

Capítulo LIV

Bioseguridad en centros de producción de semen de toro

Armando Quintero Moreno, DMV
Decio González Villalobos, MSc

INTRODUCCIÓN

La historia de la industria de la producción de semen de toro y la inseminación artificial (IA) de uso comercial se remonta a los años 30 en Rusia. Sin embargo, el crecimiento exponencial de la IA comenzó en los años 40 motivado por la necesidad de obtener un mejoramiento genético sustancial, así como la prevención y la eliminación de las enfermedades venéreas (Foote, 1996). La extracción de semen para su uso en programas de IA ha sido practicada principalmente en sementales genéticamente superiores para mejorar la fertilidad en los rebaños y para salvar el obstáculo logístico del transporte de animales (Den Daas, 1997).

El uso de la IA para el mejoramiento genético ha permitido optimizar los programas de cruzamiento a nivel mundial. Las compañías de IA desarrollan sus propios programas de cruzamiento seleccionando los toros superiores, lo cual ha permitido obtener valores de cría fiables sobre características que pueden ser medidas fielmente sobre el desempeño de sus hijas. La edad en que un toro es admitido en los centros de producción de semen varía entre las 6 semanas y la edad adulta, pasando por diferentes estadios en su vida; comienza como un toro en prueba, luego como un toro en periodo de espera mientras obtiene su valor de cría y finalmente como un toro probado en producción. El período de prueba puede durar al menos 3 años; dependiendo del desempeño de las hijas, un toro puede convertirse en un toro probado (de Ruigh et al., 2006).

En países desarrollados, el uso de IA para prevenir y eliminar las enfermedades venéreas determinó las condiciones de sanidad de los toros para poder entrar en un centro de IA y para obtener los permisos con el fin de producir semen para comercializar. Las regulaciones y recomendaciones internacionales nos proveen de estándares para la extracción de semen en los toros, los cuales incluyen aspectos de sanidad y alojamiento, así como estándares para la recolección, manipulación, almacenamiento y transporte del semen (de Ruigh et al., 2006).

En el sector industrial, el cumplimiento de todas las legislaciones y adicionalmente garantizar una producción segura de semen libre de contaminaciones es algo complicado debido al gran número de requerimientos que es necesario cumplir. Estos incluyen la realización de una cuarentena, restricción de entradas y numerosos muestreos de los animales (sangre y/o semen) durante el año subsiguiente. Aunado a esto, es necesario comentar que actualmente en Venezuela no se realizan muchas de las pruebas serológicas y de aislamiento viral que se han recomendado establecer para el ingreso y permanencia de sementales en los centros de producción de semen bovino.

A lo largo de este artículo se describirán una serie de criterios que no son aplicados, no necesariamente por desconocimiento de nuestros investigadores, sino más bien, por la carencia de una infraestructura establecida en las universidades y en los entes oficiales para poder realizar en forma amplia éste tipo de diagnóstico. Lo más lamentable es que muchos investigadores y veterinarios comentan que los agentes etiológicos que se transmiten por el semen y que mencionaremos más adelante están difundidos en las ganaderías bovinas de Venezuela; sin embargo, no existen estudios serios que lo confirmen. Este trabajo se enfoca en función de la bioseguridad del semen como producto final, lo cual involucra aspectos sanitarios de los toros y otras posibles contaminaciones colaterales que tienen el riesgo de diseminación por vía del semen.

ESTÁNDARES DE SANIDAD PARA LOS TOROS EN PRODUCCIÓN

En la Unión Europea y en los Estados Unidos de América se establecen una serie de pautas que incluyen varias pruebas que son necesarias en cualquier parte del mundo para la admisión de los toros en un centro de recolección de semen (CRS). En nuestro caso, las normas estructuradas por la Unión Europea (UE) serán desarrolladas como el modelo a seguir, a pesar de saber que es muy difícil de validarlas en los países latinoamericanos, debido a sus estrictos protocolos. Por esa razón, debemos tener en cuenta que solo de esta manera se podría garantizar la prevención en la transmisión de patógenos por el semen y de esta manera mantener una ganadería sana y sustentable.

Arribo de los toros al CRS y la cuarentena

Previamente a su admisión en el CRS, los toros deben ser monitoreados dentro los 28 días previos al periodo de cuarentena (pre-cuarentena) para confirmar la ausencia de anticuerpos contra enfermedades como la Brucelosis Bovina, la Leucosis Enzoótica Bovina y la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR/IPV). Adicionalmente, debe ser aplicada una prueba intradérmica para descartar la presencia de Tuberculosis. Los toros deben ser monitoreados para determinar la presencia del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD/MD) mediante el aislamiento del antígeno viral (el cual debe resultar negativo) y la observación de la presencia de anticuerpos mediante una prueba serológica (de Ruigh et al., 2006).

Después de la pre-cuarentena, comienza un periodo de cuarentena de 28 días o más. A partir de los 21 días de la cuarentena, los toros deben someterse a pruebas de Brucelosis Bovina, IBR/IPV y BVD/MD (serología negativa). La prueba serológica de BVD/MD tiene que dar un resultado similar al de la prueba realizada en la pre-cua-

rentena. Es necesario enfatizar que la entrada al CRS solo es permitida en caso que no exista seroconversión de BVD/MD en los toros que resultaron negativos antes de entrar a la estación de cuarentena (pre-cuarentena). Si hay seroconversión, todos los animales que se mantienen seronegativos tienen que permanecer en cuarentena por un tiempo más prolongado hasta que concluya la seroconversión del grupo. A los animales seropositivos a BVD/MD se les permite la entrada al centro, sin embargo, antes del primer despacho de semen, una muestra de este debe someterse al aislamiento viral o a pruebas de antígeno viral de BVD/MD.

Adicionalmente todos los toros deben ser probados contra *Campylobacter fetus ssp. venerealis* y *Trichomonas fetus* cuyo resultado debe ser negativo. Después de pasar este periodo de cuarentena, deben ser realizadas pruebas de rutina en el CRS al menos una vez al año contra: TBC Bovina, Brucelosis Bovina, Leucosis Enzootica, IBR/IPV, BVD/MD (solo serología en animales seronegativos) *Campylobacter fetus ssp. venerealis* y *Trichomonas fetus* (lavado preputial) (de Ruigh et al., 2006).

La introducción del IBR/IPV (o BVD/MD) en un rebaño puede ocurrir mediante la intervención de algunos factores. Sin duda, el factor más importante radica en la presencia de animales (van Schaik et al., 2001, 2002). Además, otros factores como la transmisión a través de equipos, humanos y aerógenos pueden introducir la infección en el centro. La UE a través de sus regulaciones trata de minimizar la introducción de una enfermedad infecciosa a través de los animales, prescribiendo un periodo de cuarentena a los toros, tal como se describió anteriormente. Otra medida de sanidad para el comercio de semen fresco es la obligación de tomar la temperatura corporal del toro el día de la recolección; por otro lado, el semen congelado debe estar almacenado al menos 30 días antes de su despacho.

Se han descritos portadores serológicamente negativos para el BHV1 herpes virus (IBR/IPV) (Lemaire et al., 2000a,b). Tales animales son capaces de introducir una infección en un CRS sin que sea detectado en el periodo de cuarentena. En caso que ocurra una infección, no siempre es reconocida por síntomas clínicamente visibles (van Oirschot et al., 1993). El monitoreo una vez al año como se describe en las regulaciones, hace que siempre sea 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 más prolongado de almacenamiento del semen antes de su colocación en el mercado.

La frecuencia de las pruebas para algunos patógenos debe estar correlacionada con la tasa de distribución del patógeno en un rebaño negativo (tasa de reproducción R_0), así como del riesgo potencial de transmisión a través del semen (Wentink et al., 2000). 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 (de Ruigh et al., 2006). Esto garantizaría que estén disponibles los resultados de las pruebas al menos 10 días antes de la última fecha de producción, lo cual, si representa una garantía de la seguridad del producto.

Las compañías de IA establecen la vacunación contra BVD/MD de los toros jóvenes antes de la admisión en el centro para prevenir la seroconversión más tarde, en su vida productiva. La regulación de la UE permite la aceptación de estos animales.

En este caso, es imposible distinguir entre los anticuerpos de campo de los desarrollados por la vacuna, ya que no existe vacuna con marcadores. Por lo tanto, la posibilidad de la vacunación no es un acontecimiento deseable (de Ruigh et al, 2006). Voges et al. (1998) describieron por primera vez que el virus de BVD/MD puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en los testículos, lo cual indica que el semen de los toros infectados puede estar contaminado con el virus durante largos periodos.

Para algunas enfermedades, como la causada por la Neospora y la enfermedad de John o Paratuberculosis, el riesgo de transmisión mediante el semen esta todavía en investigación. Hasta ahora no hay una clara indicación que el semen sea un factor de riesgo para estas enfermedades (Jorge et al., 1998; Herthnek et al., 2006; Caetano da Silva et al., 2004).

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Durante los procedimientos de recolección y procesamiento existen diferentes posibilidades que el producto final resulte contaminado. Esto puede ser causado por una contaminación por contacto entre superficies, por el uso de un diluyente contaminado o por contaminación cruzada. El semen debe ser recolectado en áreas establecidas para tal fin, procesado en un laboratorio con normas de higiene adecuadas y con temperatura controlada y almacenado en cuartos aptos para ello. El sitio de alojamiento de los toros y los distintos ambientes mencionados para la recolección, procesamiento y almacenamiento del semen deben ser fáciles de limpiar y de desinfectar; además, el alojamiento de los animales debe estar físicamente separado del cuarto de procesamiento de semen y ambos deben estar separados del cuarto de almacenamiento (EC, 1988).

Según la UE, los antibióticos que deben ser adicionados al diluyente del semen incluyen la estreptomycin, penicilina, lincomicina y espectinomycin. La mínima concentración final de estos antibióticos después de realizar la dilución debe ser muy bien controlada. Una combinación alternativa de antibióticos con un efecto equivalente contra *campylobacter*, *leptospira* y *micoplasma* puede ser igualmente usada. Inmediatamente después de la adición del antibiótico de elección, el semen diluido debe ser mantenido a una temperatura máxima de 5°C por un tiempo mínimo de 45 minutos (de Ruigh et al., 2006).

Para el procedimiento de recolección se utiliza una vagina artificial (VA). Los toros son recolectados bien sea usando un recelador o utilizando un maniquí artificial para la monta. No existe una regulación exacta prescrita de cómo desinfectar la VA, ni para el recelador o el maniquí; sin embargo, todos los instrumentos que entran en contacto con el semen o con el animal donador deben estar desinfectados o esterilizados en forma apropiada antes de su empleo. Para limpiar la VA se recomienda el uso alcohol etílico al 70° (etanol), alcohol isopropilico al 98-99° o vapores de oxido de etileno (EC, 1988).

Después de la recolección, el semen (en un contenedor estéril) es transferido al laboratorio para su procesamiento. Las pajuelas son llenadas, enfriadas como se ha descrito, congeladas y finalmente almacenadas en contenedores de nitrógeno líquido. La directiva de la UE prescribe que los productos de origen animal utilizados para el

procesamiento del semen incluyendo aditivos y diluyentes deben ser obtenidos de fuentes que no representen un riesgo para la salud animal o que sean tratados antes de su uso para prevenir riesgos. Los envases de almacenamiento y transporte tienen que ser apropiadamente desinfectados o esterilizados antes del comienzo de la operación de llenado. El agente criogénico utilizado no debe haber sido usado previamente para otros productos de origen animal (EC, 1988).

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2005) 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. El estándar de UFC así como la relación entre la UFC y la fertilidad fue eliminada de la última actualización del código de sanidad.

El punto más crítico en la contaminación es el diluyente que se coloca en la pajuela de semen. Algunos diluyentes basados en clara de huevo son ampliamente utilizados para la criopreservación del semen de toro. Los diluyentes de semen que contienen componentes como clara de huevo y leche descremada son difíciles de estandarizar e introducen un riesgo de contaminación microbiana (bacterias o micoplasmas). Se prescribe que cada lote, por ejemplo, diluyente de clara de huevo, debe ser acompañado de certificados de análisis en relación con la contaminación bacteriana y certificado de ausencia de *Salmonella sp.* Se ha demostrado que la clara de huevo pura y los diluyentes hechos con este producto 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).

Desde hace unos años están disponibles comercialmente diluyentes a base de grano de soya (Frijters y Luimstra, 2003). Los reportes del efecto de los diluyentes hechos a base de soya sobre la calidad del semen no son siempre consistentes en relación con las tasas de fertilidad (Wagendonk-de et al., 2000; Gil et al., 2003). Sin embargo, estos diluyentes en base a soya son ampliamente usados en la industria de IA, lo cual tiene sentido, ya que, la regulación de la UE obliga el uso de diluyentes libres de ingredientes de origen animal.

El efecto de la gentamicina, tylosina, lincomicina y espectinomicina también se discute en algunos estudios. Solo se ha observado el efecto bacteriostático sobre el micoplasma en pajuelas congeladas-descongeladas artificialmente infectadas (Visser et al., 1998). A pesar que se encontró alguna inhibición del crecimiento de micoplasmas (Shin et al., 1988), se observó un leve crecimiento.

En la industria de IA, las UFC no son siempre medidas. En el semen fresco existen grandes fluctuaciones de las UFC entre diferentes recolecciones del mismo toro (Wezeman, 1996, cit. por de Ruigh et al., 2006). La OIE también menciona que no existe una correlación real entre las UFC del semen fresco y las UFC del producto final. De cualquier manera, tiene sentido que exista un límite para las UFC permitidas en el producto final, debido a que el número de UFC en el producto final está altamente influenciado por el estándar de higiene en el laboratorio de procesamiento.

En las regulaciones de la UE, se menciona que los envases de almacenamiento y transporte deben ser apropiadamente desinfectados o esterilizados antes de comenzar

cada operación de llenado. Se sabe que cada compañía utiliza diferentes métodos de desinfección. En investigaciones recientes se describen protocolos y productos químicos con actividad bactericida y antiviral que pueden ser usados de manera eficiente para desinfectar o esterilizar estos equipos (Bielanski, 2005). Este último, 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 o 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.

IDENTIFICACIÓN, REGISTRO DEL EYACULADO E INSEMINACIÓN

Una apropiada identificación de cada eyaculado desde el primer hasta el último paso de los procesos de recolección y manejo es de gran importancia. El código requerido de una pajuela es importante para asegurar la apropiada identificación de los animales y del producto animal. Las pajuelas de semen deben ser selladas y codificadas en concordancia con los estándares internacionales del ICAR (2004). Estos mínimos requerimientos son: código del centro, raza, toro, número de lote y fecha de recolección.

La identificación es muy importante, ya que, ayuda entre otras cosas al rastreo y ubicación en caso de algún problema sanitario; la identificación del toro y el código de recolección son los requerimientos mínimos. Un problema con cierto toro de un determinado centro de una fecha de recolección dada debe ser fácilmente rastreable, y esto se logra al tener la pajuela bien identificada. El propósito del código de la raza es identificar la raza del toro sobre las pajuelas de semen (ICAR, 2004). Sin embargo dentro del código de identificación de la pajuela la información exacta de la raza puede ser hallada al obtener la subsiguiente identificación del toro. Desde la perspectiva de la bioseguridad, el código de la raza no adiciona ningún valor y se pudiese dejar de imprimir, logrando obtener una pajuela con menor número de datos, pero bien rastreada en caso de que sea necesario.

La inseminación debe ser realizada bajo buenas condiciones de higiene para prevenir la transmisión de infecciones. Una adecuada actitud frente a la higiene no se puede hacer cumplir solo con un programa obligatorio de entrenamiento para los técnicos, aunque es un importante comienzo. Las compañías de IA deben exhortar a los técnicos para que trabajen en óptimas condiciones de higiene.

LITERATURA CITADA

- Bielanski, A. 2005: Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology* 63:1946–1957.
- Bousseau, S., Brillard, J.P., Marquant–Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M., 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50:699–706.

- Caetano da Silva, A., Ferre, I., Collantes Fernández, 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* 62:1329–1336.
- de Ruigh, L., Bosch, JC., Brus, MC., Landman, B., Merton JS. 2006. Ways to improve the biosecurity of bovine semen. *Reprod Dom Anim* 41:268–274.
- Den Daas, JGH. 1997. Prediction of bovine male fertility. (Thesis). Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, pp. 4–7.
- EC. 1988. Council Directive European Community (88/407/EEC).
- Foote, RH. 1996. Dairy cattle reproductive physiology research and management; past progress and future prospects (Review). *J Dairy Sci* 79:980–990.
- Frijters, ACJ., 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.
- Gil, J., Rodriques-Irazaqui, M., Lundeheim, N., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59:1157–1170.
- Herthnek, D., Eglund, S., Willemsen, PTJ., 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 Congress on Animal Reproduction. International agreement of recording practices (Recording Guidelines 2004), Section 8.1 AND 8.2, ICAR Rome, Italy.
- Jorge, MC., Catena, M., Cabodevilla, J., Soto, P. 1998. Mycobacteria in cryoperserved semen. *Vet Argentina* 15:337–340.
- 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* 38:42333–42338.
- Lemaire M., Weynants, V., Godfroid, J., Schynts, F., Meyer, G., Letesson, JJ., Thiry, E. 2000b. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol* 83:301–315.
- 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 Quart* 17:29–33.
- 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* 29:577–591.
- van Oirschot, JT., Straver, PJ., van Lieshout, JAH., Quak, J., Westenbrink, F., van Exsel, ACA. 1993. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 132:32–35.
- van Schaik, G., Schukken, YH., Nielen, M., Dijkhuizen, AA., Benedictus, G. 2001. Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: a case control-study. *Vet Quart* 23:71–76.

van Schaik, G., Schukken, YH., Nielen, M., Dijkhuizen, AA., Barkema, HW., Benedictus, G. 2002. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: cohort study. *Prev Vet Med* 54:279–289.

Visser, IJR., der Laak, EA., Jansen, HB. 1998. Failure of antibiotics gentamycin, tylosine, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma Bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology* 51:689–697.

Voges, H., Horner, GW., Rowe, S., Wellenberg, GJ. 1998. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet Microbiol* 31:165–175.

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* 54:57–67.