



Fecha de Aprobación: 16 de enero, 2025

Entrada en Vigor: 1 de enero, 2026

REQUISITOS MÍNIMOS DE CSS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN EL SEMEN DESTINADO A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Los “Requisitos Mínimos de los Servicios de Semen Certificados (CSS) para el control de enfermedades en semen destinado a la inseminación artificial” constituyen el estándar mínimo para la supervisión sanitaria y la vigilancia de enfermedades en toros antes de su ingreso al aislamiento, durante el período de aislamiento y durante toda su residencia en un centro de Inseminación Artificial. Este es un estándar integral destinado a regular las enfermedades que representan un riesgo importante de transmisión a través del semen utilizado en la inseminación artificial. Además, describe los procedimientos sanitarios correctos e incluye los requisitos para la adición de antibióticos, tanto en el semen como en el diluyente, con el fin de proporcionar un control de contaminación microbiana de patógenos específicos. El objetivo de estos requisitos es proteger la salud de los sementales donantes y de los hatos en los que se utiliza el semen.

CONDICIONES SANITARIAS GENERALES

1. El equipo de colecta de semen que entre en contacto con el toro, o con sus secreciones o excreciones, deberá desinfectarse rigurosamente después de cada uso. El material desechable deberá eliminarse inmediatamente.
2. El colector deberá utilizar guantes de plástico desechables nuevos para cada toro para evitar que las manos sirvan como medio de transmisión de material infectocontagioso de un toro a otro.
3. El laboratorio utilizado para procesar el semen deberá estar aislado completamente del lugar de estabulación de los toros y del área de colecta del semen, y construido de manera que permita la manipulación y el almacenamiento del semen de forma higiénica.
4. El semen recolectado y procesado que cumpla con los requisitos de este documento se almacenará en contenedores de nitrógeno líquido separados de aquellos que contengan semen de categorías sanitarias inferiores. El semen recolectado en el área de aislamiento deberá almacenarse por separado del semen de residentes calificados hasta que finalicen satisfactoriamente las pruebas del periodo de aislamiento.
5. Las pruebas sanitarias de laboratorio se realizarán en un laboratorio (o laboratorios) de diagnóstico veterinario acreditado por la AAVDL (Asociación Americana de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario) y aprobado por el USDA (Departamento de Agricultura de los EE.UU.) para la ejecución de los análisis requeridos con fines de exportación. En el caso de los centros de IA ubicados fuera de EE.UU., las pruebas deberán realizarse en un laboratorio (o laboratorios) de diagnóstico veterinario aprobado por la autoridad veterinaria competente de ese país para realizar los análisis exigidos para exportación.
6. Los contenedores de transporte criogénico que regresen de países que el USDA no haya declarado libres de fiebre aftosa deberán inspeccionarse para determinar si fueron desinfectados en el puerto de entrada. Si se les desinfectó correctamente, habrá una etiqueta adjunta que así lo indique. Si esto no se realizó, se deberá notificar al veterinario del USDA/APHIS (Servicio de Inspección Sanitaria de Animales y Plantas) del estado implicado y se tomarán inmediatamente las medidas oportunas para asegurar que los contenedores criogénicos de transporte sean desinfectados adecuadamente.

ANIMALES DE MONTA

Los machos de monta (novillos, maniqués) empleados durante la colecta de semen deberán someterse al mismo régimen de pruebas sanitarias periódicas que los toros destinados a producción de semen y deberán mantenerse de forma continua en condiciones sanitarias equivalentes a las de los toros que cumplen con los requisitos de CSS. Los animales de monta no deberán intercambiarse entre los hatos residentes de CSS y las áreas de aislamiento de CSS. Cualquier área del pelaje o la piel del animal de monta que entre en contacto con el pene erecto o las secreciones genitales, deberá limpiarse y desinfectarse efectivamente antes de la colecta del siguiente toro. Hembras bovinas no pueden ser alojadas ni utilizadas como animales de monta o estimulación en las áreas de aislamiento o residencia.

PREINGRESO AL AISLAMIENTO

Los toros o los animales de monta destinados a ingresar a un centro de IA aprobado por CSS deberán estar sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y no deberán provenir de un hato en cuarentena. Después de las pruebas previas al ingreso que se detallan a continuación, los toros y los animales de monta no deberán utilizarse para el servicio natural y deberán permanecer aislados del resto del ganado. Se entiende por aislamiento la ausencia de contacto, directo o a través de cercas, con otros animales del hato.

Los siguientes exámenes y pruebas de diagnóstico de preingreso se deberán realizar antes del ingreso y los resultados de cada toro o animal de monta se deberán recibir antes de su entrada a las instalaciones para comenzar con el período de aislamiento. Estas pruebas deberán realizarse preferiblemente antes de la llegada a las instalaciones de aislamiento del Centro de IA. No obstante, estas se pueden efectuar en una instalación separada del centro de IA como se describe más adelante. En cualquier caso, el período de aislamiento no comenzará hasta que se conozcan los resultados de las pruebas de preingreso y el toro o animal de monta sea trasladado a la instalación de aislamiento.

Para efectos de estos requisitos, las pruebas previas al ingreso se realicen en el Centro de IA, los toros y los animales de monta deben alojarse en instalaciones de preingreso que estén separadas de manera efectiva de las instalaciones ocupadas por los toros y los animales de monta residentes, así como aquellos que se encuentren en las instalaciones de aislamiento. Todo el equipo utilizado para el manejo de los toros y animales de monta, incluido el destinado a la colecta de semen, alimentación, bebida y limpieza en los hatos de aislamiento o residentes no deberá emplearse en las instalaciones de preingreso ni en otras instalaciones ganaderas administradas por el Centro de IA.

1. Examen físico: Un veterinario acreditado por el USDA de categoría II (o su equivalente en otros países) realizará un examen físico dentro de los 30 días previos al ingreso para determinar que los toros o animales de monta no presentan signos clínicos de enfermedades infecciosas y contagiosas.
2. Tuberculosis bovina: Dentro de los 60 días previos al ingreso se realizará una prueba oficial intradérmica del pliegue caudal (PPC) con resultado negativo.

En caso de que el animal tenga un resultado de PPC que no sea negativo, se realizará una prueba confirmatoria para la tuberculosis bovina con resultado negativo de acuerdo con las reglamentaciones y directrices del USDA.

Nota: La normativa internacional para la exportación de semen bovino varía entre los países y no todas las pruebas de tuberculosis bovina aprobadas por el USDA son aceptadas para exportación.

3. Brucelosis bovina: Durante los 30 días previos al ingreso, se realizará una prueba de antígeno tamponado de Brucella (prueba de tarjeta o BAPA) **O** una prueba de fijación del complemento (CF) **O** una prueba de polarización fluorescente (FPA) en suero; el resultado deberá ser negativo.

En caso de que el animal tenga un resultado que no sea negativo, se recomienda realizar otra prueba oficial de brucelosis del USDA. Un resultado negativo en la nueva prueba o en otras pruebas oficiales de brucelosis puede permitir que el toro reciba una clasificación negativa de brucelosis; sin embargo, la clasificación final sigue siendo prerrogativa de los funcionarios veterinarios federales o estatales.

La prueba de brucelosis debe cumplir con las regulaciones aplicables si el animal debe ser transportado entre estados.

4. Leptospirosis bovina: Una prueba de aglutinación microscópica (MAT) en suero para los serotipos *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippityphosa* con resultado negativo. Esta prueba deberá efectuarse dentro de los 30 días previos al ingreso.

Se prefiere un resultado negativo para cada serotipo. Sin embargo, si el resultado no es negativo (es decir, positivo a 1:100 o 1:200) para cualquier serotipo, el bovino debe someterse a una nueva prueba para ese serotipo al menos 14 días después de la prueba anterior. Animales **negativos a 1:400** en dos pruebas consecutivas, se consideran negativos con un título bajo y estable. Ambas pruebas se realizarán dentro de los 30 días previos al ingreso.

5. Virus de la diarrea viral bovina (VDVB): Se deberá realizar una prueba de detección de antígenos para el VDVB dentro de los 30 días previos al ingreso; el resultado deberá ser negativo. La prueba deberá realizarse en sangre completa o suero y podrá consistir en: una prueba PCR **O** una prueba ELISA de captura de antígenos **O** una prueba de aislamiento viral realizada en cultivo celular bovino con un resultado negativo demostrado por la prueba de PCR del cultivo celular o por la tinción del cultivo celular con métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).

AISLAMIENTO

Cada toro o animal de monta deberá permanecer aislado durante el tiempo necesario para completar las pruebas que se indican a continuación. El protocolo de aislamiento se deberá completar satisfactoriamente antes de que se les permita ingresar a las instalaciones del hato residente y antes de que el semen recolectado pueda ser distribuido.

Para los fines de estos requisitos, el aislamiento significará que los toros y los animales de monta se alojan en instalaciones controladas por la empresa de IA y bajo la supervisión de un veterinario acreditado por el USDA de categoría II (o su equivalente para instalaciones de otros países). Estas instalaciones deben estar separadas efectivamente de las instalaciones ocupadas por los toros y animales de monta residentes. Todo el equipo utilizado para manipular los toros y animales de monta durante la colecta de semen, alimentación, abrevado, limpieza de las instalaciones, no deberá intercambiarse entre el hato de aislamiento y el hato residente, a menos que haya un proceso documentado de saneamiento y desinfección del equipo después de cada uso (respaldado por bitácora y POE). Además, las áreas de colecta de semen para los toros en aislamiento deberán estar separadas efectivamente de las áreas utilizadas para el hato residente.

Las siguientes pruebas se deberán efectuar a todos los toros y animales de monta durante su estancia en el área de aislamiento:

1. Tuberculosis bovina: Se realizará una prueba oficial intradérmica de pliegue caudal (PPC) tras un mínimo de 60 días después de la prueba de tuberculosis bovina previa al ingreso y al menos 21 días después de ingresar en la instalación de aislamiento. El resultado deberá ser negativo.

En caso de que el animal tenga un resultado de PPC que no sea negativo, se realizará una prueba confirmatoria para la tuberculosis bovina con resultado negativo de acuerdo con las reglamentaciones y directrices del USDA.

La normativa internacional para la exportación de semen bovino varía entre los países y no todas las pruebas de tuberculosis bovina aprobadas por el USDA son aceptadas para exportación.

2. Brucelosis bovina: Una prueba de antígeno brucelar tamponado (prueba de tarjeta o BAPA) **O** una prueba de fijación del complemento (CF) **O** una prueba de polarización fluorescente (FPA) en suero con resultado negativo. Esta prueba se deberá realizar tras un mínimo de 30 días después de la fecha de la prueba de preingreso para la brucelosis y al menos 21 días después del ingreso a la instalación de aislamiento.

En caso de que el animal tenga un resultado que no sea negativo, se recomienda realizar otra prueba oficial de brucelosis del USDA. Un resultado negativo en la nueva prueba o en otras pruebas oficiales de brucelosis puede permitir que el toro reciba una clasificación negativa de brucelosis; sin embargo, la clasificación final sigue siendo prerrogativa de los funcionarios veterinarios federales o estatales.

3. Leptospirosis bovina: Una prueba de aglutinación microscópica (MAT) en suero para los serotipos *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippityphosa* con resultado negativo. Esta prueba deberá realizarse al menos treinta (30) días después de la fecha de la prueba de leptospirosis de preingreso y como mínimo 21 días tras la entrada del animal a la instalación de aislamiento.

Se prefiere un resultado negativo para cada serotipo. Sin embargo, si el resultado no es negativo (es decir, positivo a 1:100 o 1:200) para cualquier serotipo, el bovino debe someterse a una nueva prueba para ese serotipo al menos 14 días después de la prueba anterior. Animales **negativos a 1:400** en dos pruebas consecutivas se consideran negativos con un título bajo y estable

4. Campilobacteriosis bovina y tricomoniasis venérea bovina:

- a. Examen microscópico de material prepucial cultivado **O** prueba PCR de material prepucial recogido del fórnix del prepucio para *Tritrichomonas foetus*, con resultado negativo.
- b. Examen de material prepucial cultivado **O** prueba PCR de material prepucial recogido del fórnix del prepucio para *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, con resultado negativo.

Los toros y los animales de monta se someterán al siguiente programa de pruebas cuya cantidad variará en función de la edad del animal el día de ingreso en la instalación de aislamiento del CSS. Las pruebas para ambos patógenos se realizarán al menos a intervalos semanales hasta completar el número mínimo de repeticiones requeridas; cada una con un resultado negativo durante el aislamiento:

Edad de ingreso al aislamiento	Cantidad mínima de pruebas
Menos de 180 días con certificación* (véase abajo)	1
Menos de 180 días sin certificación (véase abajo)	3
De 180 a 364 días	3
365 días o más	6

*El Médico Veterinario del centro de IA puede certificar que el toro no ha cohabitado con hembras después de cumplir treinta días de edad.

Nota: las regulaciones internacionales para la exportación de semen bovino varían entre los países y no todos los procedimientos de pruebas de CSS para la Campilobacteriosis Bovina y la Tricomoniasis Venérea Bovina son aceptados para la exportación.

5. Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB): Todos los toros y animales de monta que ingresen a centros de IA aprobados por CSS deben ser sometidos a pruebas de viremia y de infección persistente por VDVB durante el periodo de aislamiento, con resultados negativos antes de ingresar al hato residente del centro de IA. Las pruebas deben realizarse tras un mínimo de 21 días desde el ingreso a la instalación de aislamiento. Además, todos los toros deberán ser evaluados mediante un programa de pruebas para detectar infecciones testiculares persistentes.
 - a. Prueba de diagnóstico: El animal debe ser sometido a una prueba de PCR en sangre completa **O** a una prueba de aislamiento viral en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasajes en cultivo celular bovino con resultado negativo demostrado por la prueba de PCR del cultivo celular o

- mediante tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).
- b. Especímenes de diagnóstico: prueba de PCR o prueba de aislamiento viral en sangre completa.
 - c. Confirmación de infección persistente de VDVB: Si se demuestra la presencia de VDVB mediante PCR **O** aislamiento viral (seguido de PCR, FA o IP en cultivo celular) en sangre completa, el animal deberá permanecer aislado de otros bovinos. Se le volverá a examinar tras un mínimo de 21 días a través de PCR en sangre completa **O** con prueba de aislamiento viral en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasajes realizados en cultivo celular bovino con un resultado negativo demostrado por la prueba de PCR del cultivo celular o por tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP). La detección del VDVB por segunda vez se considerará indicativa de infección persistente. En tal caso el animal no es elegible para ingresar al ható residente del centro de IA aprobado por el CSS y debe ser retirado de inmediato del centro de aislamiento.
 - d. Confirmación de ausencia de infección persistente: Los animales en los que se haya aislado o demostrado la presencia del VDVB deben permanecer aislados y separados de otros bovinos, hasta que se demuestre que están libres del virus. Esto se demostrará mediante 2 pruebas negativas consecutivas realizadas con un intervalo mínimo de 14 días, utilizando pruebas de PCR en sangre completa **O** pruebas de aislamiento viral en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasajes realizados en cultivo celular bovino con un resultado negativo, demostrado mediante la prueba de PCR del cultivo celular o mediante la tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).

En toros en los que se haya aislado el VDVB, pero que posteriormente se demuestren libres de infección persistente, se deben tomar muestras de todo el semen colectado y procesado dentro de los 30 días anteriores y los 30 días posteriores a la fecha de la prueba positiva de PCR o del aislamiento viral en sangre completa. Se realizará una prueba de PCR de cada código de colecta. Solo los códigos de colecta con resultado negativo podrán ser liberados para distribución. Cualquier código de colecta con un resultado positivo debe ser destruido y no podrá ser distribuido.

- e. Si se detecta VDVB en un animal después de aislarlo de otros bovinos, el resto del ganado en la instalación de aislamiento requerirá una nueva prueba tras un mínimo de 14 días después de la separación del animal positivo. Esta prueba podrá ser PCR en sangre completa **O** una prueba de aislamiento viral en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasajes realizados en cultivo celular bovino con un resultado negativo demostrado mediante la prueba de PCR del cultivo celular o mediante la tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).

La siguiente prueba se deberá realizar a todos los toros antes de que el semen sea liberado para su distribución. Si los toros no están en edad de producción de semen durante el período de aislamiento de CSS, la prueba puede realizarse después de que se complete dicho período de aislamiento.

Virus de la diarrea viral bovina (VDVB): Se utiliza uno de los siguientes métodos y calendarios de pruebas para detectar la infección testicular persistente por el VDVB:

- a. Se deberá realizar una prueba de neutralización sérica (SN) **O** la prueba ELISA de anticuerpos para los tipos I y II en suero de los toros durante el período de aislamiento. Todos los toros con un resultado positivo deben tener una prueba de PCR negativa en una muestra de semen completamente diluido y congelado. Las muestras de semen congelado deben transportarse al laboratorio de diagnóstico a temperaturas criogénicas [es decir, nitrógeno líquido o tanque de vapor de nitrógeno líquido].

- b. Los toros deben tener una (1) prueba PCR negativa en una muestra de semen completamente diluido y congelado. Las muestras de semen congelado deben transportarse al laboratorio de diagnóstico a temperaturas criogénicas [es decir, nitrógeno líquido o tanque de vapor de nitrógeno líquido].

[Los toros con una prueba de PCR positiva en el semen deben someterse a pruebas adicionales de semen procesado para confirmar una infección testicular persistente].

Cualquier toro con una infección testicular persistente por el VDVB no reúne los requisitos para la colecta de semen y no se le permite permanecer en la instalación de aislamiento o con el hato residente.

Cualquier toro que tenga una prueba de PCR de aislamiento viral positiva en sangre completa durante el periodo de aislamiento y que demuestre que NO está infectado de forma persistente, deberá contar con resultados negativos de PCR en muestras de semen congelado completamente diluido. Dichas muestras deberán corresponder a tres (3) colectas distintas, realizadas con intervalos no inferiores a siete (7) días. La recolección de estas muestras deberá iniciarse al menos 21 días después de la última prueba de PCR o aislamiento viral positivo en sangre completa.

La normativa de exportación de semen bovino varía entre países de destino y no todos los procedimientos de prueba de CSS para el VDVB son aceptados en los requisitos de exportación para ciertos mercados.

Todos los toros o animales de monta en la instalación de aislamiento se mantendrán en aislamiento continuo de todas las demás especies de ganado y otros animales bovinos que no tengan un estatus sanitario equivalente. Si se permite que un toro o animal de monta del centro de aislamiento entre en contacto con animales bovinos que no tengan un estatus sanitario equivalente, este será retirado inmediatamente del centro de aislamiento y no se le permitirá volver a entrar hasta que haya completado otro ciclo de preingreso y las pruebas prescritas anteriormente.

HATO RESIDENTE

Una vez que un toro o un animal de monta haya completado de manera satisfactoria las pruebas de aislamiento detalladas anteriormente, este puede ingresar al hato residente donde deberá seguir sometiéndose a pruebas de acuerdo con el protocolo de monitoreo sanitario que se detalla a continuación.

Las siguientes pruebas deberán realizarse en todos los toros o animales de monta a intervalos de seis (6) meses:

1. Tuberculosis bovina: prueba oficial intradérmica del pliegue caudal (PPC); el resultado debe ser negativo.

En caso de que el animal obtenga un resultado no negativo a la prueba de PPC, se realizará una prueba confirmatoria para la tuberculosis bovina con resultado negativo de acuerdo con las reglamentaciones y directrices del USDA.

Nota: La normativa internacional para la exportación de semen bovino varía entre los países y no todas las pruebas de tuberculosis bovina aprobadas por el USDA son aceptadas para exportación.

2. Brucelosis bovina: Una prueba de antígeno brucelar tamponado (prueba de tarjeta o BAPA) **O** una prueba de fijación del complemento (CF) **O** una prueba de polarización fluorescente (FPA) en suero con resultado negativo.

En caso de que el animal tenga un resultado que no sea negativo, se recomienda realizar otra prueba oficial de brucelosis del USDA. Un resultado negativo en la nueva prueba o en otras pruebas oficiales de brucelosis puede permitir que el toro reciba una clasificación negativa de brucelosis; sin embargo, la clasificación final sigue siendo prerrogativa de los funcionarios veterinarios federales o estatales.

3. Leptospirosis bovina: Una prueba de aglutinación microscópica (MAT) en suero para los serotipos *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippityphosa* con resultado negativo. Se prefiere un resultado negativo para cada serotipo. Sin embargo, si el resultado no es negativo (es decir, positivo a 1:100 o 1:200) para cualquier serotipo, el bovino deberá someterse a una nueva prueba para ese serotipo al menos 14 días después de la prueba anterior. Animales **negativos a 1:400** en dos pruebas consecutivas, se consideran negativos con un título bajo y estable.
4. Campilobacteriosis bovina y Tricomoniasis Venérea Bovina:
 - a. Examen microscópico de material prepucial cultivado **O** prueba PCR de material prepucial recogido del fórnix del prepucio para *Tritrichomonas foetus*, con resultado negativo.
 - b. Examen de material prepucial cultivado **O** prueba PCR de material prepucial recogido del fórnix del prepucio para *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, con resultado negativo.

Todos los toros o animales de monta del hato residente deberán mantenerse en aislamiento continuo respecto a otras especies de ganado y a cualquier bovino que no tenga un estatus sanitario equivalente. Si un integrante del hato residente entra en contacto con cualquier animal bovino que no tenga un estatus equivalente, deberá ser retirado inmediatamente del hato residente y no se le permitirá volver a ingresar hasta que haya completado otro ciclo de preingreso y aislamiento con las pruebas prescritas para ello, salvo lo dispuesto en el párrafo siguiente.

No se requiere que a un toro retirado temporalmente de la producción de semen se le realicen las pruebas de detección de Tricomoniasis bovina y Campilobacteriosis bovina, siempre y cuando esté en un lugar separado eficazmente del hato residente. Sin embargo, se lo deberá mantener en un hato que cumpla con todas las condiciones de un hato residente. El régimen de pruebas de rutina tal como se define para el hato residente deberá reanudarse antes de que se colecte el semen que se procese después del regreso del toro a producción.

ANTIBIÓTICOS Y PROCESAMIENTO DE SEMEN

1. Se deberán agregar antibióticos al semen sin diluir y al diluyente, para proporcionar un control microbiológico eficaz de:
 - Micoplasmas
 - Ureaplasmas
 - Histophilus somni* (antes *Haemophilus somnus*)
 - Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*
2. El control microbiológico eficaz es la condición en la cual el número de microorganismos patogénicos específicos potencialmente presentes se reduce por debajo del umbral de la patogenicidad o se elimina completamente.
3. Un protocolo aceptable consiste en la exposición in vitro de semen y diluyente con los antibióticos gentamicina, tilosina, lincomicina y espectinomina (GTLS), tal como se describe en Shin, et al¹ Lorton, et al² y Lorton, et al³. La información sobre los procesos a seguir se detalla en el Apéndice 1.
4. Los protocolos alternativos aceptables deben proporcionar un control microbiológico eficaz (de los organismos mencionados en el punto 1) sobre una base de pruebas científicas, presentadas a Certified Semen Services, Inc. Un ejemplo de protocolo alternativo aprobado es el procedimiento de 1 paso descrito por Shin y Kim⁴. Los detalles del procedimiento se encuentran en el Apéndice 1.

REFERENCIAS

1. Shin SJ, Lein DH, Patten VH y Ruhnke HL. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Haemophilus somnus*. Teriogenología. 1988; 29:577-591.
2. Lorton SP, Sullivan JJ, Bean B, Kaproth M, Kellgren H, y Marshall C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 2. Evaluation of seminal quality. Theriogenology;1988; 29:593-607.
3. Lorton SP, Sullivan JJ, Bean B, Kaproth M, Kellgren H, y Marshall C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 3. Evaluation of fertility. Teriogenología. 1988; 29:609-614.
4. Shin SJ, Kim SG. Comparative efficacy study of bovine semen extension: 1-step vs 2-step procedure. 18a Conferencia técnica sobre Inseminación artificial y reproducción. Asociación Nacional de Criadores de Animales, Columbia, MO, 29-30 de septiembre de 2000, Actas, p. 60-62.

* * * *

CERTIFIED SEMEN SERVICES

8413 Excelsior Drive, Suite 140

Madison, WI 53717

Teléfono: +1 608 827 0277

Fax: +1 608 827 1535

Página web: www.naab-css.org

APÉNDICE 1

PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS Y DILUYENTES DE GTLS

ANTIBIÓTICOS

1. Tratamiento del Semen Puro

- a. Cada ml de semen puro se tratará con 0.02 ml de la combinación de antibióticos (GTLS) que contiene los siguientes ingredientes activos.¹
 - gentamicina 500 µg
 - tilosina 100 µg
 - lincomicina 300 µg
 - espectinomicina 600 µg
- b. La adición de estos antibióticos deberá realizarse de manera que permita un periodo *mínimo* de tres a cinco minutos de contacto con el semen puro, antes de agregar cualquier diluyente.¹
- c. Estos procedimientos son obligatorios independientemente del tipo de diluyente utilizado.^{1,4}

2. Antibióticos en polvo premezclados

- a. Los antibióticos GTLS premezclados en polvo están formulados para proporcionar las siguientes concentraciones de antibióticos *activos* por 0.02 ml de solución final:
 - gentamicina 500 µg
 - tilosina 100 µg
 - lincomicina 300 µg
 - espectinomicina 600 µg
- b. Los antibióticos GTLS premezclados en polvo deben almacenarse según las especificaciones del fabricante hasta su reconstitución.
- c. La reconstitución de los antibióticos debe completarse utilizando agua purificada (doblemente destilada estéril, desionizada o procesada por ósmosis inversa) y mezclada según las instrucciones del fabricante.
- d. Los antibióticos premezclados en polvo y reconstituidos:
 - - deben utilizarse el mismo día de reconstitución y no guardarse para el día siguiente.
 - O-
 - - pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -20°C, o una temperatura inferior, durante un máximo de 7 días. Las alícuotas deben descongelarse a temperatura ambiente, utilizarse exclusivamente el día de la descongelación y no volver a congelarse.⁵
- e. El diluyente con antibióticos deberá utilizarse el mismo día en que se realice la incorporación de los mismos, cualquier excedente deberá desecharse.

3. Requisitos generales de los antibióticos GTLS

- a. Los antibióticos específicos requeridos deben ser de grado USP, EP o equivalente:
 - - sulfato de gentamicina en polvo número de CAS 1405-41-0 ($\geq 590 \mu\text{g}/\text{mg}$)⁶
 - - tartrato de tilosina en polvo número de CAS 74610-55-2 ($\geq 900 \mu\text{g}/\text{mg}$)⁶
 - - clorhidrato de lincomicina en polvo número de CAS 859-18-7 ($\geq 790 \mu\text{g}/\text{mg}$)⁶
 - - sulfato de espectinomicina en polvo tetrahidratado número de CAS 64058-48-6 ($650\text{-}850 \mu\text{g}/\text{mg}$)⁶
- O-
- clorhidrato de espectinomicina en polvo número de CAS 22189-32 ($\geq 603 \mu\text{g}/\text{mg}$)⁶
- b. Cada lote de antibióticos debe tener disponible un Certificado de Análisis detallado con la siguiente información:
 - Número de lote
 - Fecha de caducidad/fecha de fabricación
 - Prueba de potencia o ingrediente activo o actividad o mg/ml o $\mu\text{g}/\text{mg}$
 - Pureza o % de ingredientes inertes o impurezas
 - Composición o % de componentes con gentamicina y tilosina
- c. Todas las concentraciones de antibióticos que aquí se indican son para unidades **activas** de antibióticos. Los valores de potencia variarán entre lotes. Sin embargo, al cumplir el mínimo requerido de $\mu\text{g}/\text{mg}$ para cada antibiótico en la sección 3.a., los antibióticos pueden dosificarse según su peso real, sin necesidad de ajustar el peso en función de la potencia.
- d. Los Certificados de Análisis para cada tipo de antibiótico y lote deberán estar disponibles cuando se soliciten.
- e. Los antibióticos fabricados para uso industrial o formulados para uso interno deben cumplir estos criterios.
- f. **Nota:** Los antibióticos provenientes de ciertas fuentes pueden contener materiales deletéreos que podrían afectar la eficacia del antibiótico o la calidad del semen. Solicitar un Certificado de Análisis detallado, como se describe en la Sección 3.b., asegura un nivel mínimo de verificación, incluyendo los valores de potencia e identifica los ingredientes inertes que podrían ser problemáticos. Para orientación adicional, póngase en contacto con Certified Semen Services.

DILUYENTES

4. Diluyente de 2 pasos

- a. Tratamiento de semen puro: Se añadirán de 0.02 ml de GTLS por cada ml de semen puro, con un tiempo de contacto **mínimo** de 3 minutos. Ver sección 1.
- b. La fracción sin glicerol se preparará de manera que contenga las siguientes concentraciones de antibióticos activos antes de añadirla al semen:¹
 - gentamicina 500 μg por ml
 - tilosina 100 μg por ml
 - lincomicina 300 μg por ml
 - espectinomicina 600 μg por ml
- c. El diluyente sin glicerol se añadirá al semen puro antes del enfriamiento. Todo el semen deberá permanecer en contacto con el diluyente sin glicerol durante un **mínimo** de dos horas mientras se enfría a 5°C. Una vez transcurrido este periodo se puede agregar el diluyente con glicerol.¹
- d. La fracción glicérica del diluyente no podrá contener más del 10% de la concentración de antibióticos indicada en la sección 4.b. para la fracción no glicérica del diluyente. Dicha cantidad no se tomara en cuenta para el cálculo de la concentración final de antibióticos establecida en la sección 4.b.

- e. La fracción glicerólica del diluyente deberá añadirse a la mezcla de semen y la fracción no glicerólica en una proporción de 1 a 1 (volumen de la fracción con glicerol = Volumen de la fracción sin glicerol + Volumen de semen).
- f. Los procedimientos anteriores deben producir la siguiente concentración activa final de GTLS /ml de semen congelado.¹
 - gentamicina 250 µg por ml
 - tilosina 50 µg por ml
 - lincomicina 150 µg por ml
 - espectinomicina 300 µg por ml
- g. El diluyente con antibióticos deberá utilizarse el mismo día en que se realice la incorporación de los mismos, cualquier excedente deberá desecharse.

5. Diluyente de 1 paso

- a. Tratamiento de semen puro: Se añadirán de 0.02 ml de GTLS por cada ml de semen puro, con un tiempo de contacto **mínimo** de 3 minutos. Ver sección 1.
- b. El diluyente de 1 paso se preparará para que contenga las siguientes concentraciones de antibióticos activos antes de añadirlo al semen:⁴
 - gentamicina 500 µg por ml
 - tilosina 100 µg por ml
 - lincomicina 300 µg por ml
 - espectinomicina 600 µg por ml
- c. Los procedimientos anteriores para el diluyente de un solo paso resultaran en la siguiente concentración final de GTLS por ml de semen congelado.⁴
 - gentamicina 500 µg por ml
 - tilosina 100 µg por ml
 - lincomicina 300 µg por ml
 - espectinomicina 600 µg por ml

Nota: La concentración final de antibióticos deberá ser el doble que la del protocolo de diluyente de 2 pasos.

- d. Todo el semen deberá mantenerse en contacto con el diluyente de un solo paso durante un **mínimo** de dos horas, mientras se enfría a 5°C.
- e. El diluyente con antibióticos deberá utilizarse el mismo día en que se realice la incorporación de los mismos, cualquier excedente deberá desecharse.

PROCEDIMIENTOS Y DESVIACIONES

6. Procedimientos de Procesamiento Requeridos

- a. El diluyente deberá ser aprobado por CSS. Véase el Apéndice 1A
- b. Se deberá seguir el tratamiento con antibióticos para el semen puro y los diluyentes de acuerdo con lo indicado las Secciones 1., 4. y 5. de este Apéndice 1.
- c. El tiempo de contacto del antibiótico GTLS con el semen puro deberá ser de al menos tres minutos.
- d. El semen en la fracción del diluyente sin glicerol deberá enfriarse hasta alcanzar los 5°C y mantenerse en dicha fracción durante un mínimo de dos horas antes de agregar la fracción con glicerol.
- e. El semen en el diluyente de un solo paso deberá enfriarse durante un mínimo de dos horas a 5°C antes de proceder con los pasos adicionales de procesamiento.
- f. Otros procedimientos descritos en las secciones 1 a 5 de este Apéndice 1.

7. Desviación de los Procedimientos de Procesamiento Requeridos

Se ha demostrado que la composición del diluyente y los procedimientos de procesamiento pueden afectar la eficacia del control microbiano del GTLS.¹ Por lo tanto, cualquier desviación de los procedimientos establecidos en este Apéndice 1 requerirá una evaluación por parte de CSS, y de ser necesario, una prueba de eficacia de los antibióticos.

- a. Se deberá presentar una solicitud de excepción dirigida al/los Director(es) de Servicio de CSS.
- b. Cuando se presente una composición nueva de diluyente para su evaluación y posible prueba de eficacia, los componentes y las proporciones deben compartirse con CSS. Esta información será tratada con estricta confidencialidad.
- c. El/los Director(es) de Servicio de CSS determinará(n) si la desviación requerirá pruebas de eficacia antibiótica.
- d. Las pruebas de eficacia correspondientes podrán realizarse en un laboratorio aprobado por CSS que haya demostrado competencia técnica para realizar estos análisis.
- e. El laboratorio deberá remitir los resultados de esta prueba al Director de Servicio de CSS y a la organización solicitante.
- f. Si los resultados demuestran una eficacia igual o superior a la obtenida por Shin¹, CSS otorgará la autorización para utilizar el procedimiento.
- g. Todos los honorarios y gastos relacionados con la evaluación de la desviación y/o las pruebas de eficacia serán cubiertos por la organización solicitante y facturados a través de CSS.

REFERENCIAS:

1. Shin SJ, Lein DH, Patten VH y Ruhnke HL. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*. 1988; 29:577-591.
2. Lorton SP, Sullivan JJ, Bean B, Kaproth M, Kellgren H, y Marshall C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 2. Evaluation of seminal quality. *Theriogenology*;1988; 29:593-607.
3. Lorton SP, Sullivan JJ, Bean B, Kaproth M, Kellgren H, y Marshall C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 3. Evaluation of fertility. *Theriogenology*. 1988; 29:609-614.
4. Shin SJ, Kim SG. Comparative efficacy study of bovine semen extension: 1-step vs 2-step procedure. 18th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. National Association of Animal Breeders, Columbia, MO, 29-30, 2000, Proceedings, p. 60-62.
5. Althouse GA. Centro New Bolton de la Universidad de Pensilvania. A study of GTLS antibiotic stability at various temperatures and times. March 2021. NAAB/CSS sponsored research project.
6. Monografías de referencia de U.S. Pharmacopeia por número de CAS.

APÉNDICE 1A

DILUYENTES APROBADOS POR CSS

1. Los siguientes diluyentes están disponibles comercialmente y han sido aprobados por CSS:

Diluyente	Fabricante	Tipo	Número de Referencia	Presentación
AndroMed® CSS	Minitube	2-Pasos	13503/1250+1251	0.5+0.5 L
AndroMed® CSS	Minitube	1-Paso	13503/1200	1 L
Biladyl®	Minitube	2-Pasos	13500/0004+0006	0.5+0.5 L
BioXcell CSS	IMV Technologies	2-Pasos	018617	0.5+0.5 L
BoviFree CSS	Minitube	2-Pasos	13501/1250+1251	0.5+0.5 L
BoviFree CSS	Minitube	1-Paso	13501/1200	1 L
BOVINE-EXT™	Reproduction Provisions, LLC	2-Pasos	107501+107502; 107503+107504	0.5+0.5 L or 1+1 L
BOVINE-EXT™	Reproduction Provisions, LLC	1-Paso	107400	1 L
GameteGuard®-FB	Membrane Protective Technologies, Inc.	2-Pasos	N/A	0.5, 1, or 2 L
GameteGuard®-FB	Membrane Protective Technologies, Inc.	1-Paso	N/A	0.25, 0.5, or 1 L
ONE-STEP™	Continental Plastic Corporation	1-Paso	B2-7400	1 L
OptiXcell CSS	IMV Technologies	1-Paso	025239	0.75 L
Optidyl CSS	IMV Technologies	1-Paso	024759	1.25 L
SpermVital™	SpermVital AS	2-Pasos	N/A, E1+(E2+Agente Gelificante)	Varía por Componente
Steridyl CSS	Minitube	2-Pasos	13500/0290+0295	1+1 L
Steridyl CSS	Minitube	1-Paso	13500/0280	1 L
Triladyl® CSS	Minitube	1-Paso	13500/1200	1 L
TWO-STEP™	Continental Plastic Corporation	2-Pasos	B2-7500	0.5+0.5 L

Nota: Versiones No-CSS de estos productos conteniendo GTLS u otros antibióticos ya integrados pueden estar disponibles en el mercado. Sin embargo, estos no pueden ser utilizados para cumplir con los Requisitos Mínimos de CSS. Existen cocteles de antibióticos aprobados por CSS disponibles comercialmente. Una vez reconstituidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se requerirá 1 mL de solución de GTLS por cada 50 mL de la fracción sin glicerol en diluyentes de dos pasos o por cada 50 mL de diluyente de un paso. Contactar CSS para cualquier pregunta.

2. Se ha probado la eficacia de los antibióticos para el control de los organismos microbianos en los siguientes cinco diluyentes.^{1,4} El uso de la combinación actual de antibióticos GTLS en los diluyentes 1, 2 y 3 no afectó negativamente la motilidad post-descongelación.² Además, los diluyentes 1 y 3 fueron evaluados en cuanto a su fertilidad.³ Los diluyentes 4 y 5 no fueron evaluados respecto a la calidad seminal o fertilidad. La composición final de cada diluyente es la siguiente:

Diluyente	Composición del diluyente	Aprobado para
1. 20% yema de huevo citrato	20% yema de huevo 2.12 g % citrato de sodio dihidrato 0.183 gm % monohidrato de ácido cítrico 7.0% glicerol	2-pasos ¹
2. 20% yema de huevo - tris	20% yema de huevo 2.42 gm % tris (hidroximetil aminometano) 1.38 gm % monohidrato de ácido cítrico 1.00 gm % fructosa 7.0% glicerol	1-Paso ⁴ 2-Pasos ¹
3. Leche entera calentada	7.0% glicerol	2-paso ¹
4. Plus-X	Plus-X, tal como lo provee el distribuidor. 7.0% glicerol	2-pasos ¹
5. 28% yema de huevo - tris	28% yema de huevo 1.92 gm % tris (hidroximetil aminometano) 1.10 gm % monohidrato de ácido cítrico 1.00 gm % glucosa 7.0% glicerol	2-pasos ¹

3. Para determinar si un diluyente no citado aquí está aprobado, comuníquese CSS.
4. Además de los diluyentes enumerados aquí, existen otros diluyentes que han sido aprobados por CSS a través de los procedimientos descritos en el Apéndice 1 Sección 7. Estos corresponden a diluyentes de propiedad exclusiva utilizados por organizaciones individuales, cuya información se mantiene bajo estricta confidencialidad con CSS.

APÉNDICE 2

PROTOCOLO BÁSICO DE PRUEBAS DEL CENTRO DE IA

El programa básico de pruebas sanitarias se describe en los "Requisitos mínimos de CSS para el control de enfermedades en el semen producido para la Inseminación Artificial". La industria de IA ha desarrollado estos requisitos a través de los años para ayudar a garantizar que el semen utilizado en IA no sea un vehículo transmisor de agentes de enfermedades de importancia.

A continuación, se presenta un resumen del programa de pruebas de CSS (Vigente al 1 de enero de 2026):

ENTORNOS DE PRUEBAS			
	Preingreso al aislamiento	Aislamiento	Hato residente
	(Durante los 30 días previos al ingreso a un centro de aislamiento de CSS)	(Pruebas previas al ingreso a un hato residente y distribución de semen)	(Centro de colección de semen)
Examen Físico	Realizado por un veterinario de categoría II acreditado por el USDA		
Tuberculosis Bovina	Prueba intradérmica del pliegue caudal negativa o prueba de confirmación oficial (En un plazo de 60 días antes del Ingreso al Aislamiento)	Prueba intradérmica del pliegue caudal negativa o prueba de confirmación oficial al menos 60 días después de la prueba de preingreso y 21 días tras el ingreso al centro de aislamiento de CSS	Prueba intradérmica negativa del pliegue caudal o prueba de confirmación oficial a intervalos de 6 meses
Brucelosis Bovina	Prueba oficial negativa del estado donde se encuentra el toro (si es necesaria para el movimiento). CF negativo o prueba de tarjeta o BAPA o FPA en suero para ingreso en el centro de aislamiento de CSS	Prueba CF o prueba de tarjeta o BAPA o FPA negativa en suero al menos 30 días después de la prueba de preingreso y 21 días tras el ingreso al centro de aislamiento de CSS	Prueba CF o prueba de tarjeta o BAPA o FPA en suero a intervalos de 6 meses.
Virus de la Diarrea viral Bovina	Prueba PCR o ELISA de captura de antígenos o aislamiento viral negativa realizada en sangre completa o suero.	Prueba PCR o aislamiento viral negativa (mínimo 2 pasajes) realizadas en sangre completa al menos 21 días después del ingreso al centro de aislamiento de CSS Y Prueba PCR negativa de semen procesado congelado antes de ser liberado para su uso o prueba ELISA de anticuerpos negativa o prueba SN para VDVB tipos I y II en suero	

Leptospirosis	Prueba MAT negativa o con título bajo y estable en suero para los 5 serotipos importantes en los EE.UU. ¹	Prueba MAT negativa o con título bajo y estable en suero para 5 serotipos importantes en los EE.UU. ¹ , realizada al menos 30 días después de la prueba de preingreso y 21 días después de ingresar al aislamiento.	Prueba MAT negativa o con título bajo y estable en suero para los 5 serotipos importantes en los EE.UU a intervalos de 6 meses. ¹
Campilobacteriosis		Serie de pruebas negativas de PCR o cultivo de material prepucial realizadas a intervalos mínimos de una semana: <ul style="list-style-type: none"> • Toros menores de 180 días de edad² con certificación:³ Una (1) prueba negativa. • Toros menores de 365 días de edad²: Tres (3) pruebas negativas. • Toros de 365 o más días de edad²: Seis (6) pruebas negativas. 	Prueba negativa de PCR o cultivo de material prepucial, realizada a intervalos de 6 meses.
Tricomonirosis		Serie de pruebas negativas de PCR o cultivo de material prepucial realizadas a intervalos mínimos de una semana: <ul style="list-style-type: none"> • Toros menores de 180 días de edad² con certificación:³ Una (1) prueba negativa. • Toros menores de 365 días de edad²: Tres (3) pruebas negativas. • Toros de 365 o más días de edad²: Seis (6) pruebas negativas. 	Prueba negativa de PCR o cultivo de material prepucial, realizada a intervalos de 6 meses.

¹ (*L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*)

² Edad en el día de ingreso en el centro de aislamiento de CSS.

³ Siempre y cuando el médico veterinario del centro de IA pueda certificar que el toro no ha cohabitado con hembras después de cumplir 30 días de edad.

APÉNDICE 3

EJEMPLO: LISTA DE VERIFICACIÓN DE LA PRUEBA DE AISLAMIENTO DE CSS

A continuación, se presenta el EJEMPLO de una lista de verificación y un cronograma de pruebas sanitarias que deben completarse durante período de aislamiento de CSS:

PREINGRESO AL AISLAMIENTO:

- Los toros destinados a ingresar en un Centro de IA aprobado por CSS deberán estar:
 1. Sanos
 2. Libres de enfermedades infectocontagiosas
 3. No estar en cuarentena

Y

 4. No deberán ser utilizados para servicio natural una vez realizados el examen físico y la toma de muestras de preingreso.
 5. Deben permanecer aislados de otros animales una vez realizados el examen físico y la toma de muestras de preingreso.

- Las pruebas deberán realizarse y los resultados deberán estar disponible antes de que el toro pueda ingresar a las instalaciones de aislamiento de CSS
 1. Durante los 60 días previos al ingreso al aislamiento:
 - Tuberculosis bovina** - Prueba intradérmica del pliegue caudal negativa **o** prueba oficial de confirmación.
 2. Durante los 30 días previos al ingreso al aislamiento:
 - Examen físico** - Realizado por un veterinario acreditado por el USDA de categoría II o equivalente
 - Brucelosis bovina** - BAPA **o** tarjeta **o** CF **o** FPA negativo en **suero**
(Tener en cuenta y cumplir con la normativa de transporte interestatal)
 - Leptospirosis bovina** - Prueba MAT negativa **o** título bajo y estable en **suero**
5 serovares (*L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*)
 - PCR o ELISA** de captura de antígeno **o** aislamiento viral negativo en **sangre completa o suero**.

PRUEBAS DE AISLAMIENTO

- El muestreo no puede comenzar hasta que se conozcan los resultados de las pruebas de preingreso y después de que el toro haya ingresado en el centro de aislamiento de CSS.

*Nota - Pruebas de Tricomoniasis y Campilobacteriosis completadas al menos a intervalos semanales.

1. Semana 1 (Día 0):
 - Tricomoniasis** - Cultivo **o** PCR del material prepucial negativo ¹
 - Campilobacteriosis** - Cultivo **o** PCR del material prepucial negativo ¹
2. Semana 2 (Día 7):
 - Tricomoniasis** - Cultivo **o** PCR del material prepucial negativo ^{1,2,3}
 - Campilobacteriosis** - Cultivo **o** PCR del material prepucial negativo ^{1,2,3}
3. Semana 3 (Día 14):
 - Tricomoniasis** - Cultivo **o** PCR del material prepucial negativo ^{1,2}
 - Campilobacteriosis** - Cultivo **o** PCR del material prepucial negativo ^{1,2}

4. Semana 4 (Día 21):
 - Tricomonirosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo^{1,2}
 - Campilobacteriosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo^{1,2}
5. Semana 5 (Día 28):
 - Tricomonirosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
 - Campilobacteriosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
6. Semana 6 (Día 35):
 - Tricomonirosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
 - Campilobacteriosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
 - Brucelosis bovina** - BAPA o tarjeta o CF o FPA negativo en **suero**^{4,5}
 - Leptospirosis bovina** - MAT negativo o título bajo y estable en **suero**^{4,5}
5 serovares (*L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*)
 - VDVB** - PCR o aislamiento viral negativo (2 pasadas) en **sangre completa**^{4,5}
 - VDVB** - SN o ELISA de anticuerpos negativos (tipos I y II) en suero o PCR negativo en semen congelado procesado⁶
7. Semana 9 (Día 63):
 - Tuberculosis bovina** - Prueba intradérmica del pliegue caudal negativa o prueba oficial de confirmación^{4,7}

¹ Si el toro tiene 365 días de edad o más el día de ingreso al aislamiento en CSS

² Si el toro tiene menos de 365 días de edad el día de entrada en el aislamiento en CSS

³ Si el toro tiene menos de 180 días de edad el día de ingreso en el aislamiento en CSS con certificación veterinaria de alojamiento con animales de su mismo sexo desde los 30 días de edad

⁴ Realizada al menos 21 días después de ingresar en aislamiento en CSS

⁵ Realizada al menos 30 días después de la prueba de preingreso

⁶ Realizada en cualquier momento durante el período de aislamiento o más tarde si el toro no está en edad de producir semen, pero antes de la distribución de su semen.

⁷ Realizada al menos 60 días después de la prueba de preingreso