



Enero de 2014

## **REQUISITOS MÍNIMOS EXIGIDOS POR LOS SERVICIOS DE SEMEN CERTIFICADOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN SEMEN PRODUCIDO PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

Los “Requisitos mínimos exigidos por los Servicios de Semen Certificados (CSS) para el control de enfermedades en semen producido para 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, delimita los procedimientos sanitarios correctos e incluye los requisitos para el agregado de antibióticos apropiados tanto al semen como al diluyente para proporcionar el control de contaminación microbiana patogénica. El objetivo de estos requisitos es proteger la salud de los sementales donantes y del hato en el cual se utilizará el semen.

### **CONDICIONES SANITARIAS GENERALES**

1. El equipo de acopio de semen que entre en contacto con toros 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 sitio de estabulación de los toros y del sitio de acopio del semen, y construido de manera de permitir un manejo y almacenamiento higiénicos del semen.
4. Las pruebas sanitarias que se realizarán de conformidad con los siguientes requisitos deberán realizarse de una manera acorde con los procedimientos que se describen en “Procedimientos de diagnóstico uniformes recomendados para la calificación de toros para la producción de semen” que publicó la Asociación Americana de Especialistas en Laboratorios de Diagnóstico Veterinarios (AAVLD) u otros procedimientos de diagnóstico reconocidos como equivalentes a los procedimientos publicados por la AAVLD.
5. Deberá prestarse atención a los termos de nitrógeno líquido que regresen de países extranjeros no declarados libres de fiebre aftosa por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA), para determinar si se desinfectaron en el puerto de entrada. Si han sido debidamente desinfectados, tendrán una etiqueta que lo indique. Si no se ha realizado la desinfección, se deberá notificar inmediatamente al médico veterinario del USDA o del Servicio de Inspección Sanitaria de Animales y Plantas (Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS) del estado, y se deberán tomar inmediatamente las medidas necesarias para hacer desinfectar los termos como corresponda.

### **ANIMALES DE MONTA**

Los animales de monta (señuelos) utilizados durante el acopio 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 del pene erecto o de las secreciones genitales con el pelaje o la piel de una monta entre toros de monta sucesivos.

## PREVIO AL INGRESO HASTA EL 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 en 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.

Se deberán realizar los siguientes exámenes y pruebas de diagnóstico antes del ingreso y se deberán recibir los resultados de cada toro o animal de monta antes de comenzar con el período de aislamiento. Preferentemente, estas pruebas se realizan antes de la llegada a las instalaciones de aislamiento del Centro de IA. Sin embargo, es posible realizarlas en un lugar separado en el Centro de IA, tal como se describe a continuación, pero el período de aislamiento del animal no deberá comenzar hasta que se conozcan los resultados de las pruebas previas al ingreso.

A los fines de estos requisitos, las pruebas previas al ingreso realizadas en el Centro de IA indican que los toros y los animales para la monta deben alojarse en instalaciones previo al 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 acopio de semen, alimentación, bebida y limpieza en hatos de aislamiento o residentes no deberá utilizarse en las instalaciones previas al aislamiento.

1. Examen físico: un médico veterinario acreditado deberá realizar un examen físico dentro de los 30 días previos al ingreso para determinar que los toros o los animales de monta no presentan síntomas clínicos de ninguna enfermedad infectocontagiosa.
2. Tuberculosis: se deberá realizar una prueba de pliegue caudal (Caudal Fold Test, CFT) intradérmica dentro de los 60 días previos al ingreso y los resultados deberán ser negativos.

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

Nota: 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.

3. Brucelosis bovina: se deberá realizar una prueba con antígeno tamponado de Brucella (prueba de la tarjeta o BAPA) o una prueba de fijación del complemento (CF) dentro de los 30 días previos al ingreso; los resultados deberán ser negativos. En caso de que el animal deba transportarse de un estado a otro, la prueba de brucelosis debe cumplir con la normativa pertinente.
4. Leptospirosis bovina: se deberá realizar un análisis de sangre de los serotipos L. pomona, L. hardjo, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae y L. grippotyphosa dentro de los 30 días antes del ingreso. Todos los animales con títulos importantes pueden ser sometidos a un segundo análisis de sangre dentro de las dos a cuatro semanas posteriores al primero. Puede realizarse una titulación final o limitante (1:100 o mayor) en las dos muestras. El ganado que tenga un título bajo estable (negativo en 1:400) en las dos pruebas puede considerarse apto para ingresar al centro de aislamiento.
5. Virus de la diarrea viral bovina (DVB): se deberá realizar un análisis de sangre de detección del virus de la DVB dentro de los 30 días previos al ingreso y los resultados deberán ser negativos. La prueba del virus de DVB deberá ser una prueba de aislamiento viral en sangre entera o suero (véase AISLAMIENTO, 1., f., ii.) realizada en cultivo celular bovino seguida de tinción del cultivo celular mediante el método de inmunofluorescencia (FA) o de inmunoperoxidasa (IP), **O** una captura de antígeno (ELISA), **O** una prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

## AISLAMIENTO

Todos los toros y animales de monta deberán permanecer aislados durante el tiempo necesario para realizar las pruebas antes detalladas. Cada toro o animal de monta deberá completar con éxito el protocolo de aislamiento antes de que se le 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 los fines de estos requisitos, por aislamiento se entiende que los toros y los animales de monta están alojados en instalaciones bajo el control (supervisión) de la empresa de IA. Estas instalaciones deben estar efectivamente separadas de las instalaciones donde se encuentran los toros y los animales de monta residentes, y no deberá utilizarse el mismo equipo que se utiliza para manipular los toros y los animales de monta para acopio de semen, alimentación, bebida y limpieza de las instalaciones donde se encuentra el toro o el animal de monta en hatos de aislamiento y residentes. Además, las áreas para acopio de semen de los toros en aislamiento deberán estar efectivamente separadas de las áreas utilizadas para toros residentes.

1. Se deberán efectuar las siguientes pruebas a todos los toros y los animales de monta mientras residan en el centro de aislamiento.
  - a. Tuberculosis: se deberá realizar una prueba de pliegue caudal (CFT) intradérmica oficial al menos 60 días después de la fecha de una prueba de tuberculosis previa al ingreso y no antes de 21 días posteriores al ingreso al aislamiento; el resultado deberá ser negativo.

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

Nota: 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.

- b. Brucelosis bovina: una prueba con antígeno tamponado de Brucella (prueba de tarjeta o BAPA) o una prueba de fijación del complemento (CF) con resultados negativos. Estas pruebas serológicas deberán realizarse no antes de los treinta (30) días posteriores a la fecha de la prueba de brucelosis previa al ingreso y no antes de 21 días posteriores al ingreso al aislamiento.

Si el toro tuviese un resultado que no sea negativo, se recomienda que se realice otra prueba de brucelosis oficial del USDA. Un resultado negativo en la segunda prueba o en las pruebas de brucelosis oficiales adicionales puede permitir que el toro tenga una clasificación negativa para brucella, pero la clasificación final sigue dependiendo de los funcionarios veterinarios del estado.

- c. Leptospirosis bovina: análisis serológico de los serotipos L. pomona, L. hardjo, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae y L. grippotyphosa. Esta prueba deberá realizarse no antes de los treinta (30) días posteriores a la fecha de la prueba de leptospirosis previa al ingreso y no antes de 21 días posteriores al ingreso al aislamiento. Se prefiere un resultado negativo. Sin embargo, si el resultado no es negativo (es decir, es positivo a 1:100 ó más), el animal debe realizarse al menos una prueba adicional como mínimo 14 días después de la prueba anterior. Se considera que los hatos que obtengan un resultado negativo de un valor de 1:400 en al menos dos pruebas consecutivas tienen un título bajo estable.

- d. Campilobacteriosis bovina: se deberá cultivar y examinar el material prepucial para detectar el *Campylobacter foetus venerealis*; el resultado deberá ser negativo.

Los toros y los animales de monta pueden someterse al siguiente cronograma variable de pruebas:

Edad del semental <u>al momento de ingresar al aislamiento</u>	Cantidad mínima de pruebas <u>(intervalos semanales)</u>
Menos de 180 días *	1
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 (30) días de edad.
- e. Tricomoniasis genital bovina: los exámenes microscópicos de los cultivos de material prepucial recogido del fondo de saco prepucial deberán ser negativos. La frecuencia de las pruebas deberá ser igual a la que se detalla en AISLAMIENTO 1.d. Campilobacteriosis bovina.
- f. Virus de la diarrea viral bovina (DVB): a todos los toros y animales de monta que ingresen a los centros de IA aprobados por CSS se les deberán realizar las pruebas de viremia e infección persistente por el virus de la DVB mientras estén en aislamiento, con resultados negativos antes de ingresar al hato residente del Centro de IA. Las pruebas deben realizarse no antes de los 10 días posteriores al ingreso al centro de aislamiento. Además, todos los toros sementales deberán evaluarse mediante un programa de pruebas para detectar infecciones testiculares persistentes.

Se deben utilizar los siguientes métodos y cronogramas de pruebas para detectar infección virémica persistente por DVB.

- i. Prueba de diagnóstico: debe realizarse al animal una prueba de PCR en sangre entera o una prueba de aislamiento del virus de una pasada en cultivo celular bovino con resultado negativo demostrado por tinción del cultivo celular mediante los métodos de inmunofluorescencia (FA) o de inmunoperoxidasa (IP).
- ii. Muestras de diagnóstico: prueba de PCR en sangre entera. Aislamiento viral en sangre entera o suero, pero la sangre entera debe utilizarse para animales de menos de 6 meses de edad.
- iii. Confirmación de infección por DVB persistente: si se demuestra la presencia de DVB mediante FA o IP en cultivo celular O mediante PCR, el animal debe ser aislado del resto del ganado y se le deberán volver a realizar las pruebas no antes de los 21 días mediante PCR (suero en este caso, independientemente de la edad del animal) O por inoculación en cultivo celular bovino con una muestra adecuada (sangre entera o suero, según la edad del animal). La demostración de presencia del virus de DVB por segunda vez se considera confirmación de infección persistente y el animal no reúne los requisitos para ingresar al hato residente del centro de IA aprobado por CSS.
- iv. Confirmación de que un animal no tiene infección persistente: los animales en los cuales se aisló el virus del DVB o en los que se ha demostrado la presencia del virus de DVB deben permanecer en aislamiento lejos del resto del hato hasta que se compruebe que no tienen DVB mediante dos pruebas de aislamiento viral negativas consecutivas realizadas como mínimo con 10 días de diferencia y en la muestra adecuada (sangre entera o suero).

Las muestras de semen de los toros en las cuales se aisló el virus de DVB pero que luego se comprueba que no tienen infección persistente (como se indica anteriormente en iv.) que se recolectaron y procesaron dentro de los 30 días anteriores y posteriores a la fecha de aislamiento del virus positivo deben someterse a pruebas de aislamiento del virus de DVB o PCR con resultados negativos de cada código de recolección antes de su distribución.

2. Se deberá realizar la siguiente prueba a todos los toros antes de que el semen sea aprobado. Si los toros no están en edad de producción de semen durante el período de aislamiento de CSS, esta prueba puede realizarse luego de que se complete el período de aislamiento:

Virus de la diarrea viral bovina (DVB): se utiliza uno de los siguientes métodos y cronogramas de pruebas para detectar la infección testicular persistente por el virus de DVB.

- i. Deben realizarse pruebas de neutralización sérica (SN) para los tipos I y II en todos los toros durante el período de aislamiento para detección del virus de DVB. Todos los toros con resultado positivo deben tener una prueba PCR negativa en el semen procesado. El semen procesado es el semen en su dilución final 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].

**“O BIEN”**

- ii. Todos los toros deben tener una prueba PCR negativa en el semen procesado. El semen procesado es el semen en su dilución final 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 PCR positiva del semen deben tener pruebas adicionales del semen procesado para confirmar una infección testicular persistente].

Nota: Las reglamentaciones de exportación internacional de semen bovino varían entre los países y no todos los procedimientos de prueba de CSS para el virus de DVB están aceptados para la exportación.

**Nota: Los toros que tengan infección testicular persistente por el virus de DVB no reúnen los requisitos para la recolección de semen y no se les permite permanecer en el hato residente.**

3. Todo el semen deberá tratarse con los antibióticos gentamicina, tilosina y lincoespectina (GTLS) tal como se describe en Shin, et al (1) Lorton, et al (2) y Lorton, et al (3). Los detalles de los procedimientos que deberán utilizarse se detallan en el Apéndice 1.

## HATO RESIDENTE

Una vez que un toro o un animal de monta haya completado las pruebas de aislamiento detalladas anteriormente, este puede ingresar al hato residente donde deberá seguir sometido a pruebas de acuerdo con los procedimientos de prueba que se detallan a continuación.

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

a. Tuberculosis: una prueba de pliegue caudal (CFT) intradérmica oficial; el resultado deberá ser negativo.

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

Nota: 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.

b. Brucelosis bovina: una prueba con antígeno tamponado de Brucella (prueba de tarjeta o BAPA) y una prueba de fijación del complemento con resultados negativos. Si el resultado de alguna de las pruebas no es negativo, consulte AISLAMIENTO 1. b. Brucelosis bovina para obtener información adicional.

c. Leptospirosis bovina: análisis serológico de los serotipos L. pomona, L. hardjo, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae y L. grippotyphosa. Si el resultado no es negativo, el toro debe tener un título bajo estable. Consulte AISLAMIENTO 1.c. Leptospirosis bovina.

d. Tricomoniasis genital bovina: un examen microscópico único de material prepucial cultivado con resultado negativo.

e. Campilobacteriosis bovina: una prueba única de cultivo de material prepucial con resultado negativo.

Se deberán agregar antibióticos a todo el semen procesado tal como se describe anteriormente (véase AISLAMIENTO 3.).

2. Todos los toros o animales de monta en el hato residente deberán mantenerse en aislamiento continuo de todos los animales de pezuña hendida que no hayan completado todos los procedimientos de prueba aquí descritos con resultados negativos. En cualquier momento que se permita el contacto de un toro o animal de monta individual del hato residente examinado con un animal no examinado, deberá sacarse al animal inmediatamente del hato residente examinado y no se le deberá permitir volver a ingresar hasta que el momento en el que hayan completado otro ciclo de aislamiento y las pruebas dispuestas, salvo lo dispuesto en el párrafo 3 a continuación.

3. 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 debe reanudarse antes de la aprobación del semen que se procesó después de la vuelta del toro a producción.

## ANTIBIÓTICOS Y PROCESAMIENTO DE SEMEN

1. Se agregarán antibióticos al semen puro y al diluyente para contar con un control microbiológico eficaz de:

Micoplasmas, ureaplasmas  
Histophilus somni  
Campylobacter fetus subesp. 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 e la exposición in vitro de semen y diluyente con los antibióticos gentamicina, tilosina, lincomicina y espectinomicina (GTLS), tal como se describe en Shin, et al (1) Lorton, et al (2) y Lorton, et al (3). La información de los procesos que deberán seguirse se describe en la Sección I del Apéndice 1.
4. Los protocolos aceptables y alternativos deben suministrar un control microbiológico eficaz (de los organismos indicados 1 arriba) sobre la base de la evidencia científica, enviados a Certified Semen Services, Inc. Un ejemplo de un protocolo aprobado y alternativo constituye el procedimiento de un paso, tal como lo describen Shin y Kim (4). La información se describe en la Sección II del Apéndice 1.

## REFERENCIAS

- (1) Shin, S.J., D.H. Lein, V.H. Patten y H.L. Ruhnke. 1988. A New Antibiotic Combination for Frozen Bovine Semen. 1. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, Campylobacter fetus subsp. venerealis and Haemophilus somnus. *Theriogenology*. 29:577.
- (2) Lorton, S.P., J.J. Sullivan, B. Bean, M. Kaproth, H. Kellgren y C. Marshall. 1988. A New Antibiotic Combination for Frozen Bovine Semen. 2. Evaluation of Seminal Quality. *Theriogenology*. 29:593.
- (3) Lorton, S.P., J.J. Sullivan, B. Bean, M. Kaproth, H. Kellgren y C. Marshall. 1988. A New Antibiotic Combination for Frozen Bovine Semen. 3. Evaluation of Fertility. *Theriogenology*. 29:609.
- (4) Shin, S.J. y S.G. Kim. 2000. Comparative Efficacy Study of Bovine Semen Extension: 1-Step vs 2-Step Procedure. *Actas de 18<sup>th</sup> Technical Conf. on Artificial Insemination and Reproduction, NAAB, Columbia, MO.* pp. 60 – 62.

\* \* \* \*

CERTIFIED SEMEN SERVICES (SERVICIOS DE SEMEN CERTIFICADOS)

P.O. BOX 1033

COLUMBIA, MISSOURI 65205-1033

(573) 445-4406 ó 445-9541

Fax: (573) 446-2279

Correo electrónico: [naab-css@naab-css.org](mailto:naab-css@naab-css.org)

## APÉNDICE 1

### CONDICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS ANTIBIÓTICOS GTLS

#### I. Protocolo CSS estándar (Método de dos pasos)

##### A. Antibióticos y soluciones madre

(1) Antibióticos:

- a. Sulfato de gentamicina: en polvo, micronizado, no estéril, U.S.P. (grado veterinario), 100 gramos por frasco.
- b. Tilosina: etiquetada como Tylan Soluble, producto de Elanco Products Company, 100 gramos por frasco.
- c. Lincoespectina: producto de Upjohn Company, 20 ml por vial, cada ml contiene 50 mg de lincomicina y 100 mg de espectinomocina.

**NOTA: Los antibióticos obtenidos de algunas fuentes no fueron probados y por lo tanto, pueden contener agentes perjudiciales que pueden dañar o matar a las células del espermatozoide. Para obtener información sobre las fuentes recomendadas, póngase en contacto con los Servicios de Semen Certificados.**

- (2) Las soluciones madre de los antibióticos individuales (gentamicina y tilosina) pueden prepararse y almacenarse en forma separada a 5 °C durante ocho días o almacenarse congelados en vapor de nitrógeno líquido por un periodo de hasta seis meses. La lincoespectina tal como lo surte el distribuidor, deberá mantenerse a 5° C después de abrirse el envase.
- (3) Las soluciones madre de los antibióticos individuales deberán combinarse el día que se utilicen y no deberá aplazarse su uso.
- (4) Los diluyentes deben utilizarse el mismo día que se añadan los antibióticos combinados.

##### B. Tratamiento del semen puro

- (1) 100 µg de tilosina, 500 µg de gentamicina y 300/600 µg de lincoespectina disueltas en 0,02 ml de agua purificada (p. ej., agua destilada doble esterilizada, de ósmosis inversa), agregándolos y mezclándolos cuidadosamente con cada ml de semen puro.

**NOTA: Todas las concentraciones de antibióticos que aquí se indican son para unidades activas de antibióticos. Los valores potenciales pueden variar entre los lotes de antibióticos. Por lo tanto, se deberán ajustar las cantidades de materias primas para cada lote con el fin de obtener las concentraciones requeridas de antibiótico activo.**

- (2) El agregado de estos antibióticos deberá programarse de tal manera que exista un lapso de tiempo de tres a cinco minutos para que los antibióticos estén en contacto con el semen puro, antes de agregar cualquier diluyente.

##### C. Fracción no glicerólica del diluyente

- (1) Todas las fracciones no glicerólicas de cualquiera de los cinco diluyentes indicados más abajo se prepararán de manera que contengan las siguientes concentraciones de antibióticos, antes de que se agreguen al semen.

tilosina	100 µg por ml
gentamicina	500 µg por ml
lincoespectina	300/600 µg por ml



- (2) Se agrega un volumen de este diluyente (hasta 50 por ciento del volumen de diluyente final que se haya previsto) al semen puro, antes de enfriarlo. Todo el semen debe mantenerse en contacto con el diluyente no glicérico durante un mínimo de dos horas, antes del agregado de cualquier diluyente que contenga glicerol.

#### **D. Fracción glicérica del diluyente**

- (1) Esta fracción del diluyente podrá contener del 5 al 10 por ciento de la concentración de antibióticos indicada en el punto C. (1) Fracción no glicérica del diluyente.
- (2) La fracción glicérica del diluyente deberá añadirse a la fracción no glicérica del diluyente, más semen en una proporción de 1 a 1.

#### **E. Concentración final de los antibióticos**

Al seguir los procedimientos mencionados arriba, se obtendrá una concentración final de 50 µg de tilosina, 250 µg de gentamicina y 150/300 µg de lincoespectina en cada ml de semen congelado.

#### **F. Procedimientos de procesamiento requeridos**

Se ha demostrado que los procedimientos de procesamiento, la composición del diluyente y las combinaciones de antibióticos pueden afectar la eficacia del control microbiano o de la fertilidad. Por lo tanto, es posible que cualquier desviación de lo siguiente requiera que la organización lleve a cabo pruebas de eficacia adicionales:

- (1) Uso de un diluyente distinto al aprobado por los CSS.
- (2) Contacto del antibiótico con semen puro de menos de tres minutos.
- (3) Enfriamiento del semen y la fracción no glicérica durante menos de dos horas a 5° C.
- (4) El glicerol no constituye un componente de diluyente hasta después del enfriamiento a 5° C.

#### **G. Desviación de los procedimientos de procesamiento requeridos**

Si hay una desviación de alguno de los procedimientos detallados en el marco de la Sección F:

- (1) Se presentará una solicitud por escrito de una excepción al Director de Servicio de CSS.
- (2) El Director de Servicio de CSS determinará si la desviación requerirá la realización de pruebas de eficacia. Las pruebas de eficacia correspondientes pueden realizarse en un laboratorio aprobado por CSS que haya demostrado competencia para realizar estos análisis.
- (3) El laboratorio enviará los resultados de esta prueba al Director de Servicio de CSS y a la organización que la solicitó.
- (4) Si los resultados demuestran una eficacia igual o superior a la obtenida por Shin (1), se otorgará permiso para utilizar el procedimiento.
- (5) La organización que presenta la solicitud pagará todos los gastos de estas pruebas.

## H. Diluyentes probados y autorizados

Los siguientes cinco diluyentes han sido probados por su eficacia en el control de organismos microbianos. El uso de la combinación de antibióticos en los diluyentes 1 y 3 no afectaron en forma negativa la motilidad pos-descongelación ni la fertilidad (no se evaluaron los diluyentes 2, 4 y 5). Además de los cinco diluyentes aquí detallados, CSS aprobó otros diluyentes mediante los procedimientos que se indican en la Sección G. ***Para determinar si se ha aprobado un diluyente que no está detallado aquí, comuníquese con el Director de Servicio de CSS para obtener la información pertinente.*** Los antibióticos disueltos en agua purificada (es decir, agua destilada doble esterilizada, de ósmosis inversa) deben incluirse en la preparación de diluyentes para lograr los volúmenes finales mostrados en la Sección I, E del Apéndice 1. La composición final de cada diluyente es la siguiente:

(1) Citrato de yema de huevo

20% yema de huevo  
2,12 gm % citrato de sodio dihidratado  
0,183 gm % monohidrato de ácido cítrico  
7,0% glicerol

(2) 20% tris yema de huevo

20% yema de huevo  
2,42 gm % tris (hidroximetil aminometano)  
1,38 gm % monohidrato de ácido cítrico  
1,00 gm % fructosa  
7,0% glicerol

(3) Leche entera caliente

7,0% glicerol

(4) Plus-X

Plus-X, tal como lo surte el distribuidor.  
7,0% glicerol

(5) 28% tris yema de huevo

28% yema de huevo  
1,92 gm % tris (hidroximetil aminometano)  
1,10 gm % monohidrato de ácido cítrico  
1,00 gm % glucosa  
7,0% glicerol

## CSS ha aprobado los siguientes diluyentes comercialmente disponibles para su uso:

Andromed-CSS (1 paso\*) – Provisiones/Recursos de reproducción  
Andromed-CSS (2 pasos) – Provisiones/Recursos de reproducción  
Biladyl (2 pasos\*) – Provisiones/Recursos de reproducción

BioXcell (1 paso\*) - IMV Int'l Corp bajo el nombre comercial IMV Technologies

BioXcell (2 pasos) - IMV Int'l Corp bajo el nombre comercial IMV Technologies

BoviPro Cryoguard (1 paso\*) – Minitube of America, Inc.

BoviPro Cryoguard (2 pasos) - Minitube of America, Inc.

Concentrated (2 pasos) - Continental Plastic Corp.

Concentrated (1 paso\*) - Continental Plastic Corp.

OptidylCSS (1 paso\*) – IMV Int'l Corp bajo el nombre comercial IMV Technologies

OptiXcell (1 paso\*) - IMV Int'l Corp bajo el nombre comercial IMV Technologies

Triladyl-CSS (1 paso\*) – Provisiones/Recursos de reproducción

Viam Pac (2 pasos) - Viam Pac Inc.

\* Los diluyentes de un paso requieren cantidades adicionales de antibióticos GTLS tal como se describe en la Sección II. Deben utilizarse de acuerdo con los procedimientos detallados por Shin y Kim (4) y no han sido probados ni aprobados por CSS para procesamiento de semen a temperatura ambiente. Los antibióticos para los diluyentes de un paso deben estar compuestos (al momento de su uso) por ingredientes secos. CSS no respalda la inclusión de antibióticos en concentrados de diluyente licuado del fabricante y dichos antibióticos no deben considerarse para las concentraciones requeridas finales.

## REFERENCIAS:

- (1) Shin, S.J., D.H. Lein, V.H. Patten y H.L. Ruhnke. 1988. A New Antibiotic Combination for Frozen Bovine Semen. 1. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, Campylobacter fetus subsp. venerealis and Haemophilus somnus. Theriogenology. 29:577.

## II. Protocolo CSS alternativo (Método de un paso)

### A. Descripción general

Tal como lo describen Shin y Kim (4), este protocolo de procesamiento sólo está aprobado para un diluyente de 20% de tris yema de huevo (véase la Sección I, H, 2 del Apéndice 1). Requiere la misma preparación de antibióticos o soluciones madre (véase la Sección I, A del Apéndice 1); y el tratamiento de semen puro (véase la Sección I, B del Apéndice 1) que el protocolo estándar de 2 pasos. Sin embargo, las diferencias principales con respecto al protocolo de dos pasos de CSS estándar son las siguientes:

- (1) El diluyente no está fraccionado en un componente no glicerólico y glicerólico. El diluyente completo contiene glicerol al 7,0%.
- (2) La concentración de antibióticos GTLS en cada ml de diluyente es la misma que la dispuesta para el tratamiento de semen puro (es decir, 100 µg de tilosina, 500 µg de gentamicina, 300/600 µg de lincoespectina. Entonces, la concentración final de antibióticos se duplica esencialmente, en comparación con el protocolo estándar de 2 pasos.

### B. Tratamiento del semen puro

Idéntico al establecido en el protocolo estándar de dos pasos. Véase la Sección I, B, 1 y 2 del Apéndice 1.

### C. Concentración final de los antibióticos

El protocolo de un paso producirá una concentración final de 100 µg de tilosina, 500 µg de gentamicina y 300/600 µg de lincoespectina en cada ml de semen congelado.

#### **D. Procedimientos de procesamiento requeridos**

Se ha demostrado que los procedimientos de procesamiento, la composición del diluyente y las combinaciones de antibióticos pueden afectar la eficacia del control microbiano o de la fertilidad. Por lo tanto, es posible que cualquier desviación de lo siguiente requiera que la organización lleve a cabo pruebas de eficacia adicionales:

- (1) Uso de diluyente distinto al aprobado por CSS y descrito por Shin y Kim (4).
- (2) Contacto del antibiótico con semen puro de menos de tres minutos.

#### **E. Desviación de los procedimientos de procesamiento requeridos**

Si hay una desviación de alguno de los procedimientos detallados en el marco de la Sección D anterior:

- (1) Se presentará una solicitud por escrito de una excepción al Director de Servicio de CSS.
- (2) El director de Servicio de CSS determinará si la desviación requerirá la realización de pruebas de eficacia. Las pruebas de eficacia correspondientes pueden realizarse en un laboratorio aprobado por CSS que haya demostrado competencia para realizar estos análisis.
- (3) El laboratorio enviará los resultados de esta prueba al Director de Servicio de CSS y a la organización que la solicitó.
- (4) Si los resultados demuestran una eficacia igual o superior a la obtenida por Shin (1) o Shin y Kim (4) se otorgará permiso para utilizar el procedimiento.
- (5) La organización que presenta la solicitud pagará todos los gastos de estas pruebas.

#### **REFERENCIAS:**

- (1) Shin, S.J., D.H. Lein, V.H. Patten y H.L. Ruhnke. 1988. A New Antibiotic Combination for Frozen Bovine Semen. 1. Control of Mycoplasmas. Ureplasmas. Campylobacter fetus subsp. venerealis and Haemophilus somnus. *Theriogenology*. 29:577.
- (4) Shin, S.J. and S.G. Kim. 2000. Comparative Efficacy Study of Bovine Semen Extension: 1-Step vs 2-Step Procedure. Actas de 18<sup>th</sup> Technical Conf. on Artificial Insemination and Reproduction, NAAB, Columbia, MO. pp. 60-62.

## APÉNDICE 2

### PROTOCOLO BÁSICO DE PRUEBAS DEL CENTRO DE IA

El programa básico de pruebas sanitarias se detalla en los “Requisitos mínimos exigidos por los servicios de semen certificados (CSS) para el control de enfermedades en semen producido para 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 hay un resumen del programa de pruebas de CSS:

	<b>ENTORNOS DE PRUEBAS</b>		
	<b>Previo al ingreso hasta el aislamiento</b> (Dentro de los 30 días anteriores al ingreso al lugar de aislamiento)	<b>Aislamiento</b> (Prueba antes del ingreso a un hato residente y aprobación del semen)	<b>Hato residente</b> (Centro de acopio de semen)
<u>Examen físico</u>	Realizado por un médico veterinario acreditado.		
<u>Tuberculosis</u>	Prueba de tuberculina intradérmica negativa. (Dentro de los 60 días anteriores al ingreso)	Prueba de tuberculina intradérmica negativa al menos 60 días posteriores a la prueba previa al ingreso y 21 días después del ingreso al aislamiento.	Prueba de tuberculina intradérmica negativa en intervalos de 6 meses.
<u>Brucelosis</u>	Prueba oficial del estado en el que reside el toro. Análisis de sangre y suero (CF, BAPA o de Tarjeta)	Fijación del complemento (CF) y prueba BAPA o de tarjeta como mínimo 30 días después de la prueba previa al ingreso y 21 días después del ingreso al aislamiento.	Fijación del complemento (CF) y prueba BAPA o de tarjeta en intervalos de 6 meses.
<u>Virus de la diarrea viral bovina</u>	Una prueba de aislamiento viral negativa realizada en sangre entera (animales de menos de 6 meses de edad) o suero, o una captura de antígeno (ELISA), o una prueba de PCR.	Una prueba de aislamiento viral negativa realizada en sangre entera (animales de menos de 6 meses de edad) o suero o una prueba de PCR negativa en sangre entera, como mínimos 10 días después del ingreso al centro de aislamiento.  Prueba de PCR de semen procesado congelado negativa antes de la aprobación para su uso o prueba de PCR de semen procesado congelado de donantes con resultado positivo negativa para el virus de DVB a través de la prueba SN para los tipos I y II.	

## ENTORNOS DE PRUEBAS

	<b>Previo al ingreso hasta el aislamiento</b> (Dentro de los 30 días anteriores al ingreso al lugar de aislamiento)	<b>Aislamiento</b> (Prueba antes del ingreso a un hato residente y aprobación del semen)	<b>Hato residente</b> (Centro de acopio de semen)
<u>Leptospirosis</u>	Análisis de sangre de los 5 serotipos importantes en EE. UU.*.	Análisis de sangre de los 5 serotipos importantes en EE. UU.*. No antes de 30 días después de la prueba previa al ingreso y 21 días después del ingreso al aislamiento.	Análisis de sangre de los 5 serotipos importantes en EE. UU.* en intervalos de 6 meses.
<u>Campilobacteriosis</u>		<p>Serie de exámenes negativos de cultivo de material prepucial. Toros de menos de 180 días de edad: negativo en 1 prueba.</p> <p>Toros de entre 180 y 364 días de edad: negativo en 3 pruebas semanales.</p> <p>Toros de 365 días o mayores con resultado negativo en 6 pruebas semanales.</p>	Prueba de cultivo único negativo de material prepucial o AF para la prueba de detección en intervalos de 6 meses.
<u>Tricomonirosis</u>		<p>Serie de exámenes microscópicos negativos de cultivo de material prepucial.</p> <p>Toros de menos de 180 días de edad: negativo en 1 prueba.</p> <p>Toros de entre 180 y 364 días de edad: negativo en 3 pruebas semanales.</p> <p>Toros de 365 días o mayores con resultado negativo en 6 pruebas semanales.</p>	Prueba microscópica única negativa de cultivo de material prepucial en intervalos de 6 meses.

\* L. pomona, L. hardjo, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. grippotyphosa

→ 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.

### **Tratamiento con antibióticos del semen y del diluyente**

- 1) Tratamiento de semen puro: 100 µg de tilosina, 500 µg gentamicina y 300/600 µg de lincoespectina disueltas en 0,02 ml de agua purificada (es decir, agua destilada doble esterilizada, de ósmosis), agregándolos y mezclándolos con cada ml de semen puro.
- 2) Diluyente de semen aprobado por CSS (Método estándar de dos pasos): los mismos antibióticos se agregan al diluyente de manera tal que la concentración final sea de 50 µg de tilosina, 250 µg de gentamicina y 150/300 µg de lincoespectina en cada ml de semen congelado.
- 3) Diluyente de semen aprobado por CSS (Método alternativo de un paso): los mismos antibióticos se agregan al diluyente de manera tal que la concentración final sea de 100 µg de tilosina, 500 µg de gentamicina y 300/600 µg de lincoespectina en cada ml de semen congelado.

## APÉNDICE 3

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

A continuación, se presenta una lista de verificación de ejemplo y un cronograma de pruebas de salud que deben completarse durante el intervalo de pruebas de aislamiento de CSS:

#### Prueba previo al ingreso hasta el aislamiento

- Antes de la prueba, los toros deben tener las siguientes condiciones: 1) estar sanos, 2) libres de enfermedades infectocontagiosas, 3) no deberán provenir de un hato en cuarentena, 4) no pueden usarse en servicio natural, 5) deben permanecer aislados de otro ganado.
- Deben realizarse las pruebas y conocerse los resultados antes de que el toro ingrese a la instalación de aislamiento.

#### Dentro de los 60 días anteriores al ingreso al aislamiento:

- 1) prueba intradérmica de tuberculosis

#### Dentro de los 30 días anteriores al ingreso al aislamiento:

- 1) examen físico
- 2) brucelosis bovina- **BAPA**, tarjeta o CF (tenga en cuenta las reglamentaciones de transporte interestatal)
- 3) leptospirosis bovina- Lepto 5 serovar
  - L. pomona, L. hardjo, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. grippotyphosa
- 4) aislamiento del virus de BVD, AG-ELISA o PCR
  - Para VI: < análisis de sangre entera con 6 meses de anterioridad, > suero o sangre entera con 6 meses de uso

#### Prueba de aislamiento

##### Semana 1:

- 1) Tricomoniasis- material prepucial
- 2) Campilobacteriosis- material prepucial

##### Semana 2:

- 1) Tricomoniasis- material prepucial \*
- 2) Campilobacteriosis- material prepucial \*

##### Semana 3:

- 1) Tricomoniasis- material prepucial \*
- 2) Campilobacteriosis- material prepucial \*

##### Semana 4:

- 1) Tricomoniasis- material prepucial \*\*
- 2) Campilobacteriosis- material prepucial \*\*
- 3) BVD – SN (tipo I y II), **PCR en semen congelado procesado**



Semana 5:

- 1) Tricomoniasis- material prepucial \*\*
- 2) Campilobacteriosis- material prepucial \*\*

Semana 6:

- 1) Tricomoniasis- material prepucial \*\*
- 2) Campilobacteriosis- material prepucial \*\*
- 3) Brucelosis bovina – **BAPA**, tarjeta
- 4) Brucelosis bovina – CF
- 5) Leptospirosis bovina – Lepto 5 serovar (los mismos cinco que previo al ingreso)
- 6) Aislamiento del virus de DVB, PCR (sangre entera)

Semana 9:

- 1) Tuberculosis – intradérmica (debe ser 60 días posteriores a la prueba intradérmica previa al ingreso)

NOTA:

\* Si el toro tiene más de 180 días de edad

\*\* Si el toro tiene más de 364 días de edad

- Las pruebas que aparecen en **negrita** son las pruebas preferidas para esta enfermedad; las otras que se enumeran también son opciones admisibles.
- Consulte los requisitos mínimos de CSS para conocer el protocolo adecuado cuando se adquieren resultados positivos.