

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Determinación de resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas en semen de ganado bovino post congelación en los estados de Sinaloa y Durango”

**Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

Gema Zaharina Vidaca Valdez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gaxiola

ASESORES:

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho.

MC. Higinio Cepeda Quintero.

MC. Claudia Leonor Barraza Tizoc.

MC. Daniel Eduardo Zatarain.

Culiacán, Sinaloa, México; a Octubre de 2022

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **GEMA ZAHARINA VIDACA VALDEZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**(SELLO DE
POSGRADO)**

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA. DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CODIRECTOR DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

ASESORA DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESOR MC. HIGINIO CEPEDA QUINTERO

ASESORA MC. CLAUDIA LEONOR BARRAZA TIZOC

ASESOR MC. DANIEL EDUARDO ZATARAIN

CULIACÁN, SINALOA, OCTUBRE DE 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa el día 10 del mes Octubre del año 2022, la que suscribe Gema Zaharina Vidaca Valdez alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias con número de cuenta 120302-7 de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enriquez Verdugo y cede los derechos del trabajo titulado "Determinación de resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas en semen de ganado bovino post congelación en los estados de Sinaloa y Durango", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


Gema Zaharina Vidaca Valdez

Nombre completo y firma



REPOSITORIO INSTITUCIONAL

UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.



DEDICATORIA

Con orgullo, amor y admiración, a mi familia. A mis padres, Zaharina y Patricio y a mi hermana y cuñado Patricia y Christian, que durante estos años han estado a mi lado poniendo su confianza en mí, apostando por mí siempre y apoyando mis sueños sin importar que tan grandes o inalcanzables parezcan, por cuidar de mí y darme un motivo para salir adelante.

A mi Patito, sé que apenas eres un bebé y que vas a tardar mucho en poder leer esto, pero quiero que sepas que por ti terminé esto, me devolviste las ganas de vivir, te amo por y para siempre.

AGRADECIMIENTOS

Detrás del desarrollo de este trabajo de tesis hubo muchas vivencias y aprendizajes, agradecimientos y sentimientos encontrados al poder concretar este camino de estudio y poder ver los frutos de este al fin reflejados, más que como un término, en el comienzo de una gran realización personal, es por esto por lo que quiero agradecer a la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y al MC. Higinio Cepeda Quintero por permitirme formar parte de la familia del laboratorio de Bacteriología y Micología, por ser otro par de papás y brindarme su apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio, gracias por confiar en mí, por darme su tiempo, cariño y palabras adecuadas en todo momento. A la Dra. Sonia Soto y Maribel Maldonado de CIAD Mazatlán, por permitirme realizar mi estancia académica y permitirme aprender de ustedes. Al MVZ. Octavio Maldonado, al MVZ. Roberto Rivera, MVZ Rosario Rivera y MVZ Daniela Gerardo por la donación de muestras para el presente trabajo. A los prestadores de servicio social del laboratorio de Bacteriología y Micología, Fernanda Medrano y Sergio Cruz, por permitirme adoptarlos como mis hijos académicos, por apoyarme, escucharme, y ser de ayuda siempre. Y, por último, pero no menos importantes, Abril, Eunice, Melissa y Javier, gracias por sostenerme, por no dejarme caer y por impulsarme cuando sentía que no podía más, gracias por tanto, sin ustedes no estaría donde estoy en este momento.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE CUADROS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	13
2.1 Propiedades del semen de ganado bovino	13
2.2 Inseminación artificial	15
2.3 Colección de semen de bovino	16
2.3.1 Vagina artificial	17
2.3.2 Método de electro eyaculador.....	18
2.3.3 Masaje transrectal	19
2.4 Criopreservación seminal	20
2.5 Agentes patógenos presentes en semen de bovinos	21
2.6 Diluyentes seminales	24
2.6.1. Leche descremada.....	24
2.6.2 Yema de huevo	25
2.6.3 Bioxcell®.....	25
2.6.4 Biladyl®	25
2.6.5 Triladyl®	26
2.6.6 Androstar Plus®	26
2.6.7 AndroMed®.....	26
2.6.8 Optixcell®	26
2.6.9 Sterydil®	26
2.7 Adición de antimicrobianos a diluyentes seminales.....	26
2.8 Efecto de los antimicrobianos en semen.....	27
2.9 Resistencia bacteriana.....	28
2.9.1 Mecanismos de resistencia	29
2.9.2 Elementos móviles de la resistencia adquirida.....	30
2.9.3 Inactivación del antibiótico	30
2.9.4 Alteración del sitio blanco del antibiótico.....	31
2.9.5 Barreras de permeabilidad.....	31
2.10 Antecedentes directos	32

III.	HIPÓTESIS	35
IV.	OBJETIVOS	36
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
	5.1 Descripción del área de estudio.....	37
	5.2 Diseño del estudio	38
	5.3 Definición de la población.....	38
	5.4 Obtención de la muestra	38
	5.5 Procesamiento de la muestra	38
	5.6 Cuantificación bacteriana (UFC/ml).	38
	5.7 Identificación bacteriana.....	39
	5.7.1 Pruebas bioquímicas	39
	5.7.2 Frotis fijo y tinción Gram	40
	5.8 Susceptibilidad a antibióticos	40
	5.9 Análisis estadístico	41
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
VII.	CONCLUSIONES.....	62
VIII.	LITERATURA CITADA	63
IX.	ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Conteo de las unidades formadoras de colonia por mililitro.	44
Cuadro 2. Observación macroscópica, microscópica y reacción a la tinción Gram de las cepas aisladas a partir de las muestras del estado de Sinaloa.....	45
Cuadro 3. Observación macroscópica, microscópica y reacción a la tinción Gram de las cepas aisladas a partir de las muestras del estado de Durango.....	46
Cuadro 4. Pruebas bioquímicas de las bacterias Gram positivas y negativas	50
Cuadro 5. Cepas presentes por muestra.....	51
Cuadro 7. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida por cepa y tratamientos.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Gráfica de interacción de antibióticos y bacterias.....	57

RESUMEN

Identificación de resistencia a antimicrobianos en bacterias encontradas en semen post congelación en el ganado bovino en los estados de Sinaloa y Durango

Gema Zaharina Vidaca Valdez

La identificación y control de agentes bacterianos contaminantes del semen bovino, así como las técnicas de dilución y preservación de este, y el uso de antibióticos como aditivos en diluyentes para asegurar la calidad sanitaria de los espermatozoides se ha venido cuestionando recientemente al igual, los efectos nocivos de estos fármacos sobre la calidad espermática y su eficacia para el control del crecimiento bacteriano en el semen conservado. El objetivo del presente trabajo fue determinar la resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas de los estados de Sinaloa y Durango. Se obtuvieron 18 muestras de semen congelado de diferentes sementales de ganado bovino de los estados de Sinaloa y Durango. Se cuantificó el número de bacterias presentes en el semen y se aislaron en agar sangre. Se observó morfología macroscópica colonial, se les realizó tinción Gram y pruebas bioquímicas para su identificación por comportamiento metabólico, y se observó la resistencia y la sensibilidad a antimicrobianos. La cuantificación bacteriana llegó hasta 3,280 UFC/ml, de estas se aislaron 14 cepas, de las cuales 6 fueron Gram positivas, donde se identificaron a *Enterococcus* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp y *Micrococcus* spp y 8 fueron Gram negativas, las cuales se identificaron como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Serratia* spp, *Citrobacter* spp y *Proteus* spp, *Escherichia coli*. La microbiota Gram positiva resultó con multirresistencia antimicrobiana, principalmente a los aminoglucósidos, betalactámicos y cefalosporinas en un 90, 80 y 80% respectivamente, y sensibilidad a las sulfonamidas, así como la microbiota Gram negativa mostró resistencia por lo menos un antimicrobiano de las familias de los aminoglucósidos, anfenicoles, betalactámicos, cefalosporinas y sulfonamidas, las cuales mostraron sensibilidad variada. La presencia de bacterias multirresistentes en semen post congelado puede indicar una contaminación cruzada debido a las bacterias comensales y en algunos casos al mal manejo.

Palabras clave: Resistencia, sensibilidad, bacterias, semen, bovinos.

ABSTRACT

The identification and control of contaminating bacterial agents in bovine semen, as well as semen dilution and preservation techniques, and the use of antibiotics as additives in diluents to ensure the sanitary quality of spermatozoa have recently been questioned, as well as the harmful effects of these drugs on sperm quality and their efficacy in controlling bacterial growth in preserved semen. The objective of this study was to determine the antimicrobial resistance of bacteria isolated from bovine semen in the states of Sinaloa and Durango. Eighteen frozen semen samples were obtained from different beef cattle sires from the states of Sinaloa and Durango. The number of bacteria present in the semen was quantified and isolated on blood agar. Colonial macroscopic morphology was observed, Gram staining and biochemical tests were performed for their identification by metabolic behavior, and resistance and sensitivity to antimicrobials were observed. Bacterial quantification reached 3,280 CFU/ml, of which 14 strains were isolated, of which 6 were Gram positive, where *Enterococcus* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp and *Micrococcus* spp and 8 were Gram negative, which were identified as *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Serratia* spp, *Citrobacter* spp and *Proteus* spp, *Escherichia coli*. Gram-positive microbiota showed antimicrobial multiresistance, mainly to aminoglycosides, beta-lactams and cephalosporins in 90, 80 and 80%, respectively, and sensitivity to sulfonamides, and Gram-negative microbiota showed resistance to at least one antimicrobial from the families of aminoglycosides, amphenicols, beta-lactams, cephalosporins and sulfonamides, which showed varied sensitivity. The presence of multidrug-resistant bacteria in post-frozen semen may indicate cross-contamination due to commensal bacteria and in some cases mishandling.

Key words: Resistance, sensitivity, bacteria, semen, bovine.

I. INTRODUCCIÓN

A partir de 1899, la práctica de inseminación artificial en bovinos ha ido en aumento, esto deja la duda de si hay un control efectivo de microorganismos en el semen; la identificación y control de agentes bacterianos contaminantes del semen bovino, así como las técnicas de dilución y preservación de este, son objeto de numerosas investigaciones (Santos y Silva, 2020; Ugur *et al* 2019). La recolección de semen en especies de animales de granja no es un procedimiento estéril; en condiciones normales, no hay microorganismos en el semen, pero los contaminantes pueden ser introducidos al semen a través de la recolección, por una vagina, lubricante no estéril, etc (Santos y Silva, 2020; Moore y Hasler, 2017). Actualmente se busca mejorar la calidad del semen congelado; un punto importante para incrementar este aspecto es la determinación de la cantidad de bacterias, género y especies pues es conocido que al incrementarse la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias/mililitro (UFC/ml) la motilidad del espermatozoide tiende a disminuir y los microorganismos aislados del semen compiten con los espermatozoides por los nutrientes, además de producir ácido sulfhídrico, urea, y diversas toxinas las cuales tienen efectos adversos sobre la viabilidad de los espermatozoides; a pesar de ser la inseminación artificial una herramienta confiable para el mejoramiento genético y para controlar enfermedades venéreas en el ganado bovino se ha demostrado cuando el programa de inseminación artificial no es adecuado para las condiciones de la granja, tiende a disminución de la eficiencia reproductiva (Baruselli *et al.*, 2018). La reproducción juega un papel importante para garantizar la eficiencia de la producción animal pues los mejores sementales sólo pueden ser ampliamente explotados mediante el uso de técnicas reproductivas como la inseminación artificial (IA), asociadas con la tecnología del semen esta permite al material genético conservado se utilice en hembras aisladas de los machos; esto maximiza la disponibilidad del germoplasma y facilita la mejora genética (Morrell y Mayer, 2017; Yániz *et al.*, 2010). Aún con el uso de inseminación artificial no se está exento de la presencia de microorganismos en semen, dichos microorganismos pueden afectar la función reproductora masculina directamente, causando la aglutinación de

espermatozoides móviles, reduciendo la capacidad de reacción acrosómica y provocando alteraciones en la morfología celular (Ahmed *et al.*, 2018; Azawi e Ismaeel, 2012). La contaminación microbiana del semen es un parámetro de calidad utilizado para asegurar el éxito de la inseminación artificial; en condiciones normales, el semen no tiene microorganismos, pero se contamina en los procesos de colecta por la microbiota presente en el tracto reproductivo, estos microorganismos pueden ser responsables de alteraciones en los espermatozoides durante los procesos de criopreservación (Morrell *et al.*, 2019; Fraczek y Kurpisz 2015). Las bacterias están presentes en cada eyaculado y el objetivo de obtener semen estéril es obviamente una tarea fuera de alcance, estas pueden acceder a él semen como resultado de la bacteriemia, debido a la infección en partes del tracto genital o pueden ser asociados con células sanguíneas o con inflamación o trauma del tracto urinario y la cavidad prepucial (Duracka *et al.*, 2021). Existen diversos métodos para tratar de contrarrestar el desarrollo de microorganismos patógenos en el semen, estos pueden ser la congelación seminal, la dilución de semen con diluyentes estériles, centrifugación de los recolectados y tratamiento del semen con ozono; potenciar las medidas higiénicas durante la recolección seminal y el procesamiento evitarán la contaminación seminal, sin embargo es inusual encontrar instrumentos especiales para la esterilidad como campanas de flujo de aire laminar equipadas con filtros de aire en las estaciones de colecta de semen y aún más inusual, encontrar este tipo de equipos en las granjas (Morrell y Wallgren, 2014). Para minimizar los efectos de las bacterias sobre los espermatozoides a largo plazo, los diluyentes seminales cuentan con antibióticos encargados de inhibir el desarrollo de estas bacterias (Santos y Silva, 2020). Los microorganismos causan la aglutinación de los espermatozoides móviles y la reducción en la capacidad de reacción del acrosoma, así como alteraciones en la morfología celular (Azawi e Ismaeel, 2012). Dentro de estos agentes bacterianos presentes en semen se destaca la presencia de *Proteus* spp, grupos de *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Escherichia coli*, entre otros coliformes como los tipos predominantes de bacterias en el semen recién colectado (Duracka *et al.*, 2020). Existen diversos métodos para tratar de contrarrestar el desarrollo de

microorganismos patógenos en el semen como el agregar antimicrobianos a los diluyentes seminales, pero este método se ha mostrado ineficaz para erradicar la carga bacteriana pues diversos autores han reportado la presencia de estos agentes patógenos multirresistentes en el semen post congelación (Santos y Silva, 2020), como Abro *et al.* (2016) quienes aislaron *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius* a partir de semen de bovino post congelado en Pakistán, dichos aislados mostraron resistencia a trimetoprim con sulfametoxazol, amoxicilina y cefalexina. El objetivo del presente trabajo fue determinar la resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas del semen de bovinos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Propiedades del semen de ganado bovino

Los componentes importantes del semen eyaculado son, naturalmente, los espermatozoides (Silva *et al.*, 2012). En ausencia de ellos, el semen es simplemente plasma seminal y carece de las características vitales en las cuales se centra la función principal de la reproducción del macho, la fertilización (Sathe, 2021). El semen normal del toro, eyaculado recientemente, con espermatozoides activos y móviles, presenta un movimiento en ondas característico el cual, examinado entre las paredes de un recipiente de vidrio, presenta el aspecto de "hervor" (Dalton, 2013). El número de células espermáticas en un volumen dado de fluido seminal modifica su aspecto; una muestra fluida y translúcida contiene un número bajo de células espermáticas (5×10^7 - 8×10^7 millones/ml de semen), mientras la muestra sea opaca y densa contiene por lo general concentraciones relativamente altas de espermatozoides (200-300 millones/ml de semen) (Chaveiro *et al.*, 2006). A diferencia de las bacterias, los espermatozoides no tienen organelos intracelulares para ayudar en la modificación de la fluidez de la membrana plasmática para la supervivencia, en consecuencia, la exposición a unos cuantos grados por encima de la temperatura corporal es suficiente para que se produzca la muerte de los espermatozoides (Sathe, 2021).

Color: La mayor parte del semen de toros son blanco lechosos, variando hacia un color crema. Sin embargo, algo más del 10% de los toros producen un semen normalmente amarillo (Silva *et al.*, 2012). Se ha estudiado el pigmento responsable del color, llegando a la conclusión de que el color amarillo es una característica normal del semen de muchos toros, no altera las células espermáticas y carece de influencia en la fertilidad del toro (Dalton, 2013; Chaveiro *et al.*, 2006).

Volumen: El volumen del eyaculado varía de 5 a 15 ml, en los distintos toros y en diferentes momentos para cada toro (Sathe, 2021). En general, el volumen aumenta de 1 a 2 ml con la edad y el tamaño corporal del toro y se modifica con su salud y vigor reproductor y con la frecuencia de los servicios de 2 a 3 ml menos por eyaculado (Chaveiro *et al.*, 2006). Los toros jóvenes, inmediatamente después de su entrada en servicio, producen solamente de 1 a 2 ml menos en cada eyaculado de semen, mientras los toros totalmente desarrollados y vigorosos, con peso mayor a 907 kg o más, producen 10 a 15 ml e incluso más en cada eyaculado. Las observaciones permanentes sobre los mismos toros han demostrado una tendencia hacia volúmenes más pequeños tras la madurez completa en un promedio de 13 ml (Sathe, 2021).

Concentración de células espermáticas: El número de espermatozoides por unidad de volumen del semen de toro en la azoospermia completa, varía entre cero a más de 2×10^8 de células/ml en muestras muy densas (Chaveiro *et al.*, 2006). En general, la concentración varía de 5×10^7 a 3×10^8 millones de células/ml, con el desarrollo sexual, y la madurez del toro, con el régimen de alimentación y con el estado de salud reproductiva y tamaño de los testículos (Silva *et al.*, 2012).

pH: El pH del semen de toro recientemente eyaculado depende de las proporciones variables de las diversas secreciones implicadas (Sathe, 2021). La mayoría de las muestras normales se hallan en el lado ácido de la neutralidad, oscilando desde pH de 6.5 a 6.9, con una media de 6.75, aunque el pH varía en un rango amplio, desde alrededor de 6.0 o más bajo a 8.0 o ligeramente mayor (Dalton, 2013). El semen de buena calidad es generalmente más ácido comparado con el semen a concentraciones bajas de células espermáticas (Chaveiro *et al.*, 2006). El semen de mala calidad contiene una cantidad proporcionalmente mayor de líquido procedente

de las glándulas uretrales y accesorias. Los espermatozoides descomponen la fructosa del semen en ácido láctico en condiciones anaeróbicas (los tubos de colecta), el pH del semen disminuye probablemente con el tiempo transcurrido entre la colecta y la determinación (Sathe, 2021).

2.2 Inseminación artificial

El sector ganadero ha buscado mejorar la productividad de carne, leche y rusticidad, por medio de los cruzamientos, lo cual ha conllevado al deterioro de las líneas raciales, repercutiendo en la disminución de calidad y cantidad de producción, e influyendo directamente en la rentabilidad, actualmente, el mejoramiento genético a través del uso de biotecnologías ha sido un aliado clave para los ganaderos de todo el país y estos alcancen una alta productividad en sus hatos y cuenten con animales eficientes, sanos y con una buena capacidad reproductiva (Stojkovic, 2020; Anzar *et al.*, 2011). La inseminación artificial es una de las técnicas utilizadas con esta finalidad, esta técnica se ha utilizado a lo largo de los años, este recurso permite a los ganaderos la mejora en el control sobre su ganado y se asegura el mejoramiento genético con base al tipo de producción, la reducción en la diseminación de enfermedades infecciosas, entre otras cosas; la inseminación artificial es un proceso asistido de reproducción, el cual consiste en depositar manualmente el semen en el tracto reproductivo de la hembra y representa una gran importancia en el mejoramiento genético de los bovinos, en el acceso a animales de altas producciones y en su competitividad en el mercado (Goshme *et al.*, 2021; INTAGRI, 2020; Marizacén-Silva y Artunduaga-Pimentel, 2017). Es una actividad la cual consiste en depósito de manera artificial de dosis de semen en el tracto reproductivo de la hembra en el momento más adecuado, esto permite una alta probabilidad de gestación en la vaca; los procedimientos correctos de inseminación artificial tendrán como resultado una mayor eficiencia reproductiva, lo cual beneficia también los aspectos económicos como la producción de leche o de carne, es por lo cual la inseminación artificial, a pesar de poseer una menor tasa de preñez en comparación con el encaste natural, cerca del 70%, se ha convertido en la técnica preferida de los ganaderos; aun así, es innegable la relevancia de la inseminación artificial en el

mejoramiento de los parámetros reproductivos y productivos de la ganadería mundial (Selvaraju *et al.*, 2018; Giraldo, 2017; Marizacén-Silva y Artunduaga-Pimentel, 2017). Dentro de las ventajas presentes en el uso de inseminación artificial se encuentran el mejoramiento genético, la reducción o eliminación de machos en las explotaciones, el uso de machos incapacitados por lesiones o edad y el control de transmisión de enfermedades de transmisión sexual (Baruselli *et al.*, 2018; Anzar *et al.*, 2011). La importancia económica de la inseminación para el ganadero, radica en mejor rendimiento de sus animales, pues al utilizar esta biotecnología de reproducción asistida, puede controlar algunas actividades como: llevar a cabo programas de cruzamientos para optimizar la eficiencia reproductiva de sus animales, implementar sistemas de registros sencillos y funcionales, y en general optimizar mejor los recursos de su Unidad de Producción Animal (UPA) de esta manera contribuye al rendimiento de sus ganancias (Moore y Hasler, 2017; Giraldo, 2017). En 2020, el semen bovino fue un producto altamente comercializado en el mundo, por un total de \$513 millones de pesos, entre 2019 y 2020 las exportaciones de semen bovino crecieron en un 13.4%, desde \$453 hasta \$513 millones de pesos, el comercio de semen bovino representa 0,0031% del total de comercio mundial; en 2020 a nivel mundial, los principales países exportadores de Semen de Bovino fueron Estados Unidos (US \$255M), Canadá (US \$87.7M) y Países Bajos (US\$37.9M). En el mismo año, los principales países importadores de Semen de Bovino fueron China (US \$60.6M), Reino Unido (US\$38.3M) y Brasil (US \$37.3M) (Stojkovic, 2020).

2.3 Colección de semen de bovino

La recolección del semen constituye la base preliminar de la fecundación artificial y el problema tecnológico más complejo y delicado, por múltiples razones; debido a ello la recogida ha sido objeto de constantes estudios por parte de los investigadores, con el fin de asegurar la elaboración de artificios cada vez más adecuados y de asegurar la obtención de la masa total del eyaculado sin alterar sus condiciones de pureza e integridad, así como sus propiedades biológicas, sin crearle perjuicios de ningún tipo al macho (Mejía, 2017; Morrillo *et al.*, 2012). Son

varios los métodos utilizados para la recolección del esperma, dentro de los más comunes y estudiados se encuentran la vagina artificial, la electro eyaculación y el masaje transrectal (Madera y Rivera, 2019).

2.3.1 Vagina artificial

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35–40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 ° C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyaculación (Morillo *et al.*, 2012). Para la monta se utiliza un señuelo, este puede ser una vaca, un macho o un maniquí (Zoca *et al.*, 2021). Antes de colectar el semen se debe tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental, en este sentido, se apoya con el método más efectivo para estimular al toro, la monta falsa, consiste en permitir al semental montar sobre el señuelo y desviar el pene tomando con la palma de la mano la piel del prepucio sin ofrecerle la vagina (Madera y Rivera, 2019; Burroughs *et al.*, 2013). Después de algunos segundos de intento de búsqueda de la vagina, el animal desciende; nunca se deberá tocar con la mano la mucosa del pene (Rego *et al.*, 2015). En el siguiente intento de monta se coloca la punta del pene desviado en la entrada de la vagina, inmediatamente el toro se lanza hacia delante en un empuje final el cual acompaña a la eyaculación; el área de recolección de semen debe contar con un puesto de monta, piso sólido y anti derrapante, defensas de seguridad y un ambiente de trabajo acorde con la actividad realizada (evitar ruidos y distracciones), además debe estar ubicado cerca del laboratorio (Zakosek *et al.*, 2021; Morillo *et al.*, 2012). La eyaculación del bovino se considera monofásica, después de la eyaculación el animal desmonta casi inmediatamente, entonces, se procede a retirar el tubo graduado (conteniendo el eyaculado), protegiéndolo debidamente de la luz solar directa, cambios drásticos de temperatura (choque térmico) y contaminación, se identifica la muestra y se entrega en el laboratorio para su procesamiento inmediato (Morillo *et al.*, 2012). La recolección de semen por vagina artificial también permite

la observación de la conducta sexual y el apareamiento; la recogida de semen usando este método requiere la participación activa del toro y muy cerca se aproxima a una situación natural, permitiendo la evaluación de la libido o capacidad de servicio (Zoca *et al.*, 2021; Rego *et al.*, 2015).

2.3.2 Método de electro eyaculador

En este método se hace uso de un electro eyaculador es un electrodo conectado a una batería para generar estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios (Morillo *et al.*, 2012). Los electro eyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación (Zakosek *et al.*, 2021). Un sistema de electroeyaculación está constituido por los siguientes componentes: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección (Burroughs *et al.*, 2013). Con la utilización del electro eyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha (Mejía, 2017). Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa de la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (emisión) (Morillo *et al.*, 2012). Por otro parte, la respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpático para provocar la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculo isquiocavernoso, bulbo esponjoso y uretral), lo cual resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha (Rego *et al.*, 2015). Antes de la utilización del electro eyaculador se procede a la preparación del animal, lo cual incluye: recortar los pelos del orificio prepucial y limpiarlo, si es necesario se debe lavar y secar cuidadosamente el área (Mejía, 2017). Un ayudante procede a limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal las glándulas

acesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y, posteriormente, se introduce el electrodo adecuado (Morillo *et al.*, 2012). Se debe tener preparado con anticipación el material a utilizar para la recolección del semen (un embudo colector el cual conduce el semen a una bolsa o tubo de ensayo estéril) (Zakosek *et al.*, 2021). La primera porción del eyaculado incolora no se debe coleccionar, se coleccionará cuando sea de color cremoso u opalescente (Madera y Rivera, 2019). Posteriormente de haberlo recolectado se evitará directamente los rayos de luz, mientras se traslada al laboratorio (Burroughs *et al.*, 2013). Si se cuenta con reproductores de alto valor genético y se desea obtener el mayor número de dosis de semen de alta calidad a fin de transmitir esas cualidades a un mayor número de descendientes, se dispone de dos recursos para aumentar el número de espermatozoides recogidos por unidad de tiempo, ellos son: la preparación sexual previa a la colección, cuyas ventajas son reconocidas y el aumento de la frecuencia de eyaculación (Morillo *et al.*, 2012).

2.3.3 Masaje transrectal

Esta técnica requiere dos personas, una para efectuar el masaje rectal y otra para coleccionar el semen. El toro se ubica y mantiene en una manga o prensa (Madera y Rivera, 2019). Después de remover completamente las heces del recto, este método consiste, en esencia, aplicar un masaje longitudinal repetitivo hacia delante y atrás, principalmente sobre la terminación de los canales deferentes, de las vesículas seminales y de la región de la próstata, introduciendo la mano y el antebrazo en el recto del animal (Rego *et al.*, 2015). Ocasionalmente el fluido del semen hacia la uretra pélvica, al iniciarse la pulsación del músculo uretral, el masaje deberá continuar en sincronía con las pulsaciones mientras otra persona recoge con una probeta de vidrio; aquellos reproductores con un adecuado descanso sexual son dóciles y se manejan con calma, son buenos candidatos para esta técnica (Zoca *et al.*, 2021). También se recomienda en animales con lesiones dolorosas en cuartos posteriores (Morillo *et al.*, 2012). La ventaja de esta técnica es por evitar el dolor potencial por el electro eyaculador y el no requerir un equipo costoso (Burroughs *et al.*, 2013). Sin embargo; posee varias desventajas y quizás no sea práctica en todas

las situaciones, algunas de las desventajas incluyen irritación de la mucosa rectal, falta de protrusión del pene donde resulta en muestras contaminadas desde el prepucio, la necesidad de una segunda persona para la colección de la muestra y la dificultad de estimular machos excitados o de mal carácter (Madera y Rivera, 2019). Tiene además el inconveniente, de requerir de un operador con gran destreza en palpación por vía rectal del tracto reproductivo de los toros. La libido y la capacidad de apareamiento no son evaluadas con esta técnica, las muestras pueden contaminarse y el volumen y la concentración de semen obtenido son muy variables (Burroughs *et al.*, 2013).

2.4 Criopreservación seminal

La crioconservación es una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido; esta tecnología constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Medina-Robles *et al.*, 2006). Los efectos de la crioconservación sobre la función espermática y la fertilidad son ampliamente estudiados y descritos, particularmente en bovinos (Arango *et al.*, 2017). Un gran número de protocolos de congelación se han desarrollado, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies animales, como respuesta a las tasas de congelación y descongelación empleadas (Moore y Hasler, 2017). Por esta circunstancia, las técnicas y procedimientos actuales deben ser validados empleando el semen de la especie de interés, para de esta forma lograr su conservación a largo plazo sin afectar significativamente su capacidad fecundante (Bhattacharya, 2018). El éxito de la criopreservación del semen depende de muchos factores interrelacionados como la calidad del semen, la composición del diluyente, el crioprotector, el enfriamiento, la dosificación, la descongelación, la variabilidad individual y la interacción de todos estos componentes; esta tecnología constituye una herramienta para el establecimiento de bancos de germoplasma los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Ibáñez *et al.*, 2016). El proceso de criopreservación propiamente dicho se desarrolla en diversas etapas también

llamado protocolos: la dilución seminal, la refrigeración la cual permite llevar los espermatozoides de temperatura fisiológica a un rango entre 4-7 °C en espacios promedio de 3 h y su principal objetivo es disminuir el metabolismo espermático, la adición del crioprotector (sustancia encargada de evitar la formación de hielo intracelular) es importante para minimizar el daño criogénico y su aplicación depende del protocolo empleado pues existen de 1 y 2 pasos, la congelación se realiza con nitrógeno líquido o con equipos especializados, donde se exponen las pajillas a temperaturas bajas (vapores de nitrógeno/15–30 min) o equivalentes y posteriormente se sumergen al nitrógeno líquido (-196 °C). La descongelación si bien es lo opuesto al proceso de criopreservación, se puede considerar un proceso inherente al mismo y esencial para recuperar la viabilidad del tejido congelado (Wiebke *et al.*, 2021; Arango *et al.*, 2017). Durante esta congelación-descongelación del espermatozoide se pueden presentar cambios importantes en la capacidad fecundante en particular a nivel metabólico, acrosomal, genético, de membrana o mitocondrial (Ugur *et al.*, 2019). La importancia de la dilución y criopreservación seminal en el impacto de biotecnologías como inseminación artificial, transferencia de embriones, fertilización *in vitro* e inyección intracitoplasmática de espermatozoides ha permitido el mantenimiento de la fertilidad y mejoramiento genético en sistemas de producción ganadera (Moore y Hasler, 2017). Igualmente, la criopreservación espermática es considerada una de las técnicas más importantes de preservación de recursos genéticos animales en bovinos (Bhattacharya, 2018).

2.5 Agentes patógenos presentes en semen de bovinos

Los agentes bacteriológicos tienen una temperatura adecuada para su crecimiento, si estos son expuestos a temperaturas ambientales por encima de su temperatura óptima, aumenta la fluidez de la membrana plasmática y el crecimiento disminuye y a determinada temperatura, sin compensación adicional, puede llevar a la muerte celular (Medo *et al.*, 2021; Lizarbe, 2009). Los toros sanos tienen una microbiota saprófita en el prepucio la cual puede contaminar el semen durante el eyaculado y su colecta (Duracka *et al.*, 2021). El control bacteriológico del semen de bovino

cobra un interés especial en la inseminación artificial, pues esta técnica constituye la vía más eficaz para mejorar la calidad genética y prevenir o eliminar enfermedades venéreas mas no está exenta de riesgos, pues la técnica preserva las células espermáticas y también preserva los agentes bacterianos pues los componentes nutritivos utilizados en los diluyentes de semen favorecen el desarrollo y supervivencia de estas, lo cual trae como consecuencia acumulación de toxinas y productos del metabolismo bacteriano, los cuales tienen un efecto espermicida directo (Duracka *et al.*, 2021; Fraczek y Kurpysz, 2015). El semen puede contaminarse por microorganismos procedentes de los testículos o de los órganos anexos, al igual por los organismos existentes en la orina y en la cavidad prepucial del toro, también puede contaminarse por la sangre o líquidos tisulares extravasados en el aparato urogenital o incluso en la colecta seminal, aunque en la mayoría de los casos son parte de la microbiota natural, también existen bacterias oportunistas o patógenas capaces de producir infecciones genitales en hembras inmunosuprimidas y disminuir la sobrevivencia y capacidad fecundante de las células espermáticas (Medo *et al.*, 2021; Rana *et al.*, 2012). Los contaminantes bacterianos del semen pueden conducir a la producción de numerosos macrófagos y granulocitos polimorfonucleares como primera línea de defensa contra la bacterias en el semen y esto a su vez conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (del inglés, ROS) la presencia de espermatozoides muertos incrementa la generación de ROS en semen; mayor presencia de ROS deteriora las funciones de los espermatozoides y la capacidad de fertilización (Perumal *et al.*, 2013). Los microorganismos pueden causar la aglutinación de los espermatozoides móviles y la reducción en la capacidad de reacción del acrosoma, así como alteraciones en la morfología celular (Azawi e Ismaeel, 2012). Dentro de estos agentes bacterianos presentes en semen se destaca la presencia de *Proteus* spp, grupos de *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Escherichia coli*, entre otros coliformes como los tipos predominantes de bacterias en el semen recién colectado (Duracka *et al.*, 2020). Gangwar *et al.* (2021) y Reda *et al.* (2020) evidenciaron las proporciones de la motilidad, integridad de la membrana plasmática e integridad acrosomal son influenciadas negativamente por un aumento

en la contaminación bacteriana del semen. La presencia de *Escherichia coli* es perjudicial para el esperma pues causa la aglutinación de los espermatozoides en toros, disminuye la motilidad espermática y provoca daños estructurales a la membrana plasmática del espermatozoide, también se describe las bacterias hemolíticas presentes en el semen como *Streptococcus* spp, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* causan una disminución de la motilidad del espermatozoide durante el almacenamiento; los estreptococos y coliformes con frecuencia producen ovaritis, metritis, esterilidad y aborto en hembras, de la misma forma los toros albergan *Pseudomonas aeruginosa* en sus tractos reproductivos, tienden a tener crías deficientes (Medo *et al.*, 2021; Duracka *et al.*, 2021; Althouse *et al.*, 2008; Trujillo y Rivera, 2002). Las principales enfermedades infecciosas las cuales afectan al ganado bovino y tiene repercusiones en la reproducción son la tricomoniasis causada por *Tritrichomona foetus*, se puede transmitir por monta natural y por inseminación artificial; la campilobacteriosis, causada por *Campylobacter* subespecie *foetus*, *veneralis*, de la misma forma puede transmitirse por monta natural e inseminación artificial y los machos tampoco presentan signos clínicos aparentes, las hembras presentan infertilidad o estro largo donde varía de los 25 a los 65 días, abortos entre el 3er y 6to mes y endometritis (Michi *et al.*, 2016). La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa conocida por ser zoonótica, es causada por *Brucella abortus*, se transmite vía, transplacentaria y por inseminación artificial, en machos provoca problemas articulares y reproductivos, en hembras provoca abortos entre el 6to y 9no mes, retención placentaria y muerte de recién nacidos (Olsen y Tatum 2010). La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa la cual produce entre otras alteraciones, abortos y muerte de terneros jóvenes. Es una zoonosis causada por *Leptospira interrogans*, puede ser transmitida congénitamente, o neonatal (Aymée *et al.*, 2021). La diarrea viral bovina (BVD) es una enfermedad viral causada por el *Pestivirus*, se puede transmitir por entrar en contacto con fetos, placenta o semen, los signos reproductivos se observados antes de los 100 días de gestación son muerte embrionaria, momificación fetal e infertilidad, de 100 a 150 días de gestación, defectos congénitos, de 4 a 5 meses,

abortos y en el macho, alteraciones en calidad espermática (Quintero-Barbosa *et al.*, 2019). Se ha informado la presencia de bacterias en el semen, estas desencadenan la respuesta inmunitaria local, el apoyo del sistema de defensa viene aunado a una infiltración de leucocitos, lo cual conduce a la producción y secreción de citocinas lo cual está asociado con una alta disminución en el potencial reproductivo masculino (Fraczek y Kurpysz 2015).

2.6 Diluyentes seminales

Un diluyente es una solución acuosa, cuya función es incrementar el volumen del eyaculado a fin de conseguir las dosis necesarias para su distribución en pajillas, preservando las características funcionales de las células espermáticas y el nivel de fertilidad adecuado, estos deben tener unos componentes básicos para su funcionamiento, como una sustancia iónica y no iónica para poder sostener la osmolaridad, lipoproteínas de un peso molecular alto para proteger los espermatozoides del choque térmico, crioprotectores, antioxidantes y antibióticos; los diluyentes deben cumplir algunos requerimientos como el aporte de nutrientes para el metabolismo espermático, protección durante el proceso de enfriamiento, evitar los cambios de pH cuando se va formar el ácido láctico, conservar la presión osmótica y el balance de electrolitos, impedir colonización de bacterias y mantener a los espermatozoides con funcionalidad para cuando se requieran (Ugur *et al.*, 2019). Algunos componentes usados en los diluyentes seminales son la yema de huevo, es un crioprotector no penetrante utilizado durante criopreservación, contiene fosfatidilcolina (lecitina), fosfolípidos, extractos de lípidos, fracciones de lipoproteínas y lipoproteínas específicas las cuales proporcionan protección contra el choque térmico, la cantidad de yema de huevo utilizada en los diluyentes seminales para bovinos es de 15 - 30%; iones, crioprotectores como el glicerol, azúcares y antimicrobianos (Raheja *et al.*, 2018); de acuerdo a la OMS (2003) los diluyentes seminales de origen animal deben estar libre de microorganismos. En el mercado se encuentran diversos diluyentes como:

2.6.1. Leche descremada: Es un diluyente natural, contiene minerales, proteínas, aminoácidos, grasas y azúcar. Se considera de los primeros diluyentes y tiene como

principal ventaja la facilidad de conseguir y su costo (Salim *et al.*, 2019). Particularmente, la lactosa puede generar aportes energéticos y la caseína aumenta la funcionalidad cinética de los espermatozoides, al igual, ofrece amortiguación de pH, estabilidad de membrana relativa por los lípidos y viscosidad adecuada (Bandeira *et al.*, 2015). Se pueden atribuir efectos bactericidas relativos, sin embargo, las tasas de contaminación de semen conservado en base a leche son altas. La fertilidad del semen diluido y congelado con base en leche descremada es buena con tasas de preñez de más del 90% en condiciones adecuadas (Salim *et al.*, 2019).

2.6.2 Yema de huevo: Es uno de los diluyentes más antiguos, con datos reportados desde 1939, favorece la viabilidad espermática como diluyente y tiene efecto crioprotector al favorecer los espermatozoides durante el choque de frío. Los fosfolípidos componen la yema de huevo confieren resistencia y las lipoproteínas de baja densidad actúan como resistencia y almacenamiento al unirse a la membrana espermática gracias a su componente proteico, además, la presencia de proteínas aumenta la acción de los fosfolípidos en la protección espermática durante el almacenamiento en frío (Aires *et al.*, 2003; Strzezek *et al.*, 2004).

2.6.3 Bioxcell®: Este diluyente comercial no contiene proteínas de origen animal por lo tanto disminuye la probabilidad de colonización de bacterias. Entre sus componentes se encuentran la lecitina de soya, lincomicina, espectinomicina, gentamicina y tilosina (Khan *et al.*, 2017). Algunos estudios reportan el favorecimiento de Bioxcell® a la motilidad espermática antes y después de la congelación, aunque otros reportan fluctuaciones en la temperatura y modificaciones y desestabilización en la membrana, afectando la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Ribeiro *et al.*, 2014)

2.6.4 Biladyl®: Este diluyente comercial está compuesto a base de yema de huevo permite a los fosfolípidos y lipoproteínas presentes en ella funcionen como protector de la membrana de las membranas espermáticas para evitar desestabilización de membrana y choque térmico; igualmente contiene Tris, ácido cítrico, glucosa, agua y antibióticos. Algunas veces se pueden añadir crioprotectores o no. Este diluyente presenta alta tasas de supervivencia y longevidad espermática (Gadea, 2003).

2.6.5 Triladyl®: Es un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Generalmente cada 250 g permiten preparar de 1250 ml de diluyente. Está compuesto por Tris, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos (tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina). Se debe reconstituir con agua destilada o bidestilada (Herold *et al.*, 2006).

2.6.6 Androstar Plus®: Este contiene lípidos, ingredientes de protección de la membrana celular, permitiendo proteger la membrana celular por periodos de tiempo prolongados, especialmente a temperaturas de crio preservacion, evitando la generación de daño en la membrana espermática lo cual favorece una mayor viabilidad permitiendo manejar rangos de temperatura de dilución entre 5 °C y 25 °C (Weitze, 2014).

2.6.7 AndroMed®: Es otro diluyente comercial compuesto por Tris, fosfolípidos, ácido cítrico, azúcar, antioxidante glicerina y antibióticos (tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina). Es un diluyente libre de yema de huevo por lo disminuye la probabilidad contaminación por bacterias (Muiño y Peña, 2009).

2.6.8 Optixcell®: Este diluyente ofrece ciertas ventajas como es la de reemplazar el uso de la yema de huevo por liposomas, pues el uso de yema de huevo podría generar problemas de contaminación en la muestra. Además éste es libre de partículas al ser sometido a un proceso de filtración, lo cual facilita su análisis ya sea por microscopio o sistema CASA; además conserva mucho mejor el semen fresco lo cual permite tener un tiempo más prolongado antes de su procesamiento, garantizando una muestra de calidad antes de someterla a congelación (Pillajo, 2015).

2.6.9 Sterydil®: Es un diluyente comercial a base de yema de huevo, contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, agua de extrema pureza y antibióticos (tilosina, gentamicina, espectomicina y lincomicina), es un diluyente para la congelación de semen bovino de un solo paso (Gómez, 2019).

2.7 Adición de antimicrobianos a diluyentes seminales

Los antimicrobianos contenidos en los diluyentes seminales actúan controlando la contaminación microbiana producida principalmente durante el proceso de obtención del semen (Izquierdo *et al.*, 2015). La Directiva de la UE 88/407 (Consejo de las Comunidades Europeas, 1988) establece a la estreptomicina, penicilina, lincomicina y espectinomicina como los antibióticos de elección a añadir al semen diluido. La adición de penicilina y estreptomicina fue en principio la combinación más utilizada, sin embargo, algunas bacterias han demostrado resistencia a estos fármacos (Yániz *et al.*, 2010). Posteriormente, se emplearon drogas del grupo de los aminoglucósidos, activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas en concentraciones próximas a 200 mg/l. Éstos últimos incluyen polimixina, neomicina, tilosina, gentamicina, lincomicina y espectinomicina, y se consideran promisorios como agentes antimicrobianos en semen. (Trujillo y Rivera, 2002; Cremades *et al.*, 2005). Por otra parte, Rodrigues y Valenzuela (2019) demostraron la combinación de gentamicina, tilosina y linco-espectina como eficaz para controlar el crecimiento de bacterias en el semen. Sin embargo, esta combinación no eliminó completamente micoplasma de semen criopreservado de toros infectados artificialmente (Rodrigues y Valenzuela 2019; Andrabi *et al.*, 2016).

2.8 Efecto de los antimicrobianos en semen

Una gran variedad de bacterias comensales y potencialmente patógenas, provenientes del tracto reproductivo del macho o de la manipulación de los eyaculados durante su recolección pueden contaminar el semen (Althouse, 2008). Por otro lado, la calidad del semen puede disminuir debido a la competencia entre las bacterias y los espermatozoides por los nutrientes presentes en el plasma seminal, al igual por la acumulación de catabolitos bacterianos tóxicos (Azawi e Ismaeel, 2012). Los antimicrobianos son componentes comúnmente utilizados en los diluyentes para la refrigeración y congelación del semen, estos tienen la finalidad de contener la contaminación bacteriana y reducir el riesgo de endometriosis (Yániz *et al.*, 2010). No obstante, se ha reportado la presencia de patógenos microbianos presentes en el semen congelado; aunado a esto, los antimicrobianos podrían tener un efecto perjudicial sobre los espermatozoides, lo cual dificulta su empleo para la

refrigeración y congelación del semen (Gloria *et al.*, 2014; Morrell y Wallgren, 2011). La gentamicina, ampliamente utilizada en los diluyentes para semen, presenta efectos negativos en la movilidad y la velocidad de los espermatozoides durante la refrigeración y el almacenamiento prolongado, mientras la ticarcilina disódica y el sulfato de amikacina, no tienen un efecto perjudicial sobre la movilidad espermática (Restrepo *et al.*, 2016; Aurich y Spergser, 2007; Dietz *et al.*, 2007). Los antibióticos sulfato de amikacina, ticarcilina disódica y sulfato de gentamicina, en concentraciones mayores a 1000 UI/ml, afectan los parámetros de movilidad del semen refrigerado (Aurich y Spergser, 2007). Por lo cual se ha llegado a la implementación de otras estrategias, como la remoción de bacterias por centrifugación (Morrell *et al.*, 2014; Morrell y Wallgren, 2011). Aun cuando la calidad del espermatozoides después de la descongelación puede no verse afectada por el antimicrobiano incluido en los diluyentes seminales, se han notificado efectos positivos en el uso de estos (Andrabi *et al.*, 2016). Cuando se añadió enrofloxacin a los extensos, los espermatozoides de toros cebuinos presentaron mayor motilidad y viabilidad en comparación con muestras a las cuales se les agregó estreptomycin (Ishaq *et al.*, 2019). En los diluyentes seminales utilizados para la preservación del semen de búfalo, la inclusión de una combinación de la penicilina y la neomicina muestran mejores resultados en comparación con combinación de penicilina y estreptomycin con respecto a sus propiedades antimicrobianas (Raheja *et al.*, 2018).

2.9 Resistencia bacteriana

En el caso específico de los agentes antimicrobianos, la complejidad del proceso contribuye a la emergencia y difusión de la resistencia no es exagerada; el conocimiento sobre estos temas es una de las principales razones por las cuales hay tan pocos logros en la eficacia, prevención y control en el desarrollo de resistencias (Giono-Cerezo *et al.*, 2020; Davies y Davies, 2010). La resistencia a los agentes antimicrobianos se refiere a microorganismos, como bacterias, virus, hongos y parásitos, han adquirido resistencia al tratamiento antimicrobiano; esta resistencia puede producirse de manera natural mientras los organismos se

adaptan a su entorno, sin embargo, el uso excesivo e indebido de agentes antimicrobianos en el hombre, animales y plantas ha acelerado drásticamente el desarrollo de la resistencia (Galvis, *et al.*, 2019; Oteo, *et al.*, 2015). Para minimizar el surgimiento y la propagación de la resistencia, es necesario un esfuerzo multisectorial y multinacional coordinado y concentrado (OIE, 2020). La resistencia a los agentes antimicrobianos está definida como un problema de alcance mundial donde afecta tanto a la salud humana como a la sanidad animal y está influido por el uso de agentes antimicrobianos en el concepto de una sola salud; así pues, es responsabilidad de estos sectores unir esfuerzos para prevenir o minimizar la presión selectiva sobre esta resistencia en los microorganismos patógenos al afectar al hombre o a cualquier otra especie (OIE, 2021). El descubrimiento de nuevos antibióticos no será la solución para contener la resistencia antimicrobiana, si no se modifican los comportamientos actuales como administrar antibióticos sin consulta médica, entre otros (Quiñones, 2017). El uso de antibióticos como aditivos en diluyentes para asegurar la calidad sanitaria de los espermatozoides empleados en biotecnología reproductiva y preservarlo del deterioro bacteriano ha sido informado desde mediados del siglo XX, sin embargo, los efectos nocivos de estos fármacos sobre la calidad espermática, así como su eficacia para controlar el crecimiento bacteriano en el semen conservado, se ha venido cuestionando recientemente (Santos y Silva, 2020).

2.9.1 Mecanismos de resistencia

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido, se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos; se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico (Calero *et al.*, 2019). La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones) (Oteo *et al.*, 2015). Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico,

los cuales son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y barreras de permeabilidad (Asenjo *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2014).

2.9.2 Elementos móviles de la resistencia adquirida

El fenómeno biológico de la resistencia depende de la aparición y conservación de los genes de resistencia, como elementos génicos cromosómicos y extra cromosómicos, en pocas palabras es la modificación en el genoma lo cual determina la aparición de dichos genes; estos cambios se clasifican en microevolutivos y macroevolutivos (Oteo *et al.*, 2015). Los primeros son el resultado de mutaciones únicas y comprometen nucleótidos apareados, mientras las macroevolutivos afectan segmentos de DNA; los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia (Ospino *et al.*, 2018). Los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano con longitud variable, algunos con capacidad para replicarse independiente de la maquinaria genética de la célula, dándoles el apelativo de conjugativos y no conjugativos según esta capacidad (Asenjo *et al.*, 2021). Por otro lado, los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) pueden ser traslocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio; esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra, durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo cual facilita la expansión epidémica de la resistencia (Martínez *et al.*, 2014). Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones los cuales les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una resistencia a varios antibióticos (Oteo *et al.*, 2015).

2.9.3 Inactivación del antibiótico

Se realiza mediante la producción de enzimas las cuales hidrolizan el antimicrobiano, son ejemplos de esta la producción de B-lactamasa; B-lactamasa de amplio espectro, eritromicina estereasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloramfenicol, lincosamidas y estreptograminas. Los

antimicrobianos B- lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanin carboxipeptidasa (PBPS) encargada de la síntesis de la pared. La B-lactamasa hidroliza el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo. Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producidas por bacterias Gram negativas (Lepe y Martínez, 2022).

2.9.4 Alteración del sitio blanco del antibiótico

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc (Gastelo y Maguiña, 2018). La resistencia a las quinolonas de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* obedece a la modificación por mutación de los genes *Gyr A* y *Gyr B* los cuales codifican para las topoisomerasas II y IV; característicamente las mutaciones mencionadas se presentan como cromosómicas y no como plásmidos. La rifampicina actúa sobre la subunidad 13 de la RNA polimerasa, inhibiendo la extensión del RNA durante su síntesis, esta se presenta cuando cambios en un aminoácido de esta subunidad alteran la unión del antibiótico a la RNA polimerasa (Asenjo *et al.*, 2021). Esta resistencia es común en enterobacterias y puede desarrollarse en *Staphylococcus*, *N. meningitis* y *H. influenza*. Respecto a las demás estructuras ribosomales se encuentran modificaciones a nivel de múltiples subunidades como 30S, 50S; el mecanismo de resistencia (ribosomal) a gentamicina, tobramicina y amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido S12 de la subunidad 30S (Holguín *et al.*, 2017; Echevarría, 2015).

2.9.5 Barreras de permeabilidad

Este mecanismo se divide en 2.

2.9.5.1 Eflujo activo: es debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas. Se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antimicrobiano y a su vez las bacterias reducen la concentración del

antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloramfenicol y B-lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (Murray, 2019).

2.9.5.2 Entrada disminuida: debido a la permeabilidad de la membrana externa, permeabilidad de la membrana interna o las porinas (Hancock, 1997).

2.9.5.2.1 Permeabilidad de la membrana externa: claramente definida en los microorganismos Gram negativos estos poseen una membrana lipídica externa la cual constituye una barrera intrínseca para la penetración del antimicrobiano (Lepe y Martínez, 2022).

2.9.5.2.2. Permeabilidad de la membrana interna: otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética donde compromete el transportador aniónico del antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos (Asenjo *et al.*, 2021).

2.9.5.2.3 Porinas: son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria. De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antibiótico. Éste es el mecanismo empleado por *Salmonella typhimurium* (OmpC) contra cefalosporinas de primera generación, *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenem (Murray, 2019).

2.10 Antecedentes directos

Existen diversos métodos para tratar de contrarrestar el desarrollo de microorganismos patógenos en el semen como el agregar antimicrobianos a los diluyentes seminales, pero este método se ha mostrado ineficaz para erradicar la carga bacteriana pues diversos autores han reportado la presencia de estos agentes patógenos multirresistentes en el semen post congelación (Santos y Silva, 2020),

como Hernández *et al.* (2002) quienes aislaron *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter hafniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia rubidaea* y *Serratia liquefaciens*, a partir de 64 muestras de semen de bovino postcongelado provenientes de 4 empresas dedicadas a la venta de semen congelado en México, de los antibióticos utilizados, tanto para organismos Gram positivos y Gram negativos, donde observaron la resistencia de los microorganismos aislados a la pefloxacina, ampicilina, cefotaxima y trimetoprim/sulfametoxazol. Patel *et al.* (2011) aislaron *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus vulgaris* a partir de 20 pajillas francesas de semen post congelado de bovinos Holstein Frisón y toros cruzados, en Guyarat, India, dichos aislados mostraron multirresistencia a eritromicina, tetraciclina y gentamicina. Najee *et al.* (2012) aislaron *Pseudomona aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* a partir de 100 pajillas de semen de bovino importadas, en Bagdad, Irak, dichos aislados mostraron una resistencia en un 100% a gentamicina, tobramicina, amikacina y ceftriaxona. Panchal *et al.* (2012) quienes aislaron *Micrococcus luteus* y *Micrococcus spp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp* y *Enterobacter spp* a partir de 44 dosis de semen post congelado de búfalos en Guyarat, India, dichos aislados mostraron resistencia a eritromicina, gentamicina y espectomicina. Chipana (2014) quien aisló *Pseudomona aeruginosa* a partir de semen en post congelación en un toro en La Paz, Bolivia, dicho aislado mostró resistencia a ciprofloxacina, cefadroxilo y cotrimoxazol. Abro *et al.* (2016) aislaron *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius* a partir de semen de bovino post congelado en Pakistán, dichos aislados mostraron resistencia a trimetoprim con sulfametoxazol, amoxicilina y cefalexina. Goularte *et al.* (2020) aislaron *Aeromonas spp*, *Enterobacter spp*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Aerococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Rhizobium spp*, a partir de 35 pajillas de semen post congelado de bovinos en el sudeste de Brasil, el 100% de dichos aislados mostraron resistencia a penicilina, el 76.4% presentó sensibilidad a gentamicina y el 40% mostraron sensibilidad a estreptomicina/lincomicina, de acuerdo a los resultados de prueba de sensibilidad, se utilizaron los mismos aislados bacterianos para determinar la concentración mínima inhibitoria y la

concentración mínima bactericida con los siguientes antibióticos: gentamicina, tilosina, lincomicina y un combinado de lincomicina-espectomicina, a partir de 250, 50, 250 y 150/300 µg/ml respectivamente

III. HIPÓTESIS

Los agentes bacterianos aislados de semen post congelado de bovinos de los estados de Sinaloa y Durango presentan resistencia al menos a un antibiótico.

IV. OBJETIVOS

General:

Determinar la resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas del semen post congelado de bovinos de los estados de Sinaloa y Durango.

Específicos:

1. Cuantificar las bacterias (UFC/ml) presentes en el semen postcongelado de bovinos de Sinaloa y Durango.
2. Aislar e identificar los agentes bacterianos presentes en semen postcongelado.
3. Evaluar la resistencia a antimicrobianos de las bacterias aisladas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Descripción del área de estudio

El estado de Sinaloa se ubica en el Noroeste del país, entre las coordenadas 22° 31' y 26° 56' de Latitud norte y los 105° 24' y 109° 27' de longitud oeste. El estado cuenta con una superficie total de 58,200 km² de los cuales corresponden a su superficie continental y a su superficie insular. El estado de Sinaloa representa 2.9 % de la superficie del país. Su clima es variado y presenta un relieve muy accidentado en el oriente, por la Sierra Madre Occidental, una cadena montañosa va desde el norte de la entidad hasta el sur, y el suroriente, donde se presentan cañones y lomeríos. La sierra es inclinada con caídos los cuales bajan hasta los 1000 metros y presenta montañas con altura superior a los 2500 msnm. Las formaciones de un considerable número de serranías desligadas del maciso montañoso que afloran en su topografía, crean los extensos valles y la planicie costera del estado. Una de las regiones más montañosas de la entidad se localiza en el municipio de Badiraguato al que pertenecen las Sierras de Surutato, Baragua, Cuervo de Ciervo, Santiago de los Caballeros, Capirato y otras. Las temperaturas mínimas promedio son alrededor de 10.5°C en el mes de enero y las máximas promedio pueden ser mayores a 36°C durante los meses de mayo a julio. Las lluvias se presentan en el verano durante los meses de julio a septiembre, la precipitación anual promedio de 790 mm. El sector pecuario en Sinaloa tiene una población en Bovinos de 1,544,978 cabezas (INAFED, 2020).

El estado de Durango representa aproximadamente el 6.3% de todo el territorio de México. Es el cuarto estado más grande y se ubica en el extremo noroeste de la Mesa del Centro, donde se encuentra con la Sierra Madre Occidental los picos más altos del estado. El estado tiene una elevación promedio de 1,775 msnm, con una elevación promedio de 1,750 m en la región de los Valles y 2,450 m en la región de la Sierra. La ciudad de Durango se encuentra en las estribaciones de la Sierra Madre Occidental, con una elevación de 1.857 m. Durango no tiene salida al mar,

limita con Chihuahua, Coahuila, Zacatecas, Nayarit y Sinaloa. Está dividido en 39 municipios, según la Constitución de México de 1917, y desde entonces se han realizado varias divisiones adicionales. En la mayor parte del estado el clima es frío y muy seco. En lo alto de la sierra el clima es mucho más helado con lluvias en todo el año, e invierno con heladas y nevadas (debido a las bajas temperaturas y los vientos húmedos procedentes del Pacífico). Precipitación anual de 500 mm y una temperatura promedio de 16°C (Rosas *et al.*, 2021).

5.2 Diseño del estudio

Observacional, descriptivo y por conveniencia (Manterola y Otzen, 2014).

5.3 Definición de la población.

18 pajillas de semen congelado de sementales bovinos utilizados como reproductores, 11 pajillas del estado de Sinaloa y 7 pajillas del estado de Durango.

5.4 Obtención de la muestra

Las pajillas fueron de 0.5 ml almacenadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

5.5 Procesamiento de la muestra

El procesamiento de la muestra se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología y Micología, ubicado en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Se localiza a 24°46'12.89" de latitud Norte y 107°21'18.40 longitud Oeste a 80 msnm.

5.6 Cuantificación bacteriana (UFC/ml).

Se realizaron diluciones seriadas por pajilla a partir de 1:10, 1:100 y 1:1000, para ellos se utilizó agua peptonada como diluyente, de acuerdo con la técnica descrita

por Morales (2013). Las diluciones se llevaron a cabo formando una mezcla homogénea en volúmenes con proporción 1:9 ml del semen y agua peptonada. Para la primera dilución (1:10) se utilizó 0.4 ml de semen, en 3.6 ml de agua peptonada, los cuales se homogeneizaron a través de un mezclador (marca SCIOLOGEX modelo MX-S). Para inocular en las placas de agar sangre se tomaron 500 µl de cada dilución y se sembraron mediante la técnica de esparcido en placa descrita por Aryal (2016) por duplicado y se incubaron de 24 a 48 h a 37 °C, trascurrido el tiempo de incubación fueron objeto de observación y conteo para su reporte mediante el uso de un cuenta colonias, y para calcular el número de UFC/ml en cada una de las muestras se tomó el número de colonias de la dilución contable, asumiendo una colonia es igual a una UFC/ml, se multiplicó dicha cantidad por el factor de dilución y esa fue la cantidad de UFC/ml de muestra.

5.7 Identificación bacteriana

Las colonias macroscópicamente diferentes entre sí se resembraron con un asa microbiológica debidamente esterilizada en agar sangre y agar MacConkey, estas colonias se tomaron directamente de las placas. Las placas fueron incubadas 24 h a 37 °C.

Trascurrido el tiempo de incubación se tomó lectura del crecimiento bacteriano en las placas. Para la identificación presuntiva de las bacterias se tomaron en cuenta la atmósfera de crecimiento, el medio de cultivo, tamaño, textura, borde y color de la colonia (Bou *et al.*, 2011).

5.7.1 Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para observar el metabolismo bacteriano y confirmar la identificación. Estas fueron: catalasa, fermentación de manitol, fermentación a la lactosa en agar Mac Conkey, gelatina nutritiva, citrato de Simmons, agar de hierro y triple azúcar (TSI), agar de hierro y lisina (LIA), medio de sulfuro indol motilidad (SIM) y pruebas complementarias ureasa y oxidasa (Kaiser, 2017; Bou *et al.*, 2011).

5.7.2 Frotis fijo y tinción Gram

La diferenciación entre bacterias se llevó a cabo con la tinción de Gram que es una tinción compuesta (HYCEL, 2022).

5.8 Susceptibilidad a antibióticos

Para la resistencia en bacterias Gram positivas y Gram negativas, se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* utilizando el método de Kirby-Bauer de difusión en disco (EUCAST, 2022; CLSI, 2021). Una vez identificada la bacteria se procedió a la realización de antibiogramas para comprobar la resistencia bacteriana, para esto se sembró un inóculo (2 o 3 colonias) en caldo de soya tripticaseína. Transcurrida 1 h de incubación, se realizaron mediciones cada 30 min en un espectrofotómetro para estimar el crecimiento bacteriano a una longitud de onda de 600 nm con una densidad óptica de 0.08 a 0.1 hasta establecer un patrón 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/ml). Una vez alcanzado el crecimiento requerido, se tomó un hisopo estéril, se sumergió en el caldo de soya tripticaseína para impregnarlo con el cultivo, retirando el exceso de éste al presionar el hisopo contra las paredes del tubo. Luego, con el hisopo se realizó un estriado continuo cruzado en las cajas de petri con agar Müeller-Hinton, se dejaron reposar las placas 5 min para la absorción del inóculo. Después, se colocó el multidisco (multibac ID PT-36) para Gram positivos y para Gram negativos combinados y por último se incubó por 24 h. Esto se realizó por triplicado. Posterior a esto, se realizó la técnica de micro dilución en placa descrita por Sarker *et al.* (2007) y Goularte *et al.* (2019), en los casos donde las bacterias mostraron sensibilidad a los antimicrobianos probados, se determinó la concentración mínima inhibitoria necesaria para tratar estas bacterias, la preparación de los antibióticos fue en agua peptonada, para la preparación se tomó en cuenta el factor de dilución (4) para el ajuste de la concentración del antibiótico, necesaria para cada cepa. Una vez ajustadas las cepas en agua peptonada, se comenzó con la preparación de las microplacas de 96 pozos estériles con tapa. Inicialmente se agregó 50 µl de agua peptonada excepto la primera fila (1 A-H),

posterior a esto se colocó 50 µl del antibiótico preparado (Penicilina, Ampicilina, Gentamicina y Sulfametoxazol a 6, 10,10, 25 µg/ml respectivamente) (MERK), en la fila 1 y 2. A partir de la fila 2 se hicieron las diluciones seriadas a 1:1 (fila 2-11) del antibiótico, después se agregaron 100 µl de caldo Mueller Hinton en toda la placa y por último se añadió 50 µl del inóculo bacteriano a la fila 1-11 (ajustado a una longitud de onda de 600 nm con una densidad óptica de 0.08 a 0.1 hasta establecer un patrón 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/ml) un espectrofotómetro), al control negativo se le agregó 50 µl de agua peptonada en lugar del inóculo bacteriano, en la fila 12 (control positivo) se agregó 50 µl del inóculo bacteriano. Después de este proceso, las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h a 110 RPM. Cada dilución, control negativo y control positivo se realizó por duplicado.

5.9 Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de inhibición se capturaron en Excel y después se pasaron a SAS 9.0, se estableció un $\sigma \leq 0.05$, los supuestos de homogeneidad de las varianzas (Bartlett) y normalidad de los datos (Kolmogorov-Smirnov) no se cumplieron, por lo cual los datos se transformaron en rangos utilizando la opción PROC RANK, y a estos se les aplicó PROC GLM (SAS, 2002) para el análisis de la varianza con los factores bacteria y antibiótico con 12 valores cada uno, el resultado fue una $P < 0.05$ lo cual indica que al menos una varianza es diferente, sin embargo, los grados de libertad (GL) del error fueron muy grandes (409), por lo cual se decidió agregar el factor interacción (bacteria*antibiótico) para reducirlos, con la interacción agregada los GL del error se redujeron (288) y se mantuvo la $P < 0.05$. Utilizando la opción de LSMEANS y PDIFF ADJUST = BON se calculó las medias de rango de los factores y su comparación con la prueba de Dunn ajustada, los resultados se pasaron a Minitab 18 y se realizó una gráfica de interacción, los valores de los factores bacterias y antibióticos se agruparon en cinco y seis valores respectivamente.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 18 muestras de semen post congelado de bovinos, en 13 (72.22%) observamos crecimiento bacteriano, de las cuales se cuantificaron las UFC/ml, como se puede apreciar en el Cuadro 1, donde 8 de las muestras evaluadas obtuvieron de 530 a 3280 UFC/ml de semen, de estas, 4 fueron provenientes del estado de Durango y 4 del estado de Sinaloa, en las muestras restantes 1 fue del estado de Sinaloa y 4 del estado de Durango, donde se observó de 40 a 340 UFC/ml. Con base en la NOM-092-SSA-1994 las muestras de semen post congelado deben de contener < 500 UFC/ml de colonias bacterianas para ser considerado apto para la inseminación artificial, con base en estos resultados 10 muestras cumplen con la norma oficial pues el conteo de UFC/ml se encuentra dentro del rango permitido, mientras las 8 muestras restantes se encuentran fuera de la norma por el conteo por encima de los 500 UFC/ml, esto indica la necesidad de la toma de muestra de semen en un ambiente inocuo y del manejo eficiente del equipo utilizado en este proceso, además de la bioseguridad del personal recolector, así como llevar a cabo muestreos aleatorios de semen post congelado y realizar el análisis microbiológico pertinente en cada recolección. Hernández *et al.* (2002) cuantificaron 64 muestras de semen de bovino post congelado, de dichas muestras 44 fueron positivas a crecimiento bacteriano (68 %) y 20 resultaron negativas, de forma similar al presente trabajo, su elevado conteo bacteriano implica un mal manejo del semen durante la congelación, donde describen a la cuenta total de las bacterias como una implicación negativa en el semen al dañar la motilidad y viabilidad espermática, y sugieren no deben ser utilizadas las muestras con presencia < 500 UFC/ml para la inseminación artificial. Patel *et al.* (2011) cuantificaron 20 muestras de semen de bovino post congelado, de dichas muestras 16 fueron positivas a crecimiento bacteriano con conteos de 2 a 5,947 UFC/ml, esta variación se adjudica a las condiciones antisépticas durante la recolección seminal, o durante el procesamiento de esta, lo cual se asemeja a los resultados del presente trabajo, donde se presenta una variación en la obtención de UFC/ml de 40 a 3,280, posiblemente, por las mismas causas. Panchal *et al.* (2012), cuantificaron 44 muestras de semen post

congelado de búfalo, de dichas muestras 9 fueron positivas a crecimiento bacteriano con conteos de 200 a 1,500 UFC/ml, dichos resultados se pueden deber a la presencia de antimicrobianos utilizados en el proceso de congelación, en este trabajo por la inexistencia de datos de antimicrobianos y el desconocimiento de los diluyentes utilizados no se puede aseverar que la presencia de microorganismos se deba la utilización de antimicrobianos. Chipana (2014) en Perú, cuantificó 4 muestras de diferentes sementales bovinos, dichas muestras fueron positivas a crecimiento bacteriano (100%) con 850, 300, 200 y 250 UFC/ml respectivamente, lo cual indica se debe de realizar una minuciosa limpieza del prepucio antes de la colecta y pone en evidencia el uso de dosis seminales con altos conteos de UFC/ml pueden transmitir enfermedades a las vacas destinadas a la inseminación artificial. El seguimiento de la calidad del semen es frecuente y generalmente eficaz, pero el control de calidad para procedimientos higiénicos realizados durante la recolección de semen y el procesamiento es comúnmente deficiente (Álvarez *et al.* 2005). El control de calidad eficiente se puede lograr a través de Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (del inglés HACCP), para identificar, evaluar y controlar sistemas significativamente peligrosos, centrándose en la prevención en vez de las medidas de inspección o correctivas. Goularte *et al.* (2015) desarrollaron un sistema HACCP en los centros de producción de semen bovino, en este sistema se determinaron como puntos importantes: evaluación de estado de salud de animales, lavado del potro y del prepucio del semental, higiene durante la colección seminal, curva de congelación, identificación y preparación de las pajillas. Goularte *et al.* (2018) demostraron la implementación HACCP como una ventaja al momento de la colección y congelación seminal, pues al implementar este sistema, se logró la reducción de contaminación bacteriana en las pajillas de semen de bovino a menor costo de producción.

Cuadro 1. Conteo de las unidades formadoras de colonia por mililitro.

Estado	UFC/ml
Durango	3,280
Durango	1,100
Sinaloa	850
Durango	750
Sinaloa	720
Sinaloa	560
Durango	550
Sinaloa	530
Durango	340
Durango	160
Sinaloa	150
Sinaloa	80
Sinaloa	40
Sinaloa	0
Sinaloa	0
Sinaloa	0
Sinaloa	0
Durango	0

De las 13 muestras de semen positivas a cultivo bacteriano, se aislaron 36 bacterias; de las cuales 22 fueron aisladas de las muestras del estado de Sinaloa (cuadro 2) y 14 de las muestras provenientes del estado de Durango (Cuadro 3). De las 36 bacterias aisladas, 23 (63.8%) fueron bacilos y cocobacilos Gram negativos y 13 (36.1%) cocos y bacilos Gram positivos (Cuadros 2 y 3). Estas bacterias se agruparon en 14 géneros con base en las características morfológicas coloniales. Hernández *et al.* (2002) llevaron a cabo la tinción de Gram para la identificación de bacterias aisladas a partir de 44 muestras de semen de bovino post congelado provenientes de 4 empresas dedicadas a la venta de semen congelado, se aislaron 66 bacterias, de las cuales 36 (54.54%) fueron bacilos Gram negativos y 30 (45.45%) fueron cocos y bacilos Gram positivos y se agruparon en un total de 9 géneros. Patel *et al.* (2011) realizaron la tinción de Gram a partir de muestras de semen de bovino post congelado, donde aislaron un total de 10 bacterias, de las

cuales 5 fueron cocobacilos Gram negativos (50%) y 5 fueron cocos y bacilos Gram negativos (50%), agrupándolos en 4 géneros de acuerdo con sus características morfológicas coloniales. Panchal *et al.* (2012) realizaron un trabajo para identificar las bacterias presentes en muestras de semen de búfalo fresco y post congelado, aislaron 15 bacterias de las cuales 6 (40%) fueron bacilos y cocobacilos Gram negativos y 11 (60%) fueron cocos y bacilos Gram positivos, agrupándose en 5 géneros diferentes. Morales *et al.* (2013) llevaron a cabo la tinción de Gram a partir de muestras de semen congelado de toros del banco nacional de semen en Perú, reportaron la presencia de 44 bacterias, se agruparon en 6 especies, siendo 10 (22.72%) bacilos y cocobacilos Gram negativos y 34 (77.27%) cocos y bacilos Gram positivos. Goularte *et al.* (2020) realizaron la tinción de Gram a 147 colonias distintas morfológicamente obtenidas a partir de semen post congelado de bovino, en las cuales observaron 9 géneros diferentes de acuerdo con la morfología colonial macroscópica y morfología microscópica siendo 7 (77.77%) cocobacilos y bacilos Gram negativos y 2 (22.22%) cocos Gram positivos, indicando a la presencia de estos agentes como fuente de contaminación externa a las muestras de semen, posiblemente proveniente del personal y del equipo utilizado para procesar el semen. Estos trabajos concuerdan con esta investigación donde se determinaron bacterias Gram positivas y Gram negativas en semen post congelado, destacando a la contaminación bacteriana como un factor no solo se debido al personal o al equipo utilizado en el procesamiento del semen, sino se pueden agregar otros factores como los ambientales o bien, presencia de bacterias comensales las cuales en condiciones adecuadas pueden ser patógenos oportunistas.

Cuadro 2. Observación macroscópica, microscópica y reacción a la tinción Gram de las cepas aisladas a partir de las muestras del estado de Sinaloa

Muestra	Cepa	Características macroscópicas	Características microscópicas	Tinción Gram
1	1	Betahemolítica, grisácea verdosa, borde liso, redonda puntiforme	Bacilos	-
	2	Gama hemolítica apariencia seca blanquecina redonda puntiforme	Cocos	+
2	3	Betahemolítica apariencia mucosa grisácea	Bacilos	-
3	4	Amarillenta mucosa redonda borde liso	Bacilos	-
	5	Gama hemolítica blanquecina rosácea mucosa, ondulada fusiforme	Cocos	+

	6	Amarillenta mucosa redonda borde liso	Bacilos	-
	7	Grisácea crema consistencia mucosa	Bacilos	-
	8	Betahemolíticas verdosa opaca	Bacilos	-
	9	Rosácea mucosa	Cocos	+
	10	Grisácea mucosa crema	Bacilos	+
	13	Betahemolítica verdosa grisácea mucosa	Bacilos	-
4	11	Betahemolítica grisácea verdosa 2-3 mm redonda convexa	Bacilos	-
	12	Betahemolítica verdosa grisácea mucosa	Bacilos	-
8	18	Puntiforme rosácea crema redonda	Bacilos	-
	19	Betahemolítica pálida verdosa amarilla	Bacilos	-
	20	Redonda amarillenta cremosa borde definido	Cocos	+
	21	Gama hemolítica plana lobulado blanco lechosa	Bacilos	-
9	22	Blanquecino borde lisa plana	Cocos	+
	23	Puntiforme blanquecina plana	Cocos	+
10	24	Blanquecino borde liso plana	Cocos	+
	25	Blanquecina rosácea mucosa ondulada	Cocos	+
	26	Betahemolítica grisácea verdosa 2-3 mm redonda convexa	Bacilos	-

Cuadro 3. Observación macroscópica, microscópica y reacción a la tinción Gram de las cepas aisladas a partir de las muestras del estado de Durango

Muestra	Cepa	Características macroscópicas	Características microscópicas	Tinción Gram
5	14	Grisácea plana ondulada	Bacilos	-
	15	Plana lobulada blanca lechosa	Bacilos	+
6	16	Betahemolítica verdosa redonda	Bacilos	-
	17	Betahemolítica amarillenta verdosa	Cocos	+
14	27	Puntiforme amarillenta cremosa	Bacilos	-
	28	Betahemolítica verdosa oscura	Bacilos	-
15	29	Puntiforme menos de 1 mm de diametro transparente	Cocos	+
	30	Betahemolítica verdosa oscura	Bacilos	-
16	31	Puntiforme redonda convexa amarillo vivo	Bacilos	-
	32	Puntiforme blanquecina grisácea convexa redonda	Bacilos	-
17	33	Puntiforme redonda convexa amarillo vivo	Bacilos	-
	34	Betahemolítica grisácea verdosa 2-3 mm redonda convexa	Bacilos	-
	35	Gama hemolítica puntiforme redonda transparente menos de 1 mm de diametro	Cocobacilos	-
	36	Puntiforme convexa menos de 1 mm de diametro	Cocos	+

De acuerdo con las cepas aisladas con identificación presuntiva por métodos fenotípicos, se realizaron pruebas bioquímicas donde se determinó el metabolismo bacteriano, los bacilos Gram negativos fueron identificados como *Citrobacter* spp, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomona* spp, *Acinetobacter* spp,

Enterobacter spp, y *Escherichia coli*, el bacilo Gram positivo fue identificado como *Bacillus* spp y los cocos Gram positivos como *Enterococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp y *Staphylococcus aureus* (Cuadro 4), además conforme las características metabólicas de cada cepa, se introdujeron en el software ABIS online – Bacterial identification, con esto se confirmó la identificación de las cepas y se agruparon en 14 géneros (Cuadro 5). La presencia de dichos géneros de bacterias puede deberse a un mal manejo durante el procesamiento del semen e incluso en el caso de las bacterias patógenas, puede deberse a un proceso infeccioso en los sementales durante la colecta seminal. Trujillo y Rivera (2002) aislaron *Escherichia coli*, *Proteus* spp y *Klebsiella* spp, a partir de 2 toros, en semen fresco, semen precongelado y post congelado, describió la presencia de microorganismos del grupo coliforme es debido a una contaminación fecal del semen al momento de la recolección y no por la eliminación de los microorganismos desde el tracto reproductivo del toro al momento de la eyaculación, de igual forma se consideró la presencia de *Escherichia coli* como consecuencia de la contaminación ambiental o por la posible presencia de la bacteria en las vesículas seminales de los toros, desde donde es evacuada durante la eyaculación, este trabajo difiere al describir solo la presencia de bacterias Gram negativas, e indica un éxito al no encontrar bacterias Gram positivas en las muestras. Sin embargo, Hernández *et al.* (2002) aislaron *Enterobacter hafniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia rubidaea*, *Serratia liquefaciens* y *Staphylococcus aureus*, adjudican la presencia de estas bacterias en semen a una contaminación durante la recogida del semen y a la presencia de orina en las muestras del semen, lo cual concuerda con este trabajo de investigación por la presencia de *Serratia* spp. Patel *et al.* (2011) llevaron a cabo un trabajo donde identificaron las propiedades bioquímicas de la carga bacteriana a partir de 20 pajillas francesas de semen de bovino post congelado, las bacterias aisladas a partir de estas fueron identificadas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomosa aeruginosa*, y *Proteus vulgaris*. Se comentó la presencia de dichas bacterias en las pajillas post congeladas son consecuencia de condiciones no asépticas durante la colección o el procesamiento del semen, lo cual concuerda con el presente trabajo al implicarse condiciones no estériles en el procesamiento de la

obtención del semen o bien en su congelación. En otro estudio, Panchal *et al.* (2012) realizaron la identificación bacteriana a partir de muestras de semen de búfalo fresco y post congelado, fueron identificadas como *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* y *Enterobacter* spp, la contaminación bacteriana se debe a la colección seminal no aséptica o al procesamiento de esta, esto concuerda con el presente trabajo al presentarse una contaminación bacteriana en las muestras de semen post congelado. Najee *et al.* (2012) identificaron *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, a partir de 100 pajillas de semen post congeladas importadas, para la identificación de las cepas aisladas realizaron pruebas bioquímicas, la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* se adjudicó al curso de una enfermedad aguda en los sementales al momento de la colecta y la presencia de *Stenotrophomonas maltophilia* se comentó esta se encuentra comúnmente en el nitrógeno líquido utilizado para preservar las pajillas en congelación. Estos resultados concuerdan parcialmente con la presencia de *Pseudomonas* spp, sin embargo, no se obtuvo en ningún aislado la presencia de *Stenotrophomonas maltophilia*, por lo cual se puede aseverar, el nitrógeno utilizado en las pajillas de este trabajo no está contaminado con dicho agente. Morales *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio donde evaluaron la presencia de bacterias en muestras de semen congelado de toros del banco nacional de semen en Perú, a partir de 42 pajillas de semen post congelado a través de pruebas bioquímicas, las bacterias aisladas fueron *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Micrococcus* spp, *Staphylococcus* spp y *Pasteurella* spp, la presencia de estas bacterias puede deberse al mal lavado del prepucio de los sementales, a los diluyentes utilizados preparados en condiciones no asépticas o a las condiciones de colecta del semen a pesar de que los resultados en identificación bacteriana son similares a este estudio, excepto por *Pasteurella* spp, no se puede aseverar si las condiciones de lavado, de preparación de diluyente o de colecta fueron las mismas y si es debido a ello esta presencia. Goularte *et al.* (2020) realizaron un estudio donde aislaron e identificaron bacterias a partir de muestras de semen comercial de toro colectado en distintas etapas durante el procesamiento de dichas muestras, las bacterias aisladas en el semen empaquetado fueron identificadas mediante el sistema

automático compacto Vitek 2 (BioMérieux®) siguiendo las instrucciones del fabricante, identificaron a *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp, donde indican a las bacterias presentes como fuente de contaminación externa a las muestras de semen, posiblemente proveniente del personal o el equipo utilizado en la colecta seminal. De forma similar, sin haber utilizado la misma metodología en la identificación bacteriana, se obtuvieron los mismos aislados bacterianos, lo cual coincide con una contaminación externa al adquirirlas probablemente por el mal manejo o por condiciones no asépticas en la colección seminal.

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas de las bacterias Gram positivas y negativas

Forma	Bacilos							Cocos						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prueba bioquímica														
Catalasa	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Sulfuro	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Motilidad	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	/	-	/
Citrato de Simmons	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	/	-	/
Agar Triple Azúcar	K/A+-	A/A--	K/A--	A/A--	K/N--	K/N--	A/A--	K/N--	K/A--	A/A--	N/N	/	N/N--	/
Agar Hierro Lisina	K/A--	K/N--	N/A--	N/N--	N/N--	N/N--	A/A--	A/A--	K/N--	A/A--	N/N	/	N/N--	/
Gelatina Nutritiva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Fermentación a la lactosa en MacConkey	-	-	+	-	-	-	-	-	+	/	/	/	/	/
Oxidasa	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+		-		/
Ureasa	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación al manitol	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	+

K-Alcalino. A-Ácido. N-Neutro. + Positivo – Negativo /No reacción.

Cuadro 5. Cepas presentes por muestra

ID	Bacteria	N° de muestras presentes
1	<i>Citrobacter</i> sp	3
2	<i>Serratia</i> sp	1
3	<i>Proteus</i> sp	2
4	<i>Klebsiella</i> sp	1
5	<i>Bacillus</i> sp	1
6	<i>Pseudomona</i> sp	3
7	<i>Acinetobacter</i> sp	2
8	<i>Enterobacter</i> sp	6
9	<i>Escherichia coli</i>	2
10	<i>Enterococcus</i> sp	2
11	<i>Micrococcus</i> sp	3
12	<i>Staphylococcus</i> sp	2
13	<i>Aerococcus</i> sp	1
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	1

En las muestras de semen post congelado se observó un alto porcentaje de microorganismos, lo cual pone en evidencia la transmisión de estos patógenos a vacas destinadas a la inseminación artificial, aunado a esto, los microorganismos encontrados en el presente estudio están relacionados con una disminución de la motilidad, aumento en las aglutinaciones espermáticas y aumento del porcentaje de acrosomas alterados, al igual, están asociados a muertes embrionarias, septicemias y toxemias o directamente afectan al medio ambiente uterino en las hembras, por lo tanto la adición de antimicrobianos, en la concentración adecuada, favorece tanto a los espermatozoides, como a la erradicación de agentes patógenos en el semen post congelado (Trujillo y Rivera, 2002). Aun con la adición de antimicrobianos a los diluyentes seminales, se ha reportado la presencia de agentes bacterianos en el semen pues los componentes nutritivos utilizados en los diluyentes del semen también favorecen el desarrollo y supervivencia de las bacterias (Duracka *et al.*, 2021).

Cuadro 6. Resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas de muestras de semen postcongelado de los estados de Sinaloa y Durango.

<i>Citrobacter sp</i>	Netilmicina, nitrofurantoina, cloranfenicol, ampicilina, cefalotina, amikacina, gentamicina	7
<i>Serratia sp</i>	Netilmicina, nitrofurantoina, penicilina, cefotaxima, cefalotina, ceftriaxona,, gentamicina	7
<i>Klebsiella sp</i>	netilmicina, nitrofurantoina, penicilina, ampicilina, ceftriaxona, amikacina, gentamicina y dicloxacilina	9
<i>Pseudomona sp</i>	Netilmicina, penicilina, cloranfenicol, ampicilina, cefotaxima, cefalotina, trimetoprim con sulfametoxazol, dicloxacilina	8
<i>Acinetobacter sp</i>	ampicilina, cefotaxima cefalotina	3
<i>Escherichia coli</i>	netilmicina, cefalotina, amikacina, gentamicina y dicloxacilina	5

Cuadro 7. Bacterias aisladas con su respectiva sensibilidad a antimicrobianos de trabajos similares.

<i>Bacillus</i> sp	Netilmicina, nitrofurantoina, penicilina, ampicilina, ceftriaxona, amikacina, gentamicina y dicloxacilina	9
<i>Proteus</i> sp, <i>Enterobacter</i> sp	Netilmicina, nitrofurantoína, penicilina, cloramfenicol, ampicilina, ceftriaxona, cefalotina, cefotaxima, amikacina, gentamicina, trimetoprim con sulfametoxazol, dicloxacilina	12
<i>Enterococcus</i> sp	Netilmicina, nitrofurantoina, penicilina, ampicilina, ceftriaxona, amikacina, gentamicina y dicloxacilina	9
<i>Micrococcus</i> sp	Netilmicina, ampicilina, amikacina, gentamicina, sulfametoxazol, dicloxacilina	6
<i>Staphylococcus</i> sp	Netilmicina, nitrofurantoina, penicilina, ampicilina, ceftriaxona, amikacina, gentamicina y dicloxacilina	8
<i>Aerococcus</i> sp	Netilmicina, penicilina, ampicilina, cefotaxima, cefalotina, ceftriaxona, gentamicina, sulfametoxazol, dicloxacilina	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina, ampicilina, cefotaxima, cefalotina	4

Las cepas identificadas como *Klebsiella* sp, *Pseudomona* sp, *Serratia* sp y *Escherichia coli*, reportadas anteriormente en trabajos relacionados con semen post congelado de bovino, mostraron multirresistencia a los antimicrobianos probados en este trabajo, mostrando una resistencia marcada a las familias de los betalactámicos, aminoglucósidos y cefalosporinas. En específico *Citrobacter* sp y *Acinetobacter* sp, no se había reportado anteriormente en trabajos relacionados con semen de bovino, estas cepas también presentaron multirresistencia a los antimicrobianos probados. Mientras que las cepas identificadas como *Proteus* sp y *Enterobacter* sp, mostraron sensibilidad a todos los antibióticos probados en el presente trabajo, por último, *Bacillus* sp, *Enterococcus* sp, *Aerococcus*, sp, *Staphylococcus* sp, *Micrococcus* sp y *Staphylococcus* sp, mostraron una alta sensibilidad a las familias de los betalactámicos, nitrofuranos, cefalosporinas y sulfonamidas. La presencia de multirresistencia en las cepas aisladas de muestras de semen post congelado indica un mal uso de los antimicrobianos en las explotaciones, al igual evidencia que los tiempos de congelación durante el protocolo de criopreservación son ineficientes, pues el tiempo requerido para la acción del antibiótico, no es suficiente sobre las cepas bacterianas, o bien las concentraciones de antimicrobianos presentes en los diluyentes seminales no son suficientes y las bacterias adquieren resistencia a ellos. Hernández *et al.* (2002) quienes aislaron *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter hafniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia rubidaea* y *Serratia liquefaciens*, a partir de 64 muestras de semen de bovino post congelado provenientes de 4 empresas dedicadas a la venta de semen congelado en México, de los antibióticos utilizados, tanto para organismos Gram positivos y Gram negativos, observaron resistencia por parte de los microorganismos aislados principalmente, a la pefloxacina, ampicilina, cefotaxima y trimetoprim/sulfametoxazol, indicando el uso repetido de ciertos antibióticos como causa de la resistencia de los microorganismos frente a estos fármacos. De forma similar a los resultados de este trabajo donde la multirresistencia se adjudica al mal uso de los antimicrobianos y puede ser al uso repetitivo de ellos. Las bacterias Gram negativas mostraron mayor resistencia que las bacterias Gram positivas.

Najee *et al.*, (2012) aislaron *Pseudomona aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* a partir de 100 pajillas de semen de bovino importadas, en Bagdad, Irak, dichos aislados mostraron una resistencia en un 100% a gentamicina, tobramicina, amikacina y ceftriaxona, donde reportan el amplio uso de estos antimicrobianos como la causa del alto porcentaje de resistencia a dichos fármacos, la resistencia de la cepa *Pseudomona aeruginosa*, concuerda con la aislada en el presente trabajo en el caso de la resistencia a las cefalosporinas y los aminoglucósidos. Abro *et al.*, (2016) aislaron *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius* a partir de semen de bovino post congelado en Pakistán, dichos aislados mostraron resistencia a trimetoprim con sulfametoxazol, amoxicilina y cefalexina. La sobredosificación de los antimicrobianos en las explotaciones representa un grave problema pues esto puede llevar a una resistencia por parte de los microorganismos causada por este fenómeno, es por esto la importancia de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos para la dosificación correcta, determinación del periodo y las condiciones de administración y comunicación de los efectos adversos, incluyendo el desarrollo de la resistencia antimicrobiana (OIE, 2018; Sarker *et al.* 2007). De las 14 cepas, *Proteus* spp y *Enterobacter* spp mostraron sensibilidad al 100% de los antimicrobianos, donde se probó ampicilina, gentamicina, penicilina y sulfametoxazol indicando las dosis de concentración mínima inhibitoria de 0.31, 0.38, 0.16 y 0.16 µg/ml respectivamente para *Proteus* spp y 5, 3, 5 y 12.5 µg/ml respectivamente para *Enterobacter* spp como se observa en el cuadro 7. *Escherichia coli* fue tratada con ampicilina y penicilina indicando las dosis de concentración mínima inhibitoria de 0.63 y 3 µg/ml respectivamente. Y *Citrobacter* spp, *Serratia* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomona* spp, *Acinetobacter* spp, *Enterococcus* spp, *Micrococcus* spp y *Staphylococcus aureus* fueron tratadas únicamente con sulfametoxazol, siendo 12.5 µg/ml la concentración mínima inhibitoria necesaria para tratar a todas las cepas. La alta sensibilidad de estas bacterias a al menos un antimicrobiano es de suma importancia pues permite aplicar

una concentración adecuada de antimicrobiano en las dosis seminales para la inhibición bacteriana y evitar la propagación de enfermedades infectocontagiosas. Trujillo y Rivera (2002) quienes aislaron *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, a partir de muestras de semen fresco y post congelado, dichos aislados presentaron sensibilidad a gentamicina, tilosina y lincomicina, afirmaron el uso de estos antibióticos al ser de utilidad para la congelación seminal. Patel *et al.* (2011) aislaron *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus vulgaris* a partir de 20 pajillas francesas de semen post congelado de bovinos Holstein Frisón y toros cruzados, en Guyarat, India, dichos aislados mostraron sensibilidad a tetraciclina, gentamicina, eritromicina y espectinomicina describieron el uso de ampicilina y su efecto toxico y perjudicial sobre los espermatozoides al usarlos en la criopreservación del semen. Panchal *et al.* (2012) quienes aislaron *Micrococcus luteus* y *Micrococcus* spp, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp y *Enterobacter* spp a partir de 44 dosis de semen post congelado de búfalos en Guyarat, India, dichos aislados mostraron resistencia a ampicilina y sensibilidad a eritromicina, gentamicina y espectomicina, describieron el uso de ampicilina y su efecto toxico y perjudicial sobre los espermatozoides al usarlos en la criopreservación del semen. Goularte *et al.* (2020) aislaron *Aeromonas* spp, *Enterobacter* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Rhizobium* spp, a partir de 35 pajillas de semen post congelado de bovinos en el sudestes de Brasil, el 100% de dichos aislados mostraron resistencia a penicilina, el 76.4% presentó sensibilidad a gentamicina y el 40% mostraron sensibilidad a estreptomycin/lincomicina, de acuerdo a los resultados de prueba de sensibilidad, se utilizaron los mismos aislados bacterianos para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida con los siguientes antibióticos: gentamicina, tilosina, lincomicina y un combinado de lincomicina-espectomicina (GTLS), incluso con la adición de antimicrobianos al semen reducen la contaminación bacteriana y el riesgo de transmisión de enfermedades vía inseminación artificial, esto no previene el desarrollo de resistencia a antimicrobianos por parte de los aislados bacterianos y aun cuando los antibióticos deberían ser adicionados en los extendidos seminales,

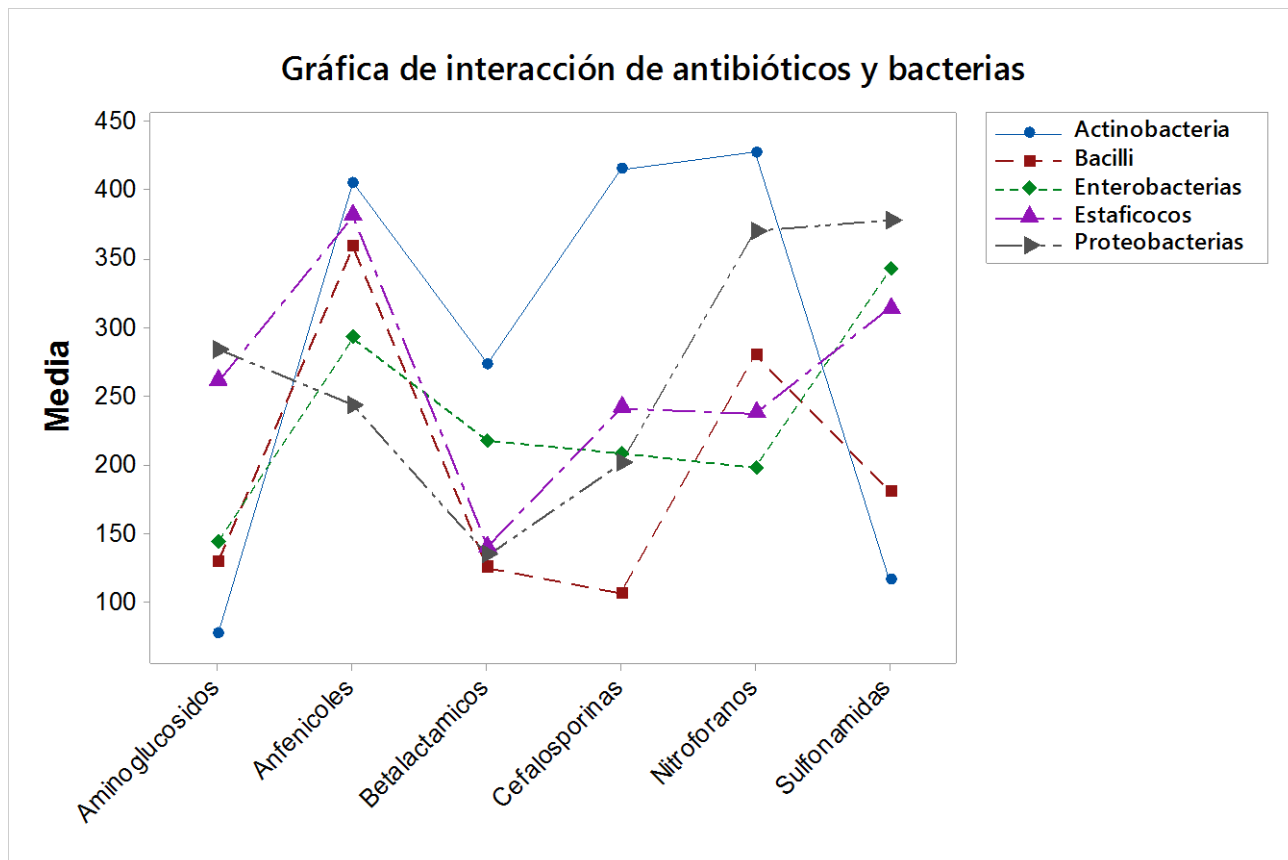
con una concentración adecuada para permitir el control efectivo de crecimiento bacteriano, la eficiencia de los GTLS va en descenso.

Cuadro 8. Resistencias antimicrobianas de las cepas aisladas de muestras de semen post congelado de los estados de Sinaloa y Durango.

Ant	Conc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NET	30 µg	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
NF	300 µg	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S
PE	10 U	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R
CL	30 µg	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
AM	10 µg	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
CFX	30 µg	S	I	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
CF	30 µg	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
CTX	30 µg	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S
AK	30 µg	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S
GE	10 µg	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S
STX	25 µg	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	R	R	R	S
DC	1 µg	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R

R- Resistente I-Intermediario S-Sensible

Figura 1. Gráfica de interacción de antibióticos y bacterias.



Comúnmente los aminoglucósidos, los betalactámicos y las lincosamidas han sido las familias de elección a agregar en los diluyentes seminales (Raheja *et al.*, 2018), pero de acuerdo con los resultados anteriores se puede concluir que los anfenicoles, los nitrofuranos y las sulfonamidas son las mejores familias de antimicrobianos para contrarrestar a los géneros bacterianos presentes en los aislados de semen de bovino post congelados, pues estos presentan una mejor interacción con las bacterias. En algunos países como Brasil y la Unión Europea, se recomienda usar cualquiera de las dos combinaciones como gentamicina, tilosina lincomicina y espectinomicina o penicilina, estreptomina, lincomicina y espectomicina (UE 2016/429; Brasil, 2003), al igual en México con la NOM-032-ZOO-1995, la cual dicta el semen debe ser tratado con los antibióticos de acuerdo con la cantidad obtenida siendo espectomicina (300 µg/ml), tilosina (50 µg/ml), gentamicina (250 µg/ml) y lincomicina (150 µg/ml).

Cuadro 9. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida por cepa y tratamientos.

Tx	Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Cepa 6		Cepa 7		Cepa 8		Cepa 9		Cepa 10		Cepa 11		Cepa 14	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Ampicilina	-	-	-	-	0.31	0.63	-	-	-	-	-	-	5	10	0.63	1.25	-	-	-	-	-	-
Penicilina	-	-	-	-	0.38	0.75	-	-	-	-	-	-	3	6	3	6	-	-	0.05	0.09	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	0.16	0.31	-	-	-	-	-	-	5	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazol	12.5	25	12.5	25	0.16	0.78	12.5	25	12.5	25	12.5	25	12.5	25	-	-	12.5	25	-	-	12.5	25

Concentración en µg /ml

Se ha reportado las implicaciones negativas por la presencia de bacterias en el semen, pues traen consigo la respuesta inmunitaria local provocando una infiltración de leucocitos lo cual conduce a la producción y secreción de citocinas, esto está asociado con una alta disminución en el potencial reproductivo, aunado a esto de las bacterias identificadas, se ha informado la presencia de *Escherichia coli* como causa de aglutinación de los espermatozoides, disminuye la motilidad espermática y daña la membrana plasmática de los espermatozoides, al igual, la presencia de *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae* provocan una alta disminución de la motilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento y los toros con presencia de *Pseudonoma aeruginosa* en sus tractos reproductivos, tienden a tener crías deficientes de tamaño y peso. También se ha descrito a los coliformes como *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp y *Citrobacter* spp con frecuencia están implicados en ovaritis, metritis, esterilidad y aborto en hembras (Medo *et al.*, 2021; Duracka *et al.*, 2021; Althouse *et al.*, 2008; Trujillo y Rivera, 2002). Actualmente la resistencia antimicrobiana es un grave problema de salud pública pues se encuentra en aumento; entre los factores más importantes relacionados con la diseminación de bacterias multirresistentes está el uso inapropiado de antibióticos y la aplicación insuficiente de las medidas de prevención y control (Oteo y Belen 2015). Adicionalmente, las bacterias tienen la capacidad de mutar o generar mecanismos de transferencia de genes de resistencia mediante plásmidos, transposones e integrones; el aumento de la multirresistencia a antimicrobianos en algunas de las principales bacterias patógenas supone una amenaza para la salud animal, salud pública y la salud individual de los pacientes, las infecciones producidas por bacterias multirresistentes son más difíciles de tratar, generan una demora en el inicio de un tratamiento antibiótico eficaz y, como consecuencia, presentan una peor evolución y una mayor mortalidad a las producidas por bacterias sensibles a los antibióticos, es por lo cual la contención de esta expansión es una de las prioridades de la salud pública, por tanto, una detección precoz de las infecciones por bacterias multirresistentes es esencial (Calero, *et al.*, 2019; Oteo, *et al.*, 2015). Recientemente se ha reportado el uso de gentamicina, tilosina, lincomicina y espectomicina en los diluyentes seminales, aun cuando debería ser

evitado su uso, pues la mayoría de las bacterias presentan resistencia a dichos antimicrobianos (Goularte *et al.*, 2020; Akhter *et al.*, 2013). Es por la multirresistencia a antibióticos y por la presencia de bacterias patógenas en el semen post congelado que el uso de una nueva combinación de antimicrobianos y una búsqueda de tratamientos alternativos es de gran importancia (Calero, *et al.*, 2019). El uso de los anfenicoles (Santos y Silva, 2020) y las sulfonamidas (Feng *et al.*, 2019) ha sido demostrado como útil para tratar a las bacterias presentes en el semen y no tienen efectos adversos en él, aun cuando no se ha probado su eficacia en combinación, se puede recomendar su adición a los diluyentes seminales. Otra terapia alternativa como los bacteriófagos presenta una gran ventaja pues los fagos pueden seleccionarse y producirse a gran escala a nivel de laboratorio en meses, estos tienen la capacidad de crecer exponencialmente en el sitio de la aplicación potencial de la bioterapia permitiendo de esta manera un mayor efecto en el sitio de la infección y desarrollar cocteles de fagos para tratar bacterias resistentes es más rápido y barato a la elaboración de nuevos antibióticos; los fagos son específicos para sus células hospederas lo cual evita la eliminación de otros microbios beneficiosos, la aplicación de fagos en bioterapia es mínima y los efectos secundarios son nulos o muy mínimos en humanos, animales y plantas, los fagos pueden combinarse con otros tratamientos y drogas, como cocteles de fagos y antibiótico, las bacterias adquieren baja resistencia a fagos y en caso de la presencia de dicha resistencia hacia ellos, estos tienen la capacidad de mutar por su naturaleza vírica (Álvarez-Cabalceta y Salas-Ocampo, 2021; Prada-Peñaranda *et al.* 2014; Segundo *et al.* 2010).

VII. CONCLUSIONES

El 72.2% de las muestras presentaron crecimiento bacteriano y el 44.4% de estas mostraron concentraciones bacterianas por encima de los límites recomendados por la norma NOM-092-SSA-1994 (500 UFC/ml), indicando que las condiciones de colecta y procesamiento del semen no son las más adecuadas, con implicaciones negativas en la calidad seminal. Se identificaron 14 cepas bacterianas, 6 Gram positivas como *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp y *Staphylococcus aureus*; y 8 Gram negativas como *Citrobacter* spp, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomona* spp, *Acinetobacter* spp, *Enterobacter* spp y *Escherichia coli*, lo cual indica una contaminación cruzada posiblemente debido a una ineficiente técnica de recolección, por el mal manejo del semen en el proceso de congelación o bien, los sementales presentan enfermedades asintomáticas causadas por bacterias. Sería adecuado implementar un Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (del inglés HACCP), al momento de la colección y congelación seminal. La microbiota Gram positiva resultó con alta resistencia antimicrobiana, principalmente a los aminoglucósidos, betalactámicos y cefalosporinas, así como la microbiota Gram negativa mostró resistencia por lo menos a un antimicrobiano de las familias de los aminoglucósidos, anfenicoles, betalactámicos, cefalosporinas y sulfonamidas. Lo cual indica un mal manejo de los antimicrobianos en las explotaciones, como una sobredosificación o el uso repetitivo de estos. Se presentó una alta sensibilidad a los aminoglucósidos, betalactámicos, cefalosporinas, nitrofuranos, anfenicoles y sulfonamidas por parte de *Proteus* spp y *Enterobacter* spp. La implicación del presente trabajo sugiere necesaria la búsqueda de terapias alternativas para el control efectivo de la transmisión de enfermedades infectocontagiosas vía inseminación artificial. Una alternativa sería la adición de anfenicoles y las sulfonamidas a diluyentes seminales, por lo menos en las explotaciones de Sinaloa y Durango pues se demostró como útiles para tratar a las bacterias presentes en el semen sin efectos adversos en él. Así como la implementación de otras terapias alternativas como los bacteriófagos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abro, S. H. (2016). Antibiograma de *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius* aislado del semen congelado bovino. *Biología Pura y Aplicada*, 5(2), 204–212. <https://doi.org/10.19045/bspab.2016.50027>
- Ahmed, E., Islam, M. S., Alam, M. G. S., Jha, P. K., Ghosh, S., Naher, N., y Bari, F. Y. (2018). Contaminación bacteriana del semen de carnero utilizado para la inseminación artificial en ovejas autóctonas. *Veterinaria de Bangladesh*, 34(1), 20-26. <https://doi.org/10.3329/bvet.v34i1.38709>
- Aires, V., Hinsch, K., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01369-9)
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Qadeer, S., Iqbal, R., & Ullah, N. (2013). Efficiency of ciprofloxacin for bacterial control, post-thaw quality, and in vivo fertility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 80, 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.001>
- Althouse, G., Pierdon, M., & Lu, K. (2008). Dinámica termotemporal de bacterias contaminantes y antimicrobianos en semen porcino extendido. *Teriogenología*, 70(8), 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.010>
- Álvarez-Cabalceta, H., & Salas-Ocampo, O. (2021). Bacteriófagos: terapia alternativa para el control de infecciones bacterianas. *Gestión en Salud y Seguridad Social*, 1(12), 27–30.

- Andrabi, S. M. H., Khan, L. A., & Shahab, M. (2016). Isolation of bacteria in semen and evaluation of antibiotics in extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*, 48, 1166–1174. <https://doi.org/10.1111/and.12555>
- Arango, J., Durán, C., Lizaraazo, J., & Duarte, J. (2017). Development of automation and control system for the freezing of bovine semen. *TECCIENCIA*, 12(23), 69-74. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6070558>
- Asenjo, A., Oteo-Iglesias, J., & Alós, J. I. (2021). ¿Qué hay de nuevo en los mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias de origen clínico? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 39(6), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.02.017>
- Aurich, C., & Sperser, J. (2007). Influencia de las bacterias y la gentamicina en los espermatozoides de sementales almacenados enfriados. *Teriogenología*, 67(5), 912–918. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.004>
- Aymée, L., Gregg, W., Loureiro, A., di Azevedo, M., Pedrosa, J., Melo, J., Carvalho-Costa, F., de Souza, G., & Lilenbaum, W. (2021). Leptospirosis genital bovina y trastornos reproductivos de vacas subfértiles en condiciones de campo. *Microbiología Veterinaria*, 261, 109213. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109213>
- Azawi, O. I., y Ismaeel, M. A. (2011). Efectos de las estaciones en algunos parámetros del semen y la contaminación bacteriana del semen de Awassiram. *Reproducción en animales domésticos*, 47(3), 403-406. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01888.x>
- Bandeira, T., Barboza, D., Furtado, L., Viana, A., Peres de Souza, L., Magloire, J., & Toniolli, R. (2015). The use of skimmed dried milk as an alternative diluent

for the cooling step during the boar sêmen freezing procedure. *Ciências Agrárias*, 36(1), 2023- 2030. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2023>

Baruselli, P., Ferreira, R., Sá Filho, M., & Bó, G. (2018). Revisión: Uso de inseminación artificial vs. servicio natural en rebaños de carne. *Animal*, 12, s45-s52. <https://doi.org/10.1017/s175173111800054x>

Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. En *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>

Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J.A., Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 29:601-608. <http://doi.10.1016/j.eimc.2011.03.012>

Burroughs, C., Graham, J., Lenz, R., & Seidel, G. (2013). Efectos del plasma seminal sobre los espermatozoides bovinos de clasificación sexual. *Teriogenología*, 79(3), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.024>

Calero, V., Calero, J., Armijos, J., & Troya, G. (2019). La resistencia antimicrobiana: situación actual. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*, 3(2), 307–323. [https://doi.org/10.26820/recimundo/3\(2\).abril.2019.307-323](https://doi.org/10.26820/recimundo/3(2).abril.2019.307-323)

Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., & Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 65(9), 1875–1890. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.017>

Chipana, G. (2014). Análisis de la flora microbiana del semen bovino (*bos taurus*) antes y después del congelamiento en la estación experimental choquenaira. Universidad Mayor de San Andres. Tesis de grado. Repositorio: [Análisis de la](#)

[flora microbiana del semen bovino \(Bos taurus\) antes y después del congelamiento en la Estación Experimental Choquenaira \(umsa.bo\)](#)

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2021. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100. PP352. ISBN 978-1-68440-104-8(Print); ISBN 978-68440-105-5 (Electronic). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf

Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos(EUCAST). Tablas de puntos de interrupción para la interpretación de miCs y diámetros de zona, version 10.0, 2022

Cremades, T; Roca, J; Rodriguez Martinez, H; Abaigar, T; Vazquez, J. M; Martinez, E. A. (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26(5), 610–618

Dalton., J. (2013). Características del semen de relevancia para la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo. *Revista Taurus*, 59(15), 22–35. <https://www.revistataurus.com.ar/sistema/uploads/1129/entradas/06-conferencias-59.pdf>

Davies, J & Davies, D. 2010. Orígenes y evolución de la resistencia a los antibióticos. *Revisiones de microbiología y biología molecular*, 74:417–433.

Dietz, J., Sertich, P., Boston, R., & Benson, C. (2007). Comparación de ticarcilina y piperacilina en el extensor de semen de Kenney. *Teriogenología*, 68(6), 848–852. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.031>

Duracka, M., Belic, L., Tokarova, K., Ziarovska, J., Kacaniova, M., Lukac, N., & Tvrda, E. (2021). Comunidades bacterianas en eyaculados bovinos y su impacto en la calidad del semen. *Biología de Sistemas en Medicina Reproductiva*, 67(6), 438–449. <https://doi.org/10.1080/19396368.2021.1958028>

- Duracka, M., Kovacik, A., Kacaniova, M., Lukac, N., & Tvrda, E. (2020). Las bacterias pueden deteriorar la motilidad progresiva de los espermatozoides bovinos y los parámetros bioquímicos del plasma seminal. *Revista de microbiología, biotecnología y ciencias de los alimentos*, 9(4), 844–847. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.844-847>
- Echevarria, J. (2015). Resistencia bacteriana. *Revista Médica Herediana*, 9(2), 53. <https://doi.org/10.20453/rmh.v9i2.2384>
- Feng, T., Ren, F., Fang, Q., Dai, G., Li, Y., Li, Q., Xi, H., Li, H., Hao, Y. & Hu, J. (2019). Effects of sulfanilamide on boar sperm quality, bacterial composition, and fertility during liquid storage at 17°C. *Animal Science Journal*, 90(9), 1161-1169. <https://doi.org/10.1111/asj.13281>
- Fraczek, M., & Kurpisz, M. (2015). Mecanismos de los efectos nocivos de la infección bacteriana del semen en los espermatozoides humanos eyaculados: potenciales marcadores inflamatorios en el semen. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 53(3), 201–217. <https://doi.org/10.5603/fhc.a2015.0019>
- Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 27. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Galvis, V., Tello, A., Guerra, A., Acuña, M. F., & Villarreal, D. (2013). Sensibilidad antibiótica de bacterias obtenidas de queratitis e infecciones intraoculares en la Fundación Oftalmológica de Santander (FOSCAL), Floridablanca, Colombia. *Biomédica*, 34(0), 23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1636>
- Gangwar, C., Mishra, A. K., Gururaj, K., Kumar, A., Kharche, S. D., Saraswat, S., Kumar, R. & Ramachandran, N. (2021, 25 febrero). Semen quality and total

microbial load: An association study in important Indian Goat breeds during different seasons. *Andrologia*, 53(4). <https://doi.org/10.1111/and.13995>

Gastelo, R., & Maguiña, C. (2018). Mecanismos de resistencia bacteriana. *Diagnóstico*, 57(2), 82–86. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.139>

Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. D. R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta de México*, 156(2). <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>

Giraldo, J. (2017). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4(1), 51–57. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69540108.pdf>

Givens, M. (2018). Revisión: Riesgos de transmisión de enfermedades a través del semen en el ganado. *Animal*, 12, s165-s171. <https://doi.org/10.1017/s1751731118000708>

Gloria, A., Contri, A., Wegher, L., Vignola, G., Dellamaria, D., & Carluccio, A. (2014). Los efectos de las adiciones de antibióticos a los extensores en el semen de toro fresco y congelado-descongelado. *Ciencia de la Reproducción Animal*, 150(1–2), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.012>

Gómez, J. (2019). Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de guerrero en el laprosem–uagro. Universidad Autónoma de Guerrero. Tesis de grado. Repositorio: [Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de Guerrero en el laprosem-UAGro.](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.012)

- Goshme, S., Asfaw, T., Demiss, C., & Besufekad, S. (2021). Evaluación de la motilidad y morfología del semen de toro congelado bajo diferentes métodos de descongelación utilizados para la inseminación artificial en la zona de Shewa del Norte, Etiopía. *Heliyon*, 7(10), e08183. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08183>
- Goularte, K. L., Ferreira, C. E. R., Madeira, E. M., Duval, E. H., Vieira, A. D., Mondadori, R. G. & Lucia, T. (2018). The implementation of a HACCP system improved the efficiency of a bull semen collection and processing center. *Animal Reproduction*, 15(2), 108-113. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2017-022>
- Goularte, K. L., Voloski, F. L. S., Redú, J. F. M., Ferreira, C. E. R., Vieira, A. D., Duval, E. H., Mondadori, R. G., & Lucia, T. (2020). Antibiotic resistance in microorganisms isolated in a bull semen stud. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(3), 318–324. <https://doi.org/10.1111/rda.13621>
- Hancock, R. (1997). La membrana externa bacteriana como barrera antidrogas. *Tendencias en Microbiología*, 5(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(97\)81773-8](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)81773-8)
- Hernández, P., Fernández, R., González, C., & Gutiérrez, R. (2002). Estudio bacteriológico y antibiograma de semen descongelado de bovino. *Revista de Salud Animal*, 24(3), 191+. <https://link.gale.com/apps/doc/A146356063/IFME?u=googlescholar&id=googleScholar&xid=7286b494>

Herold, F. C., de Haas, K., Colenbrander, B., & Gerber, D. (2006). Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using TriladyITM or AndroMed®. *Theriogenology*, 66(5), 1123-1130. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.007>

Holguín, H., Amariles, P., & Ospina, W. (2017). Interacciones evolutivas como un posible mecanismo de interacción medicamentosa: una aproximación para el control de la resistencia bacteriana. *Revista chilena de infectología*, 34(4), 307–313. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000400307>

Ibáñez, F., Lisarrague, C., Callejas, S., & Condevilla, J. (2016). Inseminación artificial a tiempo fijo: ¿Conviene utilizar semen «fresco» en lugar de congelado? (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires). [¿Recuperado de https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1191/Ibáñez_Federico.PDF?sequence=1&isAllowed=y](https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1191/Ibáñez_Federico.PDF?sequence=1&isAllowed=y)

INAFED. 2020. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM25sinaloa/municipios/25006a.html#:~:text=Sinaloa%20%2D%20Culiac%C3%A1n&text=Culiac%C3%A1n,adoran%20al%20Dios%20Coltzin%22%E2%82%AC%20>. Fecha de consulta: 01 de Agosto del 2020.

INTAGRI. 2020. Inseminación Artificial en Bovinos. Núm. 64. Artículos técnicos de INTAGRI. México. 3 p.

Ishaq, R., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Qadeer, S., & Akhter, S. (2019). Evaluation of enrofloxacin for use in cryopreservation of Zebu bull (*Bos indicus*) semen. *Biopreservation and Biobanking*, <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0133>

- Kaiser GE. Manual de Laboratorio de Microbiología. 2017. El Colegio Comunitario del Condado de Baltimore, Campus de Catonsville. UK. <http://faculty.ccbcmd.edu/~gkaiser/>
- Kastelic, J. P. (2013). Participación del macho en la fertilidad y factores que afectan la calidad del semen en toros. *Fronteras Animales*, 3(4), 20–25. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0029>
- Khan, M., Sinha, P., Perumal, P., & Hazarika, S. (2017). Cryopresevation of mithun semen: Comparative study of conventional vs controlled freezing. *Indian Journal of Animal Sciences*, 87(6), 728-730. Recuperado de <https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/24709/1/Khan-4.pdf>
- Lepe, J., & Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
- Lizarbe, M. A. (2009). Bacterias y virus. ¿Cómo nos defendimos? *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(1), 115–172. <https://rac.es/ficheros/doc/00919.pdf>
- Madera, D., y Rivera, A. (2019). Recolección de semen de bovino de biotipo pizán para su caracterización y conservación de un banco de recursos genéticos. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Tesis de grado. Repositorio: <http://190.15.137.77/handle/11010/395>
- Manterola, C. y Otzen, T. 2014. Estudios observacionales. Los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. *International Journal of Morphology.*, 32(2):634-645.
- Marizancén Silva, M. A., & Artunduaga Pimentel, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a

- tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 247–259.
<https://doi.org/10.22490/21456453.2050>
- Martínez, J., Coque, T., & Baquero, F. (2014). ¿Qué es un gen de resistencia? Clasificación del riesgo en resistomes. *Nature Reviews Microbiología*, 13(2), 116–123. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- Medina-Robles V. M., Velasco-Santamaría Y. M., Cruz Casallas P. E. 2006. Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad. *Revista Orinoquía*. 10: 71-77
- Medo, J., Ziarovska, J., Duracka, M., Tvrda, E., Banas, T., Gabor, M., Kysel, M., & Kačániová, M. (2021). Microbioma central del semen de toros de cría frisonas holstein eslovacos. *Animals*, 11(11), 3331.
<https://doi.org/10.3390/ani11113331>
- Mejía, J. (2017). Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. Universidad de Cuenca. Tesis de grado. Repositorio:
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26940>
- Michi, A. N., Favetto, P. H., Kastelic, J., & Cobo, E. R. (2016). Una revisión de la tricomoniasis y campilobacteriosis bovinas de transmisión sexual que afectan la salud reproductiva del ganado. *Teriogenología*, 85(5), 781–791.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.037>
- Miranda, M., & Morales, S. (2022). Evaluación de la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de mastitis subclínica en bovinos de establos lecheros de Lurín, Lima. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 10(1), 8–15.
<https://doi.org/10.20453/stv.v10i1.4235>

- Moore, S., & Hasler, J. (2017). Una revisión de 100 años: Tecnologías reproductivas en la ciencia láctea. *Revista de Ciencias Lácteas*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Moraga Bravo, L. D. (2010). Primeros antecedentes poblacionales sobre el complejo rinotraqueitis infecciosa bovina-vulvo vaginitis postular infecciosa (RIB/VPI), en Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 4(2). <https://doi.org/10.5354/0716-260x.1989.4563>
- Morales, S., Pantoja, C., D, G., & Solís, N. (2013). Evaluación de la carga bacteriana en pajillas de semen congelado de toros del banco nacional de semen. *Científica*, 120(1), 28–36.
- Morrell, J., Núñez-González, A., Crespo-Félez, I., Martínez-Martínez, S., Martínez Alborcia, M. J., Fernández-Alegre, E., Dominguez, J., Gutiérrez-Martín, C., & Martínez-Pastor, F. (2019). Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. *Theriogenology*, 126, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.028>
- Morrell, J., Klein, C., Lundeheim, N., Erol, E., & Troedsson, M. (2014). Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*, 145(1–2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.005>
- Morrell, J. & Mayer, I. (2017). Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*, 25(5), 545-557. <https://doi.org/10.1017/s0967199417000442>
- Morrell, J. y Walgreen, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders. A review. *Pathogens*, 3(4): 934–946
- Morrell, J., & Wallgren, M. (2011). Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 123(1–2), 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.005>

- Morillo, M., Salazar, S. y Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. pp. 23-28.
- Muiño, R., & Peña, A. (2009). Estudio comparativo de tres diluyentes: Andromed®, Biociphos Plus® y Biladyl®. Evaluación de la supervivencia y longevidad espermáticas post-descongelación de espermatozoides bovinos . XXXIX Jornadas de Estudio. XIII Jornadas sobre producción Animal, 1, 714-716. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3209305>
- Murray, B. (2019). Mecanismos de resistencia a los carbapenémicos: explorando las complejidades. Resistencia a los antimicrobianos, 1(1). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlz013>
- Najee, H., Al-Shawii, A., & al Rahman, L. (2012). Bacterial Contamination of Imported Bulls Frozen Semen. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences*, 5(1), 54–62.
- OIE. 2021. Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente. <book-amr-esp-fnl-lr.pdf> (woah.org)
- OIE. 2020. Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/productos-veterinarios/antimicrobianos/> E-AMRstrategy.pdf
- OIE. 2018. Directrices de la OIE sobre las competencias de los paraprofesionales de veterinaria. DOI: <http://dx.doi.org/10.20506/PVS-2758>
- Oliveira W., Santos J., Ferreira A., Bittar R., Bitta. F., & Brasão S. (2016). Principales bacterias gramnegativas aisladas de mastitis bovina y su perfil de resistencia antimicrobiana en propiedades en el municipio de Uberaba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista de Educación Continua en Medicina Veterinaria y*

Ciencia Animal, 14(3), 83-83. <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/34944>

Olsen, S., & Tatum, F. (2010). Brucelosis bovina. Clínicas veterinarias de América del Norte: práctica de alimentos para animales, 26(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.006>

Ospino, K., Castilla, M., & Sánchez-Mora, R. (2018). Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica. Nova, 16(29), 91–100. <https://doi.org/10.22490/24629448.2692>

Oteo, J., y Belén Aracil, M. (2015). Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: Staphylococcus aureus resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 33, 27–33. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(15\)30012-4](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(15)30012-4)

Panchal, S., Pathak, V., & Patel, R. (2012). Estimation of microbial load and their biochemical properties in frozen semen of murrah buffalo bulls (*Bubalus Bubalis*). *Wayamba Journal of Animal Science*, 3(2), 63–74.

Patel H., Patel, K., & Chauhan, P. (2011). Biochemical properties of microbial load in frozen semen of cattle. *Wayamba Journal of Animal Science*, 5(8), 13–18. https://www.researchgate.net/publication/234061895_Biochemical_properties_of_microbial_load_in_frozen_semen_of_cattle

Pillajo, G. (2018). Evaluación de la viabilidad, motilidad y cambios de morfología espermática post-descongelación de semen ovino de dos razas (poll dorset y corriedale) empleando tres tipos de diluyentes comerciales. Tesis de grado. Repositorio: [PILLAJO ZAMBRANO GONZALO FERNANDO.pdf \(uagraria.edu.ec\)](https://repositorio.uagraria.edu.ec/files/2018/08/PILLAJO_ZAMBRANO_GONZALO_FERNANDO.pdf)

Prada-Peñaranda, C., Holguin-Moreno, A. V., González-Barrios, A. F., & Vives-Florez, M. J. (2014). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones

bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 43.
<https://doi.org/10.11144/javeriana.sc20-1.faci>

Quintero Barbosa, J., Corredor Figueroa, A. P., Salas, S. S., Camargo, H., Sánchez, A., Tobón, J., Ortiz, D., Schachtebeck, E., & Gutierrez, M. F. (2019). Alta prevalencia de animales persistentemente infectados por diarrea viral bovina en bovinos colombianos. *BMC Investigación veterinaria*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1769-5>

Quiñones, D. 2017. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69: 3-12

Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N. & Kumar, N. (2012). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3),
www.entomoljournal.com

Rana, N., Vaid, K., Phulia, S., & Singh, P. (2012). Evaluación de la diversidad bacteriana en el semen fresco de bubalino. *Revista India de Ciencias Animales*, 82(6), 596–598.

Reda, A. A., Almaw, G., Abreha, S., Tadeg, W. & Tadesse, B. (2020). Bacteriospermia and Sperm Quality of Cryopreserved Bull Semen Used in Artificial Insemination of Cows in South Wollo Zone, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2020, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/2098315>

Rego, J., Moura, A., Nouwens, A., McGowan, M., & Boe-Hansen, G. (2015). Perfiles de proteínas plasmáticas seminales de eyaculaciones obtenidas por vagina artificial interna y electroeyaculación en toros Brahman. *Ciencia de la Reproducción Animal*, 160, 126–137.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.07.015>

Restrepo, G., Rodríguez, L., & Duque, J. (2016). Proliferación Microbiana y Calidad Posdescongelación de Semen Equino Criopreservado en Presencia de

Antibióticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2), 316.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11650>

Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31-38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>

Rodrigues, M. D. P. & Valenzuela, M. S. (2019). Efecto del diluyente, temperatura y tiempo de refrigeración en la calidad y fertilidad de muestra seminal de bovinos. *Revista Científica Estudios e Investigaciones*, 8, 203-204.
<https://doi.org/10.26885/rcei.foro.2019.203>

Rosas, J., Aispuro, A., & Pacheco, J. (2021). Programa de Protección Civil. Coordinación Estatal Protección Civil. Durango, 2(1), 12–19.
<http://proteccioncivil.durango.gob.mx/wp-content/uploads/sites/39/2020/06/plan-de-lluvias-y-ciclones-2020-final.pdf>

Salim, N., Salim, A., & Abdallah, S. (2019). Fertility of friesland bull's semen diluted with low fat cow milk. *Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 12(3), 62-66. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1042>

Sánchez T., G., Benito Z., A., & Rivera G., H. (2013). Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado lechero del valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 14(1).
<https://doi.org/10.15381/rivep.v14i1.1604>

Santos, C. S., & Silva, A. R. (2020). Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Animal Reproduction*, 17(1), 17.
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2019-0111>

- Sarker, S., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Ensayo antibacteriano basado en placa de microtitulación que incorpora resazurina como indicador de crecimiento celular, y su aplicación en el cribado antibacteriano in vitro de fitoquímicos. *Métodos*, 42(4), 321–324.
- Sathe, S. (2021). Cryopreservation of Semen. *Bovine Reproduction*, 986–999. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch78>
- Segundo N., Hernandez E., Villegas O., & Torres O. (2010) Los bacteriofagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(3), 17-26
- Selvaraju, S., Parthipan, S., Somashekar, L., Binsila, B. K., Kolte, A. P., Arangasamy, A., Ravindra, J. P., & Krawetz, S. A. (2018). Estado actual de la genómica funcional espermática y su potencial diagnóstico de fertilidad en bovinos (*Bos taurus*). *Biología de Sistemas en Medicina Reproductiva*, 64(6), 484–501. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1444816>
- Sequeira, L. T. (2015). *ANDROLOGIA E INSEMINACION ARTIFICIAL* (1.ª ed., Vol. 1) [Libro electrónico]. UNA. Recuperado 29 de julio de 2022
- Silva, M., Pedrosa, V., Silva, J., Herrera, L., Eler, J., & Albuquerque, L. (2012). Parámetros genéticos de las características andrológicas en la especie bovina. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(1), 1–11. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2012000100002>
- Silveira, E. y Machado, R. (2005). Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. *REDVET*, VI, ISSN 1695-7504.
- Stojkovic, N. (2020). *Semen bovino* | OEC. OEC - El Observatorio de la Complejidad Económica. Recuperado 5 de agosto de 2022, de

<https://oec.world/es/profile/hs/semenbovine#:~:text=En%202020%2C%20Semen%20de%20bovino,del%20total%20de%20comercio%20mundial>

Strzezek, J., Fraser, L., Lecewicz, A., Dziekonska, A., & Sáiz, F. (2004). Aplicaciones bioquímicas y prácticas de un diluyente para la conservación líquida de semen de verraco a 5o y a 16 oC - Dialnet. Avances en tecnología porcina, 1(11), 51-66. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4340087>

Trujillo, L., & Rivera, M. (2002). ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TRATAMIENTOS CON ANTIBIÓTICOS SOBRE LA CALIDAD BACTERIOLÓGICA Y ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 5(1), 1453–1473. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24475>

Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Avances en criopreservación de espermatozoides de toro. Fronteras en Ciencias Veterinarias, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>

Weitze, K. (2014). Benefits of Androhep® Plus and Androstar® Plus Long-term extenders for boar semen (Technical Report. Minitüb GmbH). Recuperado de https://www.minitube.com.br/storage/web/source/en/medialibrary/technicalreports/benefits-of-androhep-plus-and-androstar-plus-long-term-extendere-for-boarsemen/pdf_Technical_report_Androhep&Androstar_en_140528.pdf

Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-Melkus, E., Jung, M., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>

Yániz, J. L; Marco-Aguado, M. A., & Mateos, J. A; Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science*, 122(1–2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>

Zakosek, M., Zrimsek, P., Jakovac, B., Pavsic, K., Knific, T., & Mrkun, J. (2021). Macro y microelementos en suero y plasma seminal como biomarcadores para la criotolerancia del esperma de toro. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00590-2>

Zoca, G., Celeghini, E., Pugliesi, G., Carvalho, C., Assumpcao, M., Siqueira, A., Oliveira, L., Lançoni, R., & Arruda, R. (2021). Influencia del plasma seminal durante las diferentes etapas de la criopreservación de espermatozoides bovinos. *Reproducción en animales domésticos*, 56(6), 872–883. <https://doi.org/10.1111/rda.13928>

