

CALIDAD BACTERIOLÓGICA DEL SEMEN CONGELADO Y LA FERTILIDAD DEL RODEO DE CRÍA: ESTUDIO DE CASO

Gil J¹, Giannechini RE², Ferraris A³, Blanc JE³.

¹Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria - Área Teriogenología, EEMAC-CENUR Noroeste.

²Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE-MGAP, Paysandú.

³Departamento de Salud en Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay. Ruta 3, Km 363. *Autor de correspondencia: jujogil@gmail.com.

RESUMEN

Ésta nota técnica comunica un caso clínico de infertilidad temporaria en vaquillonas Angus expuestas a IA. De 76 vaquillonas, no se obtuvo ninguna gestación producto de la IA, y luego del repaso con toros por 40 días más, sólo el 35% logró la preñez. La calidad espermática de las dosis (motilidad, morfología, concentración) fue apta, pero los estudios bacteriológicos determinaron la presencia de enterobacterias patógenas oportunistas en niveles superiores a 5000 UFC/mL. Se destaca la importancia de proceder a evaluar la calidad bacteriológica de las dosis cuando no se encuentra ninguna otra posible causa de infertilidad.

SUMMARY

This report presents a clinical case of temporary infertility in Angus heifers exposed to AI. Out of 76 heifers, none conceived after AI, and after bull's natural breeding during the next 40 days after AI, just 35% of them achieved pregnancy. The sperm quality parameters in the AI dose (motility, morphology, concentration) were suitable, but the bacteriological studies determined the presence of opportunistic pathogenic enterobacteria over 5000 CFU/mL. It is important to assess the bacteriological quality of the doses when no other reason is found as potential cause of infertility.

INTRODUCCIÓN

Ante casos de fallas reproductivas tras la inseminación artificial (IA), la calidad del

semen congelado es uno de los factores a considerar. Si la calidad biológica resulta aceptable (variables espermáticas cualitativas y cuantitativas), hay que estudiar la calidad bacteriológica (control de contaminantes) del semen. Éste aspecto es una debilidad del semen congelado en pastillas respecto del semen envasado en pajuelas. La calidad biológica del semen congelado se evalúa con más frecuencia como control de conservación, sin embargo la calidad bacteriológica es un aspecto poco informado y controlado. El efecto sobre la fertilidad de las bacterias presentes en la dosis de IA depende del desafío (cantidad) y de cuáles bacterias están implicadas. La cuantificación de bacterias mediante conteo de unidades formadoras de colonias en placa (UFC) es la metodología recomendada (Madigan et al., 2003), e informa sobre la higiene durante el procesamiento del semen. Aunque no hay legislación al respecto, se acepta internacionalmente la recomendación de la OIE de no exceder las 500 UFC, y se proponen tres rangos de contaminación (<500, 500-5000, >5000 UFC; Decuerdo 2017, comunicación personal). Ante casos de infertilidad, además de evaluar la situación reproductiva del rodeo y los factores humano-ambientales, se recomienda evaluar la calidad seminal y bacteriológica (cuanti y cualitativa) de las dosis utilizadas (Barth, 1995).

La siguiente nota técnica tiene como objetivo reportar un caso de estudio procesado en el Laboratorio de Reproducción Animal "Dr. A. Ferraris" (Facultad de Veterinaria, EEMAC-CENUR-UDELAR, Paysandú) conjuntamente con el Laboratorio Regional Noroeste DILAVE Paysandú.

MATERIALES Y MÉTODOS

El motivo de consulta fue la alta repetición de celos durante el repaso con toros (2%, A.Angus, reproductivamente aptos) al siguiente celo de la IA en el lote de vaquillonas, en un establecimiento agrícola-ganadero de ciclo completo, sito en la 5ª sección policial del Dpto. de Río Negro. El inseminador fue de idoneidad técnica evaluada.

El rodeo expuesto a IA y posterior repaso con toros (40 días) fue de 76 vaquillonas (320 kg PV) en estado corporal promedio 4 (score 1-5), vacunado y revacunado dos meses antes contra enfermedades reproductivas. El lote se sincronizó con dos dosis de prostaglandina (500 mg DL-cloprostenol, Estumate®) con un intervalo de 12 días. Durante 4 días se detectó e inseminó las hembras en celo. El rodeo se manejó como un solo lote pastoreando campo natural (formación Fray Bentos). Las vaquillonas se inseminaron con dosis no comerciales de semen de un toro del predio, congelado en pellets en un diluyente en base a lactosayema-glicerol (10,8% p/v, 20% v/v, 5% v/v; respectivamente), suplementado con ampicilina sódica como único antibiótico (100 mg/100 mL). Para la IA, los pellets se descongelaron a 37°C en tubos de vidrio con 1 mL de suero fisiológico, previamente fraccionado en jeringas de plástico de 20 mL (lavadas y reutilizadas; una vez con el suero se conservaron a 5°C hasta su uso). El fraccionamiento del suero no tuvo supervisión técnica. A los 15 días de la última IA se introdujeron dos toros por 40 días para repaso. Ante la consulta, se concurre al predio a los 45 días de la última inseminación para evaluar clínicamente (general y reproductivo) a todos los animales, incluyendo una ecografía (lineal 6,5 MHz, Vet-3000, Insavet-Uruguay) para evaluar el resultado de la IA. Ante la sospecha de malos resultados a la IA, se remitieron muestras (de suero usado en la descongelación y pellets de semen congelado) para evaluación de calidad biológica (LRA-UDELAR) y bacteriológica (DILAVE) de los mismos.

La calidad biológica se evaluó de tres pellets de semen descongelados de igual forma que para la IA, en alícuotas (10 µL) en cámara MAKLER (Haifa, Israel) mediante un sistema computarizado (CASA, Andro-

Vision® Minitube). Para la calidad bacteriológica de aerobios se usaron medios de Oxoid UK (Eleco, Montevideo), a excepción del medio Mac Conkey de HiMedia India (Teksol, Montevideo). Se realizó el aislamiento en medios sólidos Agar Sangre Base (adicionado con 5% de sangre bovina), mientras que la identificación bacteriana se determinó por evaluación macroscópica de las colonias y microscópica por la técnica de Gram, desarrollo en Agar Mac Conkey, presencia de motilidad, producción de sulfhídrico e indol en medio SIM, y crecimiento en Citrato de Simmons (Quinn et al., 2004). También se determinó recuento de bacterias viables en placa (Madigan et al., 2003), sobre Plate Agar Count en superficie de diluciones sucesivas en base 10. La preñez final se evaluó a los 45 días de retirados los toros.

RESULTADOS

Al examen clínico general, no se observaron parámetros que denotaran ninguna patología o estado de enfermedad en el rodeo. Al examen particular (ecografía y palpación transrectal) no se detectaron alteraciones visibles (corrimientos) en el rodeo, excepto en tres vaquillonas con discreto contenido uterino, pero sin detritos en vagina (mano enguantada). A la primera ecografía (45 días posterior a la IA) no se encontró ninguna vaquillona en edad gestacional correspondiente a la IA, y sólo tres con estructuras embrionarias menores de 28 días (vesícula amniótica menor a 2 cm, producto del repaso con toros). A la segunda ecografía (45 días posterior al retiro de toros), 27 vaquillonas (35,5%) estaban en gestación producto del repaso con toros.

La evaluación del semen usado en las vaquillonas descongelado de la misma forma que en la inseminación determinó que, las dosis poseían más de 6 millones espermatozoides con motilidad progresiva a la descongelación (17:129.000; 11.926.000; 7:787.000). Respecto de su morfología (frotis húmedo en formol salino), las dosis contenían 32% de anomalías morfológicas totales (24% defectos compensables, 8% defectos no compensables, y 17% acrosomas dañados).

El examen bacteriológico (DILAVE Paysandú) determinó en todas las muestras de

suero fisiológico utilizado en la IA, aislamiento de colonias de *Serratia marcescens*. De las muestras de semen descongelado se aislaron colonias de *Citrobacter freundii*. De muestras de semen descongelado en suero fisiológico se aislaron las mismas colonias combinadas de *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*. El conteo de UFC en placa determinó en todas las muestras de semen y suero fisiológico recuentos bacterianos mayores a 5000 UFC/mL.

DISCUSIÓN

Si bien la calidad biológica del semen a la descongelación reveló una amplia variación en todos sus parámetros entre los tres pellets evaluados, todos ellos superaban la dosis mínima sugerida de espermatozoides motiles ofrecidos en la IA.

Los hallazgos bacteriológicos revelaron una alta carga de microorganismos aerobios (>5000 UFC), compuestas por colonias de enterobacterias Gram negativas pertenecientes a las especies *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*. Dichas bacterias pueden considerarse como potenciales patógenos oportunistas en el medio uterino y productoras de reacción inflamatoria inespecífica debido a las lipopolisacáridos de la capa externa de la pared (endotoxinas, Quinn et al., 2004). El desafío bacteriano debe ser tenido en cuenta, hecho que se confirma como muy elevado al momento de la IA. La OIE y las normas ISO no tienen definido un límite de aceptabilidad. Hasta el año 2005 la OIE proponía un máximo de 5000 UFC/mL, pero actualmente no proponen límites para dicha variable. Los conteos superiores a 5000 UFC/mL obtenidos en muestras de semen de éste caso, y las especies de microorganismo implicados, sugieren que es probable un quebrantamiento de los mecanismos inmunitarios inespecíficos uterinos. Estas bacterias no han sido reportadas como etiología específica de metritis, pero su inoculación directa en el útero tendría capacidad patogénica oportunista (Quinn et al 2004). Debido al lapso de tiempo transcurrido entre la IA y el examen clínico, no se tomaron hisopados uterinos de las vaquillonas para confirmar la presencia de dichas bacterias en los animales, pero consideramos que es clínicamente aceptable especular que la IA resultó en un evento de contaminación

e inflamación local en útero que determinó la infertilidad transitoria del grupo de vaquillonas. Si bien en esta categoría debemos esperar resultados superiores tras el repaso con toros, las 27 vaquillonas preñadas (35,5%) demuestran que la recuperación espontánea de los animales puede ser proceso prolongado si no se instauran tratamientos adecuados.

El uso de semen congelado en pellets con antibióticos de espectro reducido representa un punto débil en la cadena de factores que impactan en los resultados. Aunque fue una metodología impulsora en el pasado, debemos advertir que los pellets se encuentran más expuestos a contaminarse que el envasado en pajuelas. Además, es importante el uso de antibióticos de amplio espectro como aditivos del medio de congelación. En éste caso, la ampicilina utilizada no tuvo efecto alguno sobre las bacterias aisladas, ya que las mismas han sido reportadas como agentes resistentes a los -lactámicos (Prescott, 2004). Es importante la utilización de diluyentes con antibióticos de amplio espectro (i.e. enrofloxacin) que contengan la posible contaminación de las dosis de semen. También es recomendable determinar la presencia de microorganismos patógenos únicamente cuando hembras fértiles fracasan en ser preñadas con semen de buena viabilidad y morfología, o cuando una historia de infertilidad implica una posible causa infecciosa (Barth, 2007).

CONCLUSION

Este caso de infertilidad total a la inseminación podemos atribuirlo al factor semen, particularmente a su calidad bacteriológica. La subsiguiente fertilidad de las vaquillonas se vio comprometida en el tiempo a su natural proceso de recuperación con los sucesivos celos.

BIBLIOGRAFÍA

- Barth AD, 1995. Evaluation of Frozen Semen by the Veterinary Practitioner. Proc. Of Bovine Short Course. Society for Theriogenology, 105-110.
- Barth AD, 2007. Evaluation of potential breeding soundness of the bull. Current Therapy in Large animal Theriogenology. Younquist RS, Threfall WR, Saunders Elsevier, pp 228-240.

• Eaglesome MD, Garcia MM, 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1), 215-225. Madigan MT, Martinko MT, Parker J, 2003. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición, Prentice-Hall, Madrid. Cap 6: Crecimiento Bacteriano, pp 137-166.

• Prescott JF, 2000. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3th Edition, Iowa State University Press, USA. Editors: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. Cap 6, pp 105-133.
• Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, 2004. Clinical Veterinary Microbiology. 6th Edition, Elsevier Mosby, UK. Cap 18: Enterobacteriaceae, pp 209-236.

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA ENZOOÓTICA EN LA MOSCA *Haematobia irritans* (MOSCA DE LOS CUERNOS) POR LA TÉCNICA DE PCR

Ana García¹, Valentina Herrera¹, Helena Guarino², Carlos Morón³.

¹Ejercicio Liberal. ²Virología. Facultad de Veterinaria Udelar. ³Clinica de Rumiantes.

RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa producida por un virus (VLB) perteneciente a la familia Retroviridae. Es una enfermedad de difusión nacional en el rodeo lechero. La mayoría de los animales infectados aparentan ser sanos, evidenciándose solamente una seroconversión frente al virus, siendo que solo un bajo porcentaje de ellos desarrolla la forma tumoral letal, el linfosarcoma. La transmisión ocurre de forma horizontal y en menor medida (15%) de forma vertical. En la transmisión horizontal es importante la transmisión de sangre de un animal infectado a un animal sano, estando implicadas prácticas de manejo y algunas prácticas veterinarias así como la acción de insectos hematófagos. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia del virus de LBE en *Haematobia irritans* a través de la técnica de PCR. Se analizó un total de 19 vacas (n=19) seropositivas a ELISA indirecto, se tomó una muestra de sangre de cada una y las moscas que tenían. De las muestras de sangre analizadas 13 resultaron positivas a VLB por PCR; y de las muestras de moscas, dos de ellas dieron positivo. Las muestras positivas de moscas coincidieron con vacas también positivas a PCR. Se determinó que el uso de dos pares de cebadores del gen env (PCR anidado) aumentó la sensibilidad

de la prueba. Se detectó por primera vez la presencia del VLB en la mosca *Haematobia irritans*.

SUMMARY

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is an infectious disease caused by a virus (VLB) belonging to the family Retroviridae. It is a disease spread nationally in the dairy herd. Most of the infected animals appear to be healthy, showing only seroconversion to the virus, with only a low percentage of them developing the lethal tumor form, lymphosarcoma. Transmission occurs horizontally and to a lesser extent (15%) vertically. In horizontal transmission it is important to transmit blood from an infected animal to a healthy animal, involving management practices and some veterinary practices as well as the action of hematophagous insects. The objective of this work was to detect the presence of the LBE virus in *Haematobia irritans* through the PCR technique. A total of 19 cows (n = 19) seropositive to indirect ELISA were analyzed, a blood sample was taken from each and the flies they had. Of the blood samples analyzed 13 were positive to VLB by PCR; And of the flies samples, two of them tested positive. Positive samples of flies coincided with cows also positive for PCR. The use of two pairs of env gene primers (nested PCR) was determined