizándose en la actualidad la fluorescencia polarizada (Sánchez *et al.*, 2009) y PCR (Vinodh *et al.*, 2008).

La Leptospirosis en bovinos produce infertilidad, aborto temprano y tardío. El serovar hardjo ha sido aislado de glándulas vesiculares, epidídimo y testículos de animales infectados. La prueba diagnóstica es la microaglutinación (MAP), aunque se están desarrollando pruebas moleculares para su detección e identificación (Vinodh *et al.*, 2008).

En la Campilobacteriosis genital bovina, el toro es portador asintomático de la enfermedad y no presenta modificaciones en las características del semen (Shin *et al.*, 1988). Se localiza en la mucosa del prepucio y glande, pudiendo ser transmitido a través del servicio natural o artificial. El diagnóstico de rutina es por inmunofluorescencia directa del esmegma prepucial en la cuarentena. La incidencia en los toros aumenta con la edad.

En el caso de la Tricomoniasis, el toro es un portador asintomático. El parásito puede sobrevivir en semen fresco y congelado (Ribeiro *et al.*, 2010). El diagnóstico de rutina se realiza cultivando esmegma prepucial. Los toros reproductores también son afectados por hongos como *Chlamydia psittaci* que produce principalmente vesiculitis y piosperma. En la actualidad, existen técnicas de diagnóstico inmunoenzimático y PCR.

En otras enfermedades como las causadas por Neospora y la enfermedad de John e Paratuberculosis, el riesgo de transmisión mediante el semen está todavía en investigación. Hasta ahora no hay evidencias de que el semen sea un factor de riesgo para estas enfermedades (Caetano da Silva *et al.*, 2004; Herthnek *et al.*, 2006).

Existen vacunas que deben emplearse para prevenir patógenos que puedan diseminarse a través del semen. En Venezuela, las vacunas obligatorias comprenden enfermedades como Aftosa, Leptospirosis y en algunas zonas endémicas, Rabia. Sin embargo, lo ideal es que los toros se vacunen usando productos inactivos para evitar alterar las serologías negativas y mostrarlas positivas (Quintero & González, 2008).

PRINCIPALES PUNTOS DE CONTROL PARA LA BIOSEGURIDAD DEL LOS CCS

Los puntos críticos de control donde puede ocurrir mayor peligro de contaminación de los sementales y del semen son: el área de Cuarentena, colecta del semen, equipos e Instalaciones, laboratorio y la adición del diluyente. Por tal motivo, se deben realizar una serie de pautas de obligado cumplimiento que incluyen desde las pruebas necesarias para la admisión de los toros en un CCS hasta lo que involucra aspectos sanitarios de los toros en producción. Asimismo, deben considerarse otras posibles contaminaciones colaterales que corren el riesgo de diseminarse por vía seminal y que deben ser tomadas en cuenta para evitar la entrada de patógenos y contener la diseminación de los mismos, si estos lograsen ingresar rompiendo los cercos sanitarios (Rubio & Quintero, 2010).

Área de cuarentena

En los Centros de semen e IA, los reproductores que ingresan por primera vez deben ser inspeccionados previa y rigurosamente por un médico veterinario especia-

lista en el área, de preferencia en las instalaciones de su lugar de procedencia. Luego de este paso, deben permanecer completamente aislados por 60 días de los toros residentes (pre-cuarentena y cuarentena), para confirmar en el laboratorio diagnóstico, la ausencia de títulos de anticuerpos contra enfermedades como brucelosis bovina, rino-traqueitis infecciosa bovina (IBR/IPV), tuberculosis y leucosis enzoótica bovina (Rubio & Quintero, 2010). Los toros también deben ser monitoreados para determinar la presencia del virus de diarrea bovina (BVD/MD) mediante el aislamiento de antígeno viral (el cual debe resultar negativo) y por la observación de la presencia de anticuerpos mediante una prueba serológica (Ruigh *et al.*, 2006).

Se han descrito portadores sero-negativos para el BHV1 herpes virus (IBR/IPV) (Lemaire *et al.*, 2000 ab) que son capaces de introducir una infección en un CCS, sin ser detectados en el periodo de cuarentena, motivado a que esta patología no siempre es reconocida por síntomas clínicamente visibles (Van Oirschot *et al.*, 1993). Adicionado a esto, los toros son monitoreados una vez al año como se describe en las regulaciones sanitarias estándar, por lo que siempre es probable que el semen contaminado con BHV1 se comercialice hasta la fecha de la próxima prueba. Para evitar este riesgo, se sugiere que las pruebas se hagan con mayor frecuencia en combinación con un periodo mas prolongado de almacenamiento del semen antes de su colocación en el mercado (Rubio & Quintero, 2010). Un procedimiento apropiado y seguro es monitorear los toros para IBR/IPV y los toros seronegativos para BVD/MD cada 3 semanas, en combinación con un periodo de almacenamiento del semen de 5 semanas (Ruigh *et al.*, 2006), lo cual mejora la seguridad del producto final. También se ha descrito el aislamiento mediante PCR, de herpes virus bovino-5 (HVB-5) en células de los testículos y del semen. Sin embargo, las implicaciones de este novedoso hallazgo aún son muy discutidas (Diallo *et al.*, 2010).

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) tiene ciertos estándares cuyo objetivo principal es detectar enfermedades antes de que lleguen al Centro. Para esto, se deben realizar exámenes clínicos de los toros donadores, al mismo tiempo, pruebas para detectar enfermedades como Brucelosis, Tuberculosis, IBR, DVB, Leucosis y repetirlas a los 30 días; lo mismo para *Trichomona* y *Campylobacter* (Ribeiro *et al.*, 2010). Lo ideal en los sistemas de doble propósito, es manejar animales de fincas libres de enfermedades de obligada notificación y carácter zoonótico (Tuberculosis, Brucelosis, Leptospirosis), y que de preferencia sus madres estén libres de Leucosis, DVB e IBR (Rubio & Quintero 2010).

En caso de detectar algún brote de la enfermedad, se debe aislar de inmediato él o los animales enfermos de los sanos, se debe poner el Centro en cuarentena y comprobar las dosis seminales de los animales problema. Debe prestarse suma atención a la presentación de focos de enfermedades de notificación obligatoria (Althouse, 2008).

Colección del semen

La extracción del semen debe realizarse bajo condiciones de máxima asepsia, es decir, que todos los equipos necesarios deben estar debidamente lavados y esterilizados para evitar la contaminación. Un cuidado particular debe prestarse al semental que se prepara para la colección de un eyaculado, de modo que la región ventral del

abdomen y los alrededores del prepucio se laven con agua y jabón, se enjuaguen con abundante agua y se desinfecten.

También debe prepararse el animal maniquí, al que se baña bien y se desinfecta especialmente en la región posterior antes de la colecta de todos los toros; lo ideal sería que se desinfectara esta zona luego de cada colecta individual. Estas precauciones contribuyen a disminuir la cantidad de microorganismos en el eyaculado, de esa forma, la evaluación será precisa y la conservación más adecuada. Para el procedimiento de colección usualmente se utiliza una vagina artificial. Los toros son recolectados bien sea usando un recelador o utilizando maniqués artificiales para la monta (Baracaldo *et al.*, 2007). Para limpiar la vagina artificial se recomienda el uso de etanol 70%, alcohol isopropílico 98 ó 99%, óxido de etileno o vapor (Baracaldo *et al.*, 2007). Una vez obtenido el semen, la muestra se identifica con los datos del toro (raza y número), fecha y hora de extracción. El tubo colector se cierra con un tapón estéril, para evitar la contaminación durante el traslado al laboratorio o lugar donde será evaluado.

La evaluación seminal debe realizarse dentro de un tiempo breve para que sea confiable y no se modifiquen las características del semen como motilidad, vitalidad y pH. Cuando se requiere el estudio microbiológico del semen, se toma 1 mL del eyaculado y se coloca en un termo con hielo para enviarlo de inmediato al laboratorio de microbiología junto con la historia clínica que debe contemplar los resultados previos de la fertilidad, del diagnóstico clínico y el último espermograma realizado.

Instalaciones y equipos

Las instalaciones y equipos son medios de diseminación de posibles infecciones por lo cual se requiere un mantenimiento que incluye optimizar el manejo y la operatividad de los equipos e instalaciones del CCS. Se debe controlar el ingreso de cualquier vehículo (despachador de alimentos, compradores de semen, visitantes) para evitar la introducción accidental de cualquier otro fómite, razón por la cual los filtros sanitarios deben ser permanentemente aplicados. Los vehículos que ingresan al Centro deberán ser autorizados en la entrada que debe estar a más de 1 km de los animales en producción por vigilantes responsables (Pascual-Álvarez, 2008). Solo se permitirá la entrada de vehículos limpios y desinfectados; aquellos que deban tener un acceso cercano a las instalaciones donde permanecen los toros residentes deberán desinfectarse en su exterior mediante un equipo de aspersión manual. Ese procedimiento se realizará utilizando una mezcla de hipoclorito de sodio a una concentración de 100 ppm de cloro activo o con la utilización de diclorohexidina al 2% como desinfectante (Wentink *et al.*, 2000; Quintero & González 2010); También es necesario la construcción de un rodiluvio para la limpieza y desinfección de los neumáticos en la garita de seguridad y para entrar a las adyacencias del laboratorio y corrales de los animales en producción (Pascual-Álvarez, 2008).

El lavado periódico de las instalaciones como corrales, comederos, bebederos y cualquier otro material ocupado durante el ciclo productivo debe realizarse por lo menos 2 veces al mes, de manera minuciosa con agua a presión, pudiendo utilizarse un detergente, según indicaciones del médico veterinario responsable (Althouse, 2008). Esta limpieza incluirá todas las superficies y todos los equipos utilizados en las etapas de crianza y producción, comenzando una vez que todo el excremento ha sido retira-

do del corral con palas recolectoras. Es de vital importancia no dejar acumulaciones de agua y excremento en los rincones. Se debe disponer de un lugar seco con capacidad de acopio temporal de excremento (a más de 200 metros de las instalaciones), para los períodos en que no sea posible aplicar, vender o distribuir el excremento. Un manejo sanitario adecuado, económico y sencillo es el uso de gas-oil, rociándolo en la estercolera para evitar la pululación de la mosca doméstica, vector de muchas enfermedades infecciosas (Rubio & Quintero, 2010).

Debe realizarse también un control de plagas y animales indeseables debido a que aves silvestres y los roedores pueden viajar rápidamente a través de diferentes sitios (fincas, granjas, mataderos, casas) y están generalmente involucrados en muchos problemas de salud (Rubio & Quintero, 2010); además ocasionan un incremento en el desperdicio de alimento, por ello se tiene especial cuidado en los sitios de almacenamiento del suplemento alimenticio tratando de disminuir el acceso de las aves y roedores colocando mallas en ventanas y en los lugares por donde puedan entrar. Los roedores habituales (ratas y ratones) son más difíciles de controlar y una vez que se establece una población en un CCS resulta muy difícil erradicarla, por lo cual se deben mantener controladas las poblaciones utilizando cebos, tanto líquidos como sólidos, los cuales se colocan en cajas guarda cebos en lugares estratégicos, principalmente en los lugares en donde se ha observado la presencia de dichos animales.

Las zoonosis donde las ratas actúan como portadores o transmisores incluyen: leptospirosis, triquinosis, infecciones por estreptococos y estreptobacilos, salmonelosis, peste bubónica e infestaciones parasitarias, estando implicadas en al menos 35 enfermedades que afectan a los animales domésticos (Isea & Gil, 2003). Como norma se maneja principalmente una rotación de cebos para evitar que los animales dejen de consumirlos (Thibier, 2001). Los productos comerciales que actualmente se utilizan son: Racumin líquido (Coumatetralit), Lanirat cubo (Bromadiolona), así como, Brodifacoum y Difethialone en pellets (Isea & Gil, 2003).

Laboratorio

Después de la colección, el semen (en un contenedor estéril) es llevado al laboratorio para su procesamiento. La preparación de los dilutores requiere de una campana de flujo laminar de aire, la cual crea el ambiente libre de contaminación para preparar dichas soluciones (PBS, diluyentes para congelación de semen, entre otros). Mediante de Baños María termoestables, se mantiene la temperatura de los medios de cultivo y eyaculados al momento de la evaluación (37°C), refrigerador-congelador, balanza analítica, horno seco de esterilización del material de vidrio (2 horas a 125°C) y un autoclave para esterilizar el material utilizado en la colección de semen. Los envases de almacenamiento y de transporte tienen que ser apropiadamente desinfectados o esterilizados antes del comienzo de la operación de llenado. La simple manipulación del semen en el laboratorio de procesamiento puede ser una fuente sencilla para la introducción de cualquier patógeno específico o no específico en el producto final, por lo cual deben ser desinfectados y esterilizados antes de comenzar cada operación en el laboratorio (Althouse, 2008). También, es importante evaluar sustancias tan básicas como el agua del laboratorio y el nitrógeno líquido que pueden ser fuentes de contaminación en el producto final, afectando la calidad (Wentink *et al.*, 2000).

Se han descrito protocolos y productos químicos con actividad bactericida y antiviral que pueden ser usadas de manera eficiente para desinfectar o esterilizar estos equipos (Bielanski, 2005); este autor, por ejemplo, utilizó diferentes biocidas de amplio espectro para desinfectar eficazmente tanques de transporte, lo cual se evidenció después de inducir una contaminación experimental. Ninguna bacteria o virus (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, BVD/MD ó IBR/IPV) fue detectado en muestras de semen o embriones almacenados en estos tanques de transporte después que fueron desinfectados con estos biocidas. Podría ser útil para la industria establecer protocolos para la limpieza y desinfección de todos los contenedores, no solo para los de transporte (Marques *et al.*, 2009).

Al finalizar el proceso de dilución y adición de crioprotectores, las pajuelas de semen deben ser selladas y codificadas con mínimos requerimientos como: código del centro, raza, toro, número de lote y fecha de recolecta (Quintero & González, 2008). La identificación es muy importante, ya que ayuda entre otras cosas al rastreo y ubicación en caso de algún problema sanitario, donde la identificación del toro y el código de recolección son los requerimientos mínimos.

El diluyente

Los productos de origen animal utilizados para el procesamiento del semen incluyen aditivos y diluyentes. El punto más crítico en la contaminación es el diluyente que se coloca en la pajuela de semen (Ruigh, 2006), algunos de los cuales están basados en yema de huevo y leche descremada, ampliamente utilizados para la criopreservación de semen de toro (Vera, 2005; Baracaldo *et al.*, 2007). Los dilutores son difíciles de estandarizar e introducen un riesgo de contaminación microbiana (bacterias o micoplasmas). Por esas razones, deben ser obtenidos de fuentes que no representen un riesgo para la salud animal y tratados antes de su uso para prevenir dicho riesgo (Rubio & Quintero 2010).

Se prescribe que cada lote de diluyente de yema de huevo, debe ser acompañado de certificados de análisis en relación con la contaminación bacteriana y certificado de ausencia de *Salmonella*. Se ha demostrado que los diluyentes a base de este componente muestran contaminación con toda clase de bacterias, a pesar de la presencia de antibióticos, indistintamente de la fuente de los huevos (Bousseau *et al.*, 1998).

Entre los antibióticos que generalmente en el país son adicionados dentro del diluyente del semen se incluyen la estreptomycin, penicilina, lincomicina y espectinomicina (Vera, 2005). Una combinación alternativa de antibióticos con un buen efecto contra *Campylobacter sp*, *Leptospira sp*, *Mycoplasma sp* y *Ureaplasma sp* puede ser usada igualmente (Marques *et al.*, 2009). Inmediatamente después de la adición del antibiótico de elección, el semen diluido debe ser mantenido en una temperatura máxima de 5°C por un mínimo de 45 minutos (Ruigh *et al.*, 2006).

En cuanto a la leche utilizada como base para diluyente, esta demostrado que el virus de la DVB puede estar presente y ser transmitido a través de la IA, debido a que puede ser excretado por la leche en animales infectados no sintomáticos, siendo introducido como contaminante en el semen de esta manera (Marley *et al.*, 2009).

Debido a los problemas mencionados con la leche y yema de huevo se han implementado diluyentes a base de soya (Frijters & Luimstra, 2003). Los efectos de estos dilutores sobre la calidad del semen no son siempre consistentes en relación con las tasas de fertilidad (Wagtendonk-de *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2003). A pesar de ello están siendo muy usados en la industria de IA, lo cual tiene sentido, debido a que la regulación de los países industrializados obliga el uso de diluyentes libres de ingredientes de origen animal (Ruigh *et al.*, 2006).

La OIE ha establecido un estándar para el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en el semen procesado de 5000 UFC/mL. La OIE también menciona que no hay evidencia científica de ninguna correlación entre el número normal de UFC en una pajuela de semen y la fertilidad (OIE, 2005). Las UFC en el producto final están altamente influenciadas por el estándar de higiene en el laboratorio de procesamiento (Ruigh *et al.*, 2006).

NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD NECESARIAS PARA EVITAR PRESENTACIÓN DE FOCOS

Los Centros deben vigilar el cumplimiento estricto de normas básicas diarias. Normas de bioseguridad y biocontención que deben ser aplicadas para evitar la presentación y diseminación de focos:

1. No permitir la entrada de personas que hayan estado en contacto con animales de otros sitios en las últimas 72 horas.
2. Imponer un cambio obligatorio de ropa a aquellas personas que hayan visitado otras instalaciones de bovinos y realizar una ducha a la entrada.
3. Restringir el acceso de visitantes a la zona de permanencia de sementales y manejo de semen.
4. Evitar que el personal del Centro entre en contacto con otros toros, bien sea visitando otros Centros, fincas o mataderos inclusive (Pascual-Álvarez, 2008).
5. El Centro debe contar con una reserva de botas de caucho desinfectadas o cubre botas de plástico, en caso de no tener botas disponibles; overoles de trabajo de tela o material desechable y guantes de látex para visitantes no casuales, pero necesarios, entre ellos los propietarios de toros, compradores de semen, investigadores, estudiantes.
6. Los Centros de nueva construcción se deben situar preferiblemente en zonas de baja densidad bovina, alejadas de otras instalaciones, por lo menos en 3 km (Prieto, 2008).

CONCLUSIONES

Es necesario considerar que, todas las buenas prácticas de manejo, sanitarias y profilácticas, implantadas y usadas correctamente, impiden el ingreso y salida de agentes infecto-contagiosos a un CCS. Sabiendo que la bioseguridad no son medidas que se empiezan a ejecutar un día y son suficientes para lograr niveles óptimos de seguridad biológica, sino más bien, entendiendo, que esto concibe un programa bien

planificado y esquematizado que deben conocer no solo los profesionales técnicos del Centro, sino también, todas las personas que laboran (empleados, obreros, vigilantes, técnicos, dueños) y visitan el mismo (estudiantes, compradores, investigadores). Una adecuada actitud frente a la higiene no se puede hacer cumplir solo con un programa obligatorio de entrenamiento para los obreros, empleados y técnicos en un CCS, aunque es un importante comienzo. Los Centros deben exhortar a sus trabajadores que laboren en óptimas condiciones de higiene y para ello con tan solo el cumplimiento de normas básicas diarias, con el pago de incentivos que estimulen el sentido de pertenencia de los trabajadores pudiera ser suficiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Althouse GC. 2008. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim* 43 (2): 374.
- Baracaldo MI, Barth AD, Bertrand W. 2007. Steps for freezing bovine semen: From semen collection to the liquid nitrogen tank. In: *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*, (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).
- Caetano da Silva A, Ferre I, Collantes Fernandez E, Navarro V, Aduriz G, Ugarte Garagalza C, Ortega Mora LM. 2004. Occasional detection of *Neospora Caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. *Theriogenology* 62: 1329.
- Diallo, GR Hewitson, Hoad J, S Turner, Corney BG, BJ Rodwell. 2010. **Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia.** *Aust Vet J* 88(3) : 93.
- Frijters AC, Luimstra TA. 2003. Time of freezing and the use of semen extenders based on soyabean extract and egg yolk in cryopreservation of bull semen: Effects *in vitro* and on fertility *in vivo*. *AI Vets Meeting*, Hungary. 456 p.
- Gil J, Rodrigues-Irazaqui M, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59: 1157.
- Givens MD, Riddell KP, Edmondson MA, Walz PH, Gard JA, Zhang Y, Galik PK, Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA. 2009. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 20 (1-2): 42.
- Herthnek D, Eglund S, Willemsen PT, Bolske G. 2006. Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 100: 1095.
- ICAR. 2004. International Agreement of Recording Practices (Recording Guidelines 2004), Section 8.1.8.1, ICAR.
- Isea G, Gil M. 2003. Comparación de la potencia de dos rodenticidas anticoagulantes. Importancia para el control poblacional de ratas, su relación con la salud pública, de los animales domésticos, y actividades económicas humanas. *Multiciencias* 3(1): 1.
- Lemaire M, Meyer G, Baranowski E, Schynts F, Wellemans G, Kerkhofs P, Thiry E. 2000a. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunised calves. *J Clin Microbiol* 38: 4233.
- Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ and Thiry E. 2000b. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol* 83: 301.

Marley MS, Tabor JM, Givens MD, Kaproth M, Riddell KP, Galik PK, Zhang Y, Eason AB. 2009. Bovine viral diarrhoea virus is inactivated when whole milk from persistently infected cows is heated to prepare semen extender. *Vet Microbiol* 134 (3-4): 249.

Marques LM, Buzinhani M, Neto RL, Oliveira RC, Yamaguti M, Guimarães AM, Timenetsky J. 2009. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. *Vet Rec* 165(19): 572.

OIE. 2005. Terrestrial Animal Health Code 2005. OIE Paris, France. van Oirschot JT, 1995: Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q*, 17, 29-33.

Pascual-Álvarez G. 2008. Curso Básico de Procedimientos para Nuevas Incorporaciones. Centro de Investigación en Sanidad Animal. Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid, España. 224 p.

Prieto C. 2008. DVB: Diagnóstico, Control y Erradicación. Cuadernos de Campo IVO-MEC. Servet Diseño y Comunicación S.L. Madrid, España. 225 p.

Quintero-Moreno A, González-Villalobos. 2008. Bioseguridad en centros de producción de semen de toro. En: Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito. C González-Stagnaró, E Soto-Belloso, N Madrid-Bury (Eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. LIV: 662.

Ribeiro CM, Falleiros MB, Bicudo SD, Júnior JP, Golim MA, Filho FC, Padovani CR, Modolo JR. 2010. *Trichomonas fetus* extracellular products decrease progressive motility of bull sperm. *Theriogenology* 73(1): 64.

Rubio-Guillen J, Quintero-Moreno A. 2010. Bioseguridad en Centros de Inseminación Artificial y su Influencia en la Calidad Seminal. Cuaderno Científico GIRARZ 8, N Madrid-Bury (ed). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela: 231.

Ruigh L, Bosch JC, Brus B MC, Landman, Merton JS. 2006. Ways to improve the biosecurity of bovine semen. *Reprod Domest Anim* 41(4): 268.

Shin SJ, Lein DH, Pattern VH, Ruhnke HL. 1988. A new antibiotic combination for frozen bovine semen to eliminate *Campylobacter fetus* from frozen bovine semen. *Theriogenology* 29: 577.

Sánchez-Villalobos A, Villarroel-Neri R, Oviedo-Bustos A, Sandra G, Boscán-Ocando J, Pinto R, Pirela F, Becerra L, López E. 2009. Monitoreo epidemiológico para *Brucella abortus* en fincas doble propósito del Municipio Machiques de Perijá, Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ* 19 (5): 466.

Thibier M. 2001. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. *Theriogenology* 56: 1465.

Thibier M, Guerin B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Rep Sci*. 62: 233.

Vinodh R, Raj GD, Govindarajan R, Thiagarajan V. 2008. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Trop Anim Health Prod* 40 (5): 329.

Wagtendonk-de Leeuw, Van AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LM, Den Daas JH. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54: 57.

Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JE, Van Den Berg TH. 2000. Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Liv Prod Sci* 62: 207.