



1 de julio de 2021

V. 4 12/13/2021

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

Los “Requisitos mínimos exigidos por los Servicios de Semen Certificados (CSS) para el control de enfermedades en semen producido para la inseminación artificial” constituyen un estándar mínimo para la supervisión de la salud 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. El presente es un estándar integral para las enfermedades que presentan un riesgo importante de ser transmitidas por el semen durante la inseminación artificial. Además, describe los procedimientos sanitarios correctos e incluye los requisitos para la adición de antibióticos que correspondan tanto al semen como al diluyente para proporcionar un control de contaminación microbiana patogénica específica. El objetivo de estos requisitos es proteger la salud de los sementales donantes y del hato en el que se utiliza el semen.

CONDICIONES SANITARIAS GENERALES

1. El equipo de colecta de semen que entre en contacto el toro o con sus secreciones o excreciones deberá desinfectarse a fondo después de cada uso.
2. El colector deberá utilizar guantes de plástico desechables nuevos en cada toro para asegurarse de que las manos no sirvan como medio de transmisión de algún 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 realizarse la manipulación y el almacenamiento del semen de forma higiénica.
4. Las pruebas sanitarias de laboratorio se realizarán en un laboratorio (o laboratorios) de diagnóstico veterinario acreditado por la AAVDL (Asociación Americana de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico) y aprobado por el USDA (Departamento de Agricultura de los EE.UU.) para realizar las pruebas sanitarias solicitadas con fines de exportación. En el caso de los centros de IA ubicados fuera de EE.UU., las pruebas sanitarias deberán realizarse en un laboratorio (o laboratorios) de diagnóstico veterinario que esté aprobado por la autoridad veterinaria competente de ese país para realizar las pruebas sanitarias solicitadas con fines de exportación.
5. Se prestará atención a los contenedores de transporte criogénico que regresen de países extranjeros que el USDA no haya declarado libres de fiebre aftosa, para determinar si fueron desinfectados en el puerto de entrada. Si se los desinfectó correctamente, habrá una etiqueta adjunta que lo indique. Si no se realizó la desinfección, se notificará al veterinario del USDA/APHIS (Servicio de Inspección Sanitaria de Animales y Plantas) del estado implicado y se tomarán inmediatamente las medidas oportunas para que los contenedores criogénicos de transporte sean debidamente desinfectados.

ANIMALES DE MONTA

Los animales de monta (señuelos) utilizados durante la colecta de semen deberán someterse al mismo régimen de pruebas sanitarias periódicas que los toros para la producción de semen y deberán mantenerse continuamente en condiciones sanitarias iguales 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 los entornos de prueba de aislamiento de CSS. Se deberán desinfectar minuciosamente y eficazmente todas las áreas de contacto entre el pene erecto o de las secreciones genitales con el pelaje o la piel de una monta entre toros de monta sucesivos.

PREINGRESO AL AISLAMIENTO

Los toros o los animales de monta que vayan a ingresar a un centro de IA aprobado por los CSS deberán estar sanos y libres de enfermedades infectocontagiosas y no deberán provenir de un hato en cuarentena. Después de las pruebas previas al ingreso que se describen a continuación, los toros y los animales de monta no deben usarse para servicio natural y deben permanecer aislados de otro ganado. Se entiende por aislamiento la falta de contacto directo o a través de un alambrado con otro ganado.

Los siguientes exámenes y pruebas de diagnóstico se deberán realizar antes del ingreso y se deberán recibir los resultados de cada toro o señoelo antes de ingresar a la instalación de aislamiento para comenzar con el período de aislamiento. Estas pruebas se realizarán preferiblemente antes de la llegada a las instalaciones de aislamiento del Centro de IA. Sin embargo, las pruebas pueden realizarse en una instalación separada del centro de IA, como se describe a continuación, pero el periodo de aislamiento de los animales no comenzará hasta que se conozcan los resultados de las pruebas de preingreso y el toro o el señoelo se trasladen a la instalación de aislamiento.

A efectos de estos requisitos, las pruebas previas al ingreso realizadas en el Centro de IA indican que los toros y los animales de monta deben alojarse en instalaciones de pre-aislamiento que estén bien separadas de las instalaciones ocupadas por los toros y los animales de monta residentes y que también estén separadas de los toros y los animales de monta que se encuentran en las instalaciones de aislamiento. Todo el equipo utilizado para el manejo de los toros y los animales de monta para la colecta de semen, alimentación, bebida y limpieza en hatos de aislamiento o residentes no deberá utilizarse en las instalaciones previas al aislamiento ni en otras instalaciones ganaderas gestionadas por el Centro de IA..

1. Examen físico: Un veterinario de categoría II acreditado por el USDA (o su equivalente en otros países) realizará un examen físico durante los 30 días previos al ingreso para determinar que los toros o vacas señoelo no presentan ningún síntoma clínico de enfermedades infecciosas y contagiosas.
2. Tuberculosis bovina: Durante los 60 días anteriores al ingreso se realizará una prueba oficial de pliegue caudal (PPC) intradérmica; el resultado deberá ser negativo.

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

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

3. Brucelosis bovina: Durante de los 30 días anteriores al ingreso, deberá realizarse una prueba de antígeno tamponado de Brucella (prueba de la 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 toro 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, pero 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 interestatalmente.

4. Leptospirosis bovina: Una prueba de aglutinación microscópica (MAT) en suero para los serotipos *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippotyphosa* con resultado negativo. Esta prueba deberá realizarse durante los 30 días anteriores al ingreso con un 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 debe someterse a una nueva prueba para ese serotipo realizada al menos 14 días después de la prueba anterior. Los hatos que son **negativos a 1:400** en dos pruebas consecutivas tienen un título bajo estable y se consideran negativos. Ambas pruebas se realizarán en los 30 días anteriores al ingreso.

5. Virus de la diarrea viral bovina (VDVB): Se realizará una prueba de detección de antígenos para el VDVB dentro de los 30 días anteriores a la entrada; el resultado deberá ser negativo. La prueba de detección del VDVB deberá ser una de las siguientes pruebas en sangre completa o suero. Una prueba PCR **O** una prueba ELISA de captura de antígenos **O** una prueba de aislamiento del virus realizada en un cultivo celular bovino con un resultado negativo demostrado por la prueba del cultivo celular por PCR o por la tinción del cultivo celular con métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).

AISLAMIENTO

Cada toro o animal de monta debiera permanecer aislado durante el tiempo necesario para realizar las pruebas que se indican a continuación. Cada toro o animal de monta deberá completar con éxito el protocolo de aislamiento antes de que se les permita ingresar a las instalaciones donde se encuentran los toros y animales de monta residentes y antes de que el semen recolectado pueda usarse.

A efectos de estos requisitos, el aislamiento significará que los toros y los señuelos se alojan en instalaciones controladas por la empresa de IA y la supervisión de un veterinario acreditado de categoría II por el USDA (o su equivalente para instalaciones de otros países). Estas instalaciones deben estar efectivamente separadas de las instalaciones ocupadas por los toros y animales de monta residentes y todo el equipo utilizado para manipular los toros y animales de monta para la colecta de semen, alimentación, abrevado, limpieza de las instalaciones ocupadas por el toro o el animal de monta no deberá utilizarse para los hatos de aislamiento ni para los residentes a menos que haya un proceso documentado de saneamiento y desinfección del equipo después de cada uso (libro de registro y POE). Además, las áreas de colecta de semen de los toros en aislamiento deberán estar efectivamente separadas de las áreas utilizadas para toros residentes.

Se deberán efectuar las siguientes pruebas a todos los toros y los animales de monta mientras residan en el centro de aislamiento:

1. Tuberculosis bovina: Se realizará una prueba oficial de pliegue caudal (CFT) intradérmica tras un mínimo de 60 días después de la fecha de una 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 requiere una prueba confirmatoria con resultado negativo para la tuberculosis bovina de acuerdo con las reglamentaciones y pautas del USDA.

Las reglamentaciones de exportación internacional de semen bovino varían entre los países y no todas las pruebas de tuberculosis aprobadas por el USDA están aceptadas para la exportación.

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

En caso de que el toro 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 brucella, pero 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. grippotyphosa* con resultado negativo. Esta prueba deberá realizarse tras un mínimo de treinta (30) días después de la fecha de la prueba de leptospirosis previa al ingreso y tras un mínimo de 21 días después de ingresar en la instalación de aislamiento.
4. 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. Los bovinos que son **negativos a 1:400** en dos pruebas consecutivas tienen estabilizado el título bajo y se considera negativo.
5. Campilobacteriosis bovina y tricomoniasis venérea bovina:
 - a. Examen microscópico del material prepucial cultivado **O** prueba PCR del 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 variables en función de su edad el día de ingreso en la instalación de aislamiento del CSS, con pruebas realizadas al menos a intervalos semanales para completar el número mínimo de pruebas, cada una con un resultado negativo durante el aislamiento para ambos:

Edad del reproductor al ingresar 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

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

Nota: las regulaciones internacionales de 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.

6. Virus de la diarrea viral bovina (VDVB): Todos los toros y animales de monta que ingresen en los centros de IA aprobados por CSS deben ser sometidos a pruebas de viremia y de infección persistente por VDVB mientras estén aislados, con resultados negativos antes de ingresar en el hato residente del centro de IA. Las pruebas deben realizarse tras un mínimo de 21 días después del ingreso al centro de aislamiento. Además, todos los toros deberán ser evaluados por 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 del virus en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasadas en cultivo celular bovino con resultado negativo demostrado por la prueba del cultivo celular por PCR o por la tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).
 - b. Especímenes de diagnóstico: prueba PCR o prueba de aislamiento del virus en sangre completa.

- c. Demostración de infección persistente del VDVB: Si se demuestra la presencia del virus de la diarrea viral bovina por PCR **O** por aislamiento del virus seguido de PCR, FA o IP en cultivo celular en sangre completa, el animal deberá quedar aislado de otros bovinos y se lo volverá a examinar tras un mínimo de 21 días a través de PCR en sangre completa **O** con prueba de aislamiento del virus en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasadas realizadas en cultivo celular bovino con un resultado negativo demostrado por la prueba del cultivo celular por PCR o por tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP). La demostración de presencia del VDVB por segunda vez se considera indicativa de infección persistente y el animal no reúne los requisitos para ingresar al hato residente del centro de IA aprobado por el CSS y debe ser retirado de inmediato del centro de aislamiento.
- d. Demostración de que un animal no tiene una infección persistente: Los animales en los que se haya aislado o demostrado la presencia del VDVB deben permanecer aislados, separados de otros bovinos, hasta que se demuestre que están libres del VDVB mediante 2 pruebas negativas consecutivas realizadas con un mínimo de 14 días de diferencia, utilizando pruebas de PCR en sangre completa **O** pruebas de aislamiento del virus en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasadas realizadas en cultivo celular bovino con un resultado negativo, demostrado mediante la prueba del cultivo celular por PCR 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 demuestre que están libres de infección persistente, se deben tomar muestras de cualquier 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 del virus en sangre completa, para someterlas a una prueba de PCR de cada código de colecta. Se requiere un resultado negativo del código de colecta para que sea liberado para su distribución.

- e. Si un animal demuestra la presencia del VDVB, después de separar al animal de otros bovinos, el ganado restante en la instalación de aislamiento requerirá una nueva prueba tras un mínimo de 14 días después de la separación del animal positivo, utilizando una prueba de PCR en sangre entera **O** una prueba de aislamiento del virus en sangre completa con un mínimo de dos (2) pasadas realizadas en cultivo celular bovino con un resultado negativo demostrado mediante la prueba del cultivo celular por PCR o mediante la tinción del cultivo celular por métodos de inmunofluorescencia (FA) o inmunoperoxidasa (IP).

Se deberá realizar la siguiente prueba 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, esta prueba puede realizarse después de que se complete el 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. Deben realizarse pruebas de neutralización sérica (SN) **O** la prueba ELISA de anticuerpos para los tipos I y II en todos los toros durante el período de aislamiento para detección del virus de DVB. Todos los toros que den positivo deben tener una prueba de PCR negativa en una muestra de semen congelado completamente diluida. 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].

-O-

- b. Los toros deben tener una (1) prueba PCR negativa en una muestra de semen congelado totalmente diluida. 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 ser sometidos a pruebas adicionales de semen procesado para confirmar una infección testicular persistente].

Los toros con una infección testicular persistente por el BVDV no reúnen los requisitos para la colecta de semen y no se les permite permanecer en la instalación de aislamiento o con el hato residente.

Cualquier toro que tenga una prueba de PCR positiva o una prueba de aislamiento del virus en sangre completa durante el aislamiento y que demuestre que NO está infectado de forma persistente, debe tener pruebas de PCR negativas en muestras de semen congelado completamente diluidas y colectadas en al menos tres (3) ocasiones distintas a intervalos no inferiores a siete (7) días. Estas muestras de semen para el análisis deben ser colectadas 21 días después de la última prueba PCR positiva o de la prueba de aislamiento del virus en sangre completa.

La normativa de exportación internacional de semen bovino varía entre los países y no todos los procedimientos de prueba de CSS para el VDVB están aceptados para la exportación.

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 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.

HATO RESIDENTE

Una vez que un toro o un animal de monta hayan completado las pruebas de aislamiento detalladas anteriormente, puede ingresar al hato residente donde deberá seguir sometiéndose a pruebas de acuerdo con los procedimientos de prueba que se detallan 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 del pliegue caudal (PPC) intradérmica; el resultado será negativo.

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

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

2. Brucelosis bovina: Una prueba de antígeno brucelar tamponado (prueba de la 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 toro 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 se clasifique al toro con una clasificación negativa de brucelosis, pero 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 debe someterse a una nueva prueba para ese serotipo y realizarla como mínimo 14 días después de la prueba anterior. Los hatos que son **negativos a 1:400** en dos pruebas consecutivas tienen un título bajo estable y se consideran negativos.

4. Campilobacteriosis bovina y Tricomoniasis venérea bovina:

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

Todos los toros o animales de monta del hato residente se mantendrán continuamente aislados de todas las demás especies de ganado y de otros animales bovinos que no tengan un estatus sanitario equivalente. Si se permite que un toro o animal de monta del hato residente examinado entre en contacto con cualquier animal bovino que no tenga un estatus equivalente deberá ser retirado inmediatamente del hato residente examinado y no se le permitirá volver a ingresar hasta que haya completado otro ciclo de preingreso y aislamiento y las pruebas prescritas para ello, salvo lo dispuesto en el siguiente párrafo.

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 procesó después de la vuelta del toro a producción.

ANTIBIÓTICOS Y PROCESAMIENTO DE SEMEN

1. Se agregarán antibióticos al semen sin diluir y al diluyente para proporcionar un control microbiológico eficazde:

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 organismos microbianos patogénicos específicos potencialmente presentes se reducen por debajo del umbral de la patogenicidad o se destruyen.
3. Un protocolo aceptable es 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 de los procesos que deberán seguirse se describe en el Apéndice 1.
4. Los protocolos alternativos aceptables deben proporcionar un control microbiológico eficaz (de los organismos mencionados en el punto 1) sobre la 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. La información se describe 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
 - espectinomina 600 µg
- b. El agregado de estos antibióticos deberá programarse de tal manera que haya un periodo *mínimo* de tres a cinco minutos en el cual los antibióticos estén en contacto con el semen puro, antes de agregar cualquier diluyente.¹
- c. Estos procedimientos son necesarios independientemente del tipo de diluyente utilizado.^{1,4}

2. Antibióticos en polvo premezclados

- a. Los antibióticos GTLS premezclados en polvo están formulados para contener las siguientes concentraciones de antibióticos *activos* por 0,02 ml de solución final:
 - gentamicina 500 µg
 - tilosina 100 µg
 - lincomicina 300 µg
 - espectinomina 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 de ósmosis inversa) y mezclada según las instrucciones del fabricante.
- d. Los antibióticos premezclados en polvo reconstituidos:
 - - deben utilizarse el mismo día de la mezcla y no deben conservarse
 - O-
 - - pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -20°C, o una temperatura más fría, durante un máximo de 7 días. Las alícuotas deben descongelarse a temperatura ambiente y utilizarse sólo el día de la descongelación y no volver a congelarse.⁵

Los diluyentes deben utilizarse el mismo día que se añadan los antibióticos reconstituidos.

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 medirse por el peso real en lugar de tener que calcular el peso en función de la potencia.
- d. Los Certificados de Análisis, para cada tipo de antibiótico y lote, deben 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 obtenidos de algunas 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., asegurará un nivel mínimo de pruebas, con valores de potencia y enumerará los ingredientes inertes que podrían ser problemáticos. Por favor, póngase en contacto con Certified Semen Services para obtener orientación.

DILUYENTES

4. Diluyente de 2 pasos

- a. Tratamiento de semen puro de 0,02 ml de GTLS/ml de semen puro, con un tiempo de contacto **mínimo** de 3 minutos. Ver sección 1.
- b. La fracción sin glicerol se preparará para 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 añade al semen puro antes del enfriamiento. Todo el semen debe mantenerse en contacto con el diluyente sin glicerol durante un **mínimo** de dos horas, mientras se enfría a 5°C. Luego se puede agregar el diluyente con glicerol.¹
- d. La fracción glicérica del diluyente podrá contener hasta el 10 por ciento de la concentración de antibióticos indicada en la sección 4.b Fracción no glicérica del diluyente. Este agregado no puede contarse para la concentración final de antibióticos enumerada en la sección 4.b.
- e. La fracción glicérica del diluyente deberá añadirse a la fracción no glicérica del diluyente más el semen 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 debe utilizarse el mismo día de la mezcla y los excedentes deben desecharse.

5. Diluyente de 1 paso

a. Tratamiento de semen puro de 0,02 ml de GTLS/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 1 paso, producirán la siguiente concentración final de GTLS /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 es el doble que la del protocolo de diluyente de 2 pasos.

d. Todo el semen debe mantenerse en contacto con el diluyente de 1 paso durante un *mínimo* de dos horas, mientras se enfría a 5°C.

e. El diluyente con antibióticos debe utilizarse el mismo día de la mezcla y los excedentes deben desecharse.

PROCEDIMIENTOS Y DESVIACIONES

6. Procedimientos necesarios en el procesamiento

a. El diluyente debe ser aprobado por el CSS. Véase el Apéndice 1A

b. Se debe seguir el tratamiento con antibióticos para el semen puro y los diluyentes según las Secciones 1., 4. y 5. de este Apéndice 1.

c. El tiempo de contacto del antibiótico GTLS con el semen puro debe ser de al menos tres minutos.

d. El semen en la fracción del diluyente sin glicerol debe enfriarse durante al menos dos horas hasta alcanzar los 5°C antes de añadir la fracción con glicerol.

e. El semen en el diluyente de un solo paso debe enfriarse durante al menos dos horas a 5°C antes de los pasos adicionales de procesamiento.

f. Otros procedimientos descritos en las secciones 1 a 5 de este Apéndice 1.

7. Desviación de los procedimientos necesarios de procesamiento

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, si hay una desviación de cualquiera de los procedimientos requeridos que se enumeran en este Apéndice 1, será necesario que CSS realice una evaluación y una posible prueba de eficacia de los antibióticos.

- a. Se presentará una solicitud por escrito para que se haga una excepción al/los Director(es) de Servicio de CSS.
- b. Cuando se presente cualquier composición nueva de diluyente para su evaluación y posible prueba de eficacia, los componentes y las proporciones deben compartirse con CSS y se mantendrán en 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 pueden realizarse en un laboratorio aprobado por CSS que haya demostrado competencia para realizar estos análisis.
- e. El laboratorio enviará los resultados de esta prueba al Director de Servicio de CSS y a la organización que la solicitó.
- f. Si los resultados demuestran una eficacia igual o superior a la obtenida por Shin¹, CSS otorgará permiso para utilizar el procedimiento.
- g. Todos los honorarios y gastos para la evaluación de la desviación y/o las pruebas de eficacia serán pagados por la organización que hace la solicitud y serán 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. 18^o Jornadas Técnicas de Inseminación y Reproducción Artificial. Asociación Nacional de Criadores de Animales, Columbia, MO, 29-30 de septiembre de 2000, Actas, 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. Marzo de 2021. Proyecto de investigación patrocinado por NAAB/CSS.
6. Monografías de referencia de U.S. Pharmacopeia por número de CAS.

APÉNDICE 1A

DILUYENTES APROBADOS POR CSS

1. CSS ha aprobado los siguientes diluyentes que están disponibles comercialmente para su uso:

Andromed-CSS 1-paso* - Minitube USA	Optidyl CSS 1-paso* - IMV Int'l Corp dba IMV Technologies
Andromed-CSS 2 pasos - Minitube USA	Optidyl CSS 1-paso* - IMV Int'l Corp dba IMV Technologies
Biladyl 2 pasos - Minitube USA	Steridyl-CSS 1-paso* - Minitube USA
BioXcell 1-paso* - IMV Int'l Corp dba IMV Technologies	Steridyl-CSS 2 pasos - Minitube USA
BioXcell 2 pasos - IMV Int'l Corp dba IMV Technologies	Triladyl-CSS 1-paso* - Minitube USA
BoviPro Cryoguard 1-paso* - Minitube of America, Inc.	Viam Pac 2 pasos - Viam Pac Inc.
BoviPro Cryoguard 2 pasos - Minitube of America, Inc.	BoviFree CSS 1-paso* - Minitube USA
Concentrated Semen Ext. 1 paso* - Continental Plastic Corp.	BoviFree CSS 2 pasos - Minitube USA
Concentrated Semen Ext. 2 pasos - Continental Plastic Corp.	GameteGuard® -FB 1-Step Extender *— Membrane Protective Technologies, Inc.
Bovine -ExtTM One Part 1-step* - Reproduction Provisions	GameteGuard® -FB 2-Step Extender — Membrane Protective Technologies, Inc.
Bovine -ExtTM Two Part 2-step - Reproduction Provisions	

* Los diluyentes de un paso requieren cantidades adicionales de antibióticos GTLS tal como se describe en la Sección II del Apéndice 1. CSS no respalda la inclusión de antibióticos en diluyentes líquidos concentrados preparados por el fabricante y dichos antibióticos no deben considerarse para las concentraciones requeridas finales.

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 actual combinación de antibióticos GTLS en los diluyentes 1, 2 y 3 no afectó negativamente la motilidad o la fertilidad después de la descongelación.^{2,3} Los diluyentes 4 y 5 no fueron evaluados. 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 gm % citrato de sodio dihidratado 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, contacte con CSS.

4. Además de los diluyentes enumerados aquí, otros diluyentes han sido aprobados por CSS a través de los procedimientos descritos en el Apéndice 1 Sección 7. Se trata de diluyentes patentados utilizados por organizaciones individuales y se mantienen en 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 (21 de enero de 2021):

ENTORNOS DE PRUEBAS			
	Preingreso al aislamiento	Aislamiento	Hato residente
	(Durante los 60 días previos al ingreso a un centro de aislamiento de CSS)	(Pruebas antes de ingresar en un hato residente y obtener el semen)	(Centro de colección del 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)	Prueba intradérmica del pliegue caudal negativa o prueba de confirmación oficial al menos 60 días antes de la prueba de preingreso y 21 días después de ingresar en el 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 necesario 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 negativas en suero tras un mínimo de 30 días después de la prueba de preingreso y 21 días después de ingresar en el 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 de aislamiento de virus negativas realizadas en sangre completa o suero.	Prueba PCR o de aislamiento de virus negativas (2 pasadas como mínimo) realizadas en sangre completa al menos 21 días después del ingreso en el centro de aislamiento de CSS Y Prueba PCR negativa de semen procesado congelado antes de liberarlo 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 estabilizado en suero para 5 serotipos importantes en los EE.UU. ¹	Prueba MAT negativa o con título bajo estabilizado en suero para 5 serotipos importantes en los EE.UU. ¹ tras un mínimo de 30 días después de la prueba de preingreso y 21 días después de ingresar en aislamiento.	
Campilobacteriosis		Serie de pruebas negativas PCR o de cultivo de material del prepucio completas al menos a intervalos semanales: <ul style="list-style-type: none"> • Toros de menos de 180 días de edad² con certificación³ – negativo en una prueba • Toros de menos de 365 días de edad² – negativo en 3 pruebas • Toros de 365 o más días de edad² – negativo en 6 pruebas. 	Pruebas negativas PCR o de cultivo de material del prepucio completas a intervalos de 6 meses
Tricomonirosis		Serie de pruebas PCR o de cultivo de material del prepucio negativas completada al menos a intervalos semanales: <ul style="list-style-type: none"> • Toros de menos de 180 días de edad² con certificación³ – negativo en una prueba • Toros de menos de 365 días de edad² – negativo en 3 pruebas • Toros de 365 o más días de edad² – negativo en 6 pruebas. 	Prueba negativa PCR o prueba negativa de examen microscópico de cultivo de material del prepucio a intervalos de 6 meses.

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

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 un EJEMPLO de una lista de verificación y un cronograma de pruebas sanitarias que deben completarse durante el intervalo de pruebas de aislamiento de CSS:

PREINGRESO A LAS PRUEBAS DE 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 deben ser utilizados para el servicio natural después del examen físico y las pruebas
 5. Deben estar aislados de otros animales después del examen físico y las pruebas

- Deben realizarse las pruebas y conocerse los resultados antes de que el toro ingrese a la instalación de aislamiento de CSS
 1. Durante los 60 días anteriores al ingreso al aislamiento:
 - Tuberculosis bovina** - Prueba del pliegue caudal intradérmica negativa **o** prueba oficial de confirmación.
 2. Durante los 30 días anteriores 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 de título bajo estable en **suero** 5 serovares (*L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*)
 - PCR o ELISA** de captura de antígeno o aislamiento del virus 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 Campylobacteriosis completadas al menos a intervalos semanales.

1. Semana 1 (Día 0):
 - Tricomoniasis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
 - Campilobacteriosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
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):
 - Tricomoniasis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo^{1,2}
 - Campilobacteriosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo^{1,2}
5. Semana 5 (Día 28):
 - Tricomoniasis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
 - Campilobacteriosis** - Cultivo o PCR del material prepucial negativo¹
6. Semana 6 (Día 35):
 - Tricomoniasis** - 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 estable en **suero**^{4,5}
5 serovares (*L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*)
 - VDVB** - PCR o aislamiento del virus 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 1 Si el toro tiene 365 días de edad o más el día de ingreso al aislamiento en CSS

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

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

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

⁶ 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 del envío de semen.

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