

Identificación de La Microbiota Seminal en Equinos y su Impacto Sobre la Calidad  
Espermática.

Sandra Bautista Jaimes

Trabajo de Grado para Optar el título de Zootecnista

Directora

Shirley Andrea Flórez Rodríguez

PhD. Reproducción animal

Codirectora

Angélica Marcela Correa Sandoval

Microbióloga

Universidad Industrial De Santander

Instituto De Proyección Regional Y Educación A Distancia IPRED

Programa de Zootecnia

Málaga

2019

***Dedicatoria***

*Este trabajo lo dedico a Dios y a la Santísima Virgen María, a mis padres, a mis hermanos y a mi sobrino. Los cuales fueron el pilar fundamental para mi vida profesional.*

### **Agradecimientos**

Papito Dios en primer lugar te doy gracias porque permitiste que llevara a término este proyecto el cual fue fundamental y dejo grandes enseñanzas para mi vida y carrera profesional; así mismo ofrezco mi gratitud a mis padres, hermanos ,sobrino y a toda mi familia que me apoyaron en este proceso, A mi directora, que confió en mis capacidades, brindándome su confianza, su tiempo y su conocimiento para la ejecución del presente trabajo, así mismo a la profesora Angélica docente de microbiología de la universidad y al doctora Margarita, las cuales estuvieron atentas a cualquier inquietud dándome siempre una instrucción y/o enseñanza las cuales daban solución a todos aquellos interrogantes que se me presentaron; De igual manera extendiendo mi brazo de gratitud al Criadero La Comarca, a su propietario y trabajadores que en su momento estuvieron prestos ayudarme con el préstamo de los animales y la toma de muestras, así mismo a los propietarios de los animales que se encontraban en las fincas de la parte alta de Málaga, por haber aceptado la propuesta de colaborar con los equinos para la recogida de las muestras, por su tiempo y por la credibilidad que tuvieron en mis capacidades. Al profe Carlos Estupiñan por su amistad y por presentarme al criadero la comarca y por sembrar en mi esa pasión por los equinos. A la Universidad Industrial De Santander sede Málaga y a su equipo de trabajo, docentes y administrativos por concederme los espacios, equipos y algunos materiales para la toma de las muestras y el crecimiento de los cultivos.

A los docentes que, en mi proceso de formación, me dejaron grandes enseñanzas que Dios los bendiga y los multiplique todos sus conocimientos para que sigan formando jóvenes hacia el futuro. Y Finalmente termino mi gratitud, a mis amigos, compañeros y comerciantes ganaderos de

la región que de una u otra manera me apoyaron y aportaron en este proceso de formación profesional.

Que Dios y la Virgencita, me los guarde siempre. Amén.

## Tabla de Contenido

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| Introducción.....                                            | 15 |
| 1. Objetivos.....                                            | 19 |
| 1.1 Objetivo General .....                                   | 19 |
| 1.2 Objetivos Específicos .....                              | 19 |
| 2. Marco referencial .....                                   | 20 |
| 2.1 El caballo criollo colombiano .....                      | 20 |
| 2.2 Sistema de producción equina .....                       | 20 |
| 2.3 Características seminales en equinos .....               | 23 |
| 2.4 Colecta de semen.....                                    | 24 |
| 2.5 Técnicas de análisis seminal .....                       | 26 |
| 2.6 Aspectos microbiológicos del semen .....                 | 30 |
| 2.7 Bacterias del semen .....                                | 32 |
| 2.8 Relación de la microbiota y calidad seminal .....        | 34 |
| 2.9 Técnicas para el análisis microbiológico del semen ..... | 35 |
| 2.10 Antibiógramas .....                                     | 41 |
| 2.11 Hongos.....                                             | 42 |
| 2.12 Filamentosos .....                                      | 43 |
| 2.13 Levaduras:.....                                         | 43 |

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 2.14 Observación macroscópica y microscópica ..... | 44 |
| 2.15 Mohos y levaduras presentes en el semen ..... | 44 |
| 2.16 Flora microbiana presentes en yeguas .....    | 47 |
| 3.Marco conceptual.....                            | 48 |
| 4. Marco legal .....                               | 50 |
| 5. Materiales y Métodos .....                      | 52 |
| 5.1 Ubicación.....                                 | 52 |
| 5.2 Animales .....                                 | 53 |
| 5.3 Colección de semen.....                        | 54 |
| 5.4 Preparación del semental .....                 | 55 |
| 5.5 Preparación de la Vagina Artificial.....       | 56 |
| 5.6 Colecta de semen.....                          | 57 |
| 5.7 Evaluación Semen .....                         | 59 |
| 5.8 Análisis microbiológico.....                   | 62 |
| 5.9 Siembra... ..                                  | 63 |
| 5.10 Conteo unidades formadoras de colonias .....  | 65 |
| 5.11 Morfología bacterias.....                     | 66 |
| 5.12 Aislamiento en medios selectivos .....        | 67 |
| 5.13 Metabolismo microbiano .....                  | 69 |
| 5.14 Antibiograma .....                            | 71 |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.15 Morfología fúngica.....                                       | 72  |
| 5.16 Análisis estadístico .....                                    | 73  |
| 6. Resultados.....                                                 | 74  |
| 6.1 Resultados de las características espermáticas del semen ..... | 74  |
| 6.2 Unidades formadoras de colonias (UFC). .....                   | 76  |
| 6.3 Morfología bacteriana .....                                    | 77  |
| 6.4 Cultivo de bacterias .....                                     | 78  |
| 6.5 Agar MacConkey. ....                                           | 79  |
| 6.6 Antibiógramas .....                                            | 79  |
| 6.7 Mohos y levaduras .....                                        | 80  |
| 7. Discusión .....                                                 | 81  |
| 8. Conclusiones .....                                              | 93  |
| 9. Recomendaciones.....                                            | 94  |
| Referencias Bibliograficas.....                                    | 96  |
| Apéndices .....                                                    | 107 |

### Lista de Tablas

|                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Características del semen equino referenciado por diferentes autores .....                                                                                                        | 23 |
| Tabla 2. Características bioquímicas de bacterias .....                                                                                                                                    | 40 |
| Tabla 3. Resultados de la fermentación de carbohidratos para algunas bacterias .....                                                                                                       | 41 |
| Tabla 4 .Cantidad de animales usados cada grupo para el experimento .....                                                                                                                  | 53 |
| Tabla 5. Medios de cultivo usados en el experimento .....                                                                                                                                  | 63 |
| Tabla 6. Descripción del procedimiento para las pruebas bioquímicas .....                                                                                                                  | 69 |
| Tabla 7 .Descripción de los antibióticos usados para el antibiograma .....                                                                                                                 | 71 |
| Tabla 8. Descripción de las características espermáticas de Caballos Criollos Colombiano(Media y Error Estándar).....                                                                      | 74 |
| Tabla 9. Medias $\pm$ error estándar de las características espermáticas del semen in natura de equinos estabulados y no estabuladoso estabulados. ....                                    | 75 |
| Tabla 10. Medias $\pm$ error estándar del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de Bacterias y Hongos presentes en semen in natura de equinos estabulados y no estabulados. .... | 76 |
| Tabla 11. Correlación entre cantidad de colonias bacterianas y características espermáticas .....                                                                                          | 77 |
| Tabla 12. Frecuencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en semen in natura de equinos estabulados y no estabulados, cultivadas en Agar Nutritivo.....                  | 78 |
| Tabla 13. Frecuencia de la flora Gram negativa y Gram positiva presente en siete muestras de semen equino, cultivadas en medio cromogenico (CHROMagar ORIENTATION) .....                   | 78 |
| Tabla 14. Flora Gram negativa y Gram positiva presente en muestras de semen de cada equino cultivadas en medio cromogenico (CHROMagar ORIENTATION). ....                                   | 78 |



|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 15. Frecuencia de bacterias aisladas presentes en siete muestras de semen equino, cultivadas en Agar MacCONKEY medio selectivo y diferencial. .... | 79 |
| Tabla 16 .Resultado de antibiograma para las bacterias aisladas en Agar MacCONKEY .....                                                                  | 80 |
| Tabla 17. Resultados generales de sensibilidad que cada bacteria presento frente a cada antibiótico dado en porcentaje. ....                             | 80 |

### Lista de Figuras

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.Limpieza y cepillado de la hembra.....                          | 55 |
| Figura 2. Vendaje de los pelos de la cola .....                          | 55 |
| Figura 3Estimulación del semental .....                                  | 56 |
| Figura 4Limpieza de pene y prepucio del macho .....                      | 56 |
| Figura 5Vagina artificial equina modelo MISSOURI.....                    | 57 |
| Figura 6.Lubricación de la vagina artificial .....                       | 57 |
| Figura 7.Colecta de semen equino .....                                   | 58 |
| Figura 8 Eyaculado del caballo dentro de bolsa colectora.....            | 58 |
| Figura 9.Observación microscópica de espermatozoides .....               | 60 |
| Figura 10 Observación microscópica de espermatozoides .....              | 61 |
| Figura 11Espermatozoides de equino, teñidos con Eosina-Nigrosina .....   | 61 |
| Figura 12Defecto de cola enrollada en el espermatozoid .....             | 61 |
| Figura 13Siembra de semen en Agar Nutritivo.....                         | 64 |
| Figura 14Siembra en CHROMagar ORIENTATION con asa de alambre .....       | 65 |
| Figura 15Crecimiento colonias bacterianas en CHROMagar Orientation ..... | 65 |
| Figura 16Bacilos Gramnegativos .....                                     | 67 |
| Figura 17Cadenas de Bacilos Grampositivos .....                          | 67 |
| Figura 18Crecimiento bacteriano en Agar MacCONKEY .....                  | 68 |
| Figura 19Crecimiento Escherichia Coli en Agar MacCONKEY.....             | 68 |
| Figura 20Citrato Azul, positivo y Citrato verde, negativo .....          | 70 |
| Figura 21TSI, K/A: Roja y Amarilla-A/A: Amarillo-K/K:Rojo.....           | 70 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 22 Medio SIM positivo a Indol .....                                 | 71 |
| Figura 23 <i>Aspergillus fumigatus</i> macroscópicos y microscópicos ..... | 72 |
| Figura 24 <i>Penicillium</i> sp macroscópico y microscópicos.....          | 73 |
| Figura 25 Morfología macroscópica y microscópica de levadura sp .....      | 73 |

## Lista de Apéndices

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| Apéndice A Evaluación de morfología espermática .....      | 107 |
| Apéndice B Morfología microscópica de bacterias .....      | 108 |
| Apéndice C Morfología de hongos .....                      | 109 |
| Apéndice D Tablas de sensibilidad a los antibióticos ..... | 110 |

**RESUMEN**

**TÍTULO:** IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA SEMINAL EN EQUINOS Y SU IMPACTO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

**AUTOR:** SANDRA BAUTISTA JAIMES\*\*

**PALABRAS CLAVES:** CÉLULAS ESPERMÁTICAS, FERTILIDAD, MICROBIOTA

**DESCRIPCIÓN:**

El semen de equinos fértiles puede contener microorganismos comensales y potencialmente patógenos provenientes del tracto reproductivo y urinario del macho o de la hembra cuando se someten a monta natural o del ambiente y estos liberan toxinas microbianas y causan estrés oxidativo en las células espermáticas, afectando la viabilidad y calidad del semen, provocando infertilidad en yeguas. Bacterias presentes en el eyaculado afectan directamente la fertilidad de los equinos (Morrell & Wallgren, 2014), pero no se conoce cuáles microorganismos están presentes en cada individuo de acuerdo a su ambiente, ni cuál es el antibiótico que mejor controla el crecimiento de dichos microorganismos. El objetivo de este estudio fue identificar la microbiota del semen en Caballos Criollos Colombianos en dos ambientes diferentes (estabulados y no estabulados) y evaluar el efecto sobre la calidad seminal, así como la susceptibilidad de estas bacterias a antibióticos. Las colectas de semen fueron realizadas en criaderos del municipio de Málaga – Santander; fueron utilizados 7 Caballos Criollos Colombianos. Se evaluó la calidad seminal mediante evaluación macroscópica, microscópica y determinación de la viabilidad espermática; para el análisis de la microbiota seminal las muestras fueron sometidas a cultivos microbiológicos para la determinación de coliformes totales y fecales (UFC), caracterización de patógenos a través de pruebas bioquímicas y sensibilidad a algunos antibióticos. Fue realizada una estadística descriptiva, determinación del grado de asociación entre la microbiota y calidad seminal y el efecto del ambiente fue evaluado por el test de Mann-Whitney, usando el programa estadístico R® (R. versión 3.4.2).

---

\*Trabajo de grado

\*\*Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. IPRED. Programa de Zootecnia.. Directora Shirley Andrea Flórez Rodríguez. PhD. Reproducción Animal.

**ABSTRAC**

**TITULO:** IDENTIFICATION OF THE SEMINAL MICROBIOTE IN HORSE AND ITS IMPACT ON SPERM QUALITY

**AUTOR:** SANDRA BAUTISTA JAIMES\*\*

**PALABRAS CLAVES:** SPERM CELLS,FERTILITY,MICROBIOTA.

**DESCRIPCIÓN:**

The semen of equine fertile can contain microorganisms retainers and potentially pathogenic from the reproductive and urinary tract, or of the environment, these liberate microbial toxins and cause stress oxidativo in the spermatic cells, affecting the viability and quality of the semen, provoking un fertility in mares. Present bacteria in the ejaculated one affect directly the fertility of the equine ones (Morrell and Wallgren, 2014), but there is known neither which microorganisms are present in every individual of agreement to his environment, nor which is the antibiotic that better controls the growth of the above mentioned microorganisms. The aim of this study was to identify the microbiota of the semen in Creole Colombian Horses in two different environments (estabulados and not estabulados) and to evaluate the effect on the seminal quality, as well as the susceptibility of these bacteria to antibiotics. The collections of semen were realized in breeding-places of the municipality of Malaga - Santander; there were used 7 Creole Colombian Horses. The seminal quality was evaluated by means of macroscopic, microscopic evaluation and determination of the spermatic viability; for the analysis of the seminal microbiota the samples were submitted to microbiological cultures for the determination of coliformes total and fecal (UFC), characterization of pathogenic across biochemical tests and sensibility to some antibiotics. A descriptive statistics was realized, determination of the degree of association between the microbiota and seminal quality and the effect of the environment was evaluated by Mann-Withney's test, using the statistical program R (R. version 3.4.2).

---

\*Bachelor Thesis

\*\* Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. IPRED. Programa de Zootecnia.. Directora Shirley Andrea Flórez Rodríguez. PhD. Reproducción Animal.

## Introducción

La especie equina ha ganado gran importancia, tanto a nivel nacional como internacional, debido a su amplia participación en el trabajo, actividades deportivas como ejemplar de coleo, carreras o tiro y de exposición de acuerdo a los diferentes andares como lo es el paso fino colombiano, trote la trocha y el galope. La población actual de estos ejemplares en nuestro país es reportada por Instituto Agropecuario (ICA, 2017), cuenta con una población de 1.446.664 incluyendo las mulas y asnos, para el departamento de Santander el censo de esta especie es de 57.767 animales divididos en las cinco provincias incluida la provincia de García Rovira en donde en los últimos años se ha incentivado la tenencia de estos ejemplares para diversas actividades.

A pesar del crecimiento de este sistema de producción, uno de los problemas que enfrenta la especie es en relación a su evolución, es que su selección fue direccionada hacia el mejoramiento genético de caracteres como el andar, la velocidad, la belleza y los atributos deportivos de cada individuo, desmejorando la capacidad reproductiva y ocasionando problemas de infertilidad.

La fertilidad es uno de los parámetros de mayor importancia, siendo influenciada por varios factores, tanto por condiciones del tracto uterino, como la calidad del semen. En las hembras se presenta comúnmente problemas de endometritis pos-inseminación (Troedsson & lui, 2008), que es provocada por diferentes contaminantes, tales como el semen, bacterias, diluyente y detritos introducidos durante la monta (Casuey et al., 2008). Además, se estima que un 50% de los problemas de infertilidad son atribuidos al macho (Morales et al, 2007).

La mayoría de las investigaciones en reproducción animal, se han basado en solventar los problemas reproductivos de las hembras, dándole menor importancia a los posibles problemas que

el macho puede aportar en la falla de la reproducción. Es por esta razón que se debe tener en cuenta la evaluación del garañón independiente de la modalidad de reproducción (Agüero G. , 2012).

Durante la vida reproductiva de un semental debe ser evaluada la calidad seminal de manera rutinaria; con el fin de conocer la valoración de parámetros seminales cuantitativos como el volumen del eyaculado, concentración espermática y el número total de espermatozoides y factores cualitativos como el movimiento y la morfología espermática.

La calidad del semen de equinos es reducida principalmente por los problemas de estrés oxidativo, según Aitken et al (2012). La presencia de leucocitos, bacterias comensales y patógenas presentes en el semen, proporcionan catabolitos tóxicos que provocan problemas de apoptosis, peroxidación lipídica, daños al acrosoma y alteración de la morfología celular. Las bacterias presentes en el semen equino disminuyen la viabilidad de los espermatozoides a través de esos mecanismos (Pérez et al, 2017).

La adición de antibióticos a los diluyentes para semen refrigerado y congelado son indispensables, tanto para reducir la contaminación de ciertos microorganismos presentes en el semen, como para controlar la respuesta inflamatoria uterina post-inseminación. No obstante, se conoce que algunos antibióticos pueden ser tóxicos para los espermatozoides (Morrell & Wallgren, 2014).

Igualmente, la caracterización de la microbiota de individuos de la raza Criollo Colombiano permite mejorar la eficiencia de las biotecnologías reproductivas donde el uso de diluyentes con antibióticos específicos para combatir la flora bacteriana y fúngica presente es de vital importancia.



## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Describir la microbiota presente en el semen de caballos Criollo Colombiano y su relación con la calidad seminal, en equinos estabulados y no estabulados en el municipio de Málaga-Santander.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros de calidad seminal macroscópicos y microscópicos de equinos criollos colombiano estabulados y no estabulados.
- Identificar y cuantificar la microbiota presente en el semen de equinos usados en el presente estudio.
- Determinar la sensibilidad *in vitro* de bacterias aisladas del semen equino frente a diferentes antibióticos.
- Conocer el impacto de la microbiota seminal sobre la calidad espermática en animales estabulados y no estabulados.
- Identificar la relación de los factores ambientales sobre la calidad microbiológica del semen.

## **2. Marco Referencial**

### **2.1 El Caballo Criollo Colombiano**

Esta raza pertenece a la clasificación taxonómica del caballo domestico conocido en todo el mundo la cual se puede describir a si: Clase: *Mammalia*, Orden: *Perissodactyla*, Familia: *Equidae*, genero *Eqqus*, por lo cual su nombre científico: *Equus caballus* (Elorza, 2012).

Son equinos autóctonos descendientes de los caballos traídos por los españoles, son la raza más importante en nuestro país y es utilizada principalmente como animales de campo y de exhibición por sus vistosos y particulares pasos, que lo hacen poseedor de características propias debido al mejoramiento de su fenotipo (Castillo et al, 2016).

Para Federación Nacional De Equinos FEDEQUINAS, el Caballo Criollo Colombiano está dotado de sensibilidad, fuerza, brío, velocidad y suavidad; es un ejemplar de un fenotipo único, hermoso elegante, noble, con movimientos bien definidos, acentuados, sonoros y alegres. Lo que lo han posesionado a nivel mundial como un ejemplar suave y de gran calidad.

Por lo anteriormente expuesto se considera uno de los recursos genéticos más valiosos del país siendo una especie de mayor importancia productiva lo que lo ha llevado a ocupar un importante renglón en la economía nacional e internacional. Él uso del caballo genera empleo y moviliza diversos sectores económicos.

### **2.2 Sistema de Producción Equina**

El ganado equino existe gran variedad de sistemas productivos desde los más extensivos como son las explotaciones de caballos de abasto, hasta los intensivos en donde manejan criaderos de ganado para la silla y el deporte. La diferencia de otras producciones es que el fin último que persiguen no es la producción de unos determinados bienes de consumo como lo es la leche, huevos, y carne si no la producción de una serie de animales destinados la producción de servicios como lo es el ocio, el trabajo, el deporte entre otros como el transporte (Aceros, s.f).

Durante milenios, el caballo ha tenido una relación fuerte con el hombre, los pequeños productores usan los caballos, asnos y mulas para el trabajo en finca, presentaciones en ferias y participaciones en exposiciones; los medianos y grandes productores o criadores de équidos crían sus animales para ser usados en ferias, exposiciones, cabalgatas y eventos deportivos.

La publicación de Riaño (2018) afirma que en Colombia tiene 48.000 criaderos, empresas pecuarias que generan empleo a miles de colombianos y demandan productos y servicios de la economía formal a si mismo del sector viven 130.000 personas. El ICA (2017) reporta que nuestro país cuenta con 1.446.664 de ejemplares entre caballos, asno y mulas, de los cuales 57.797 se encuentran en el departamento de Santander, y en donde el municipio de Málaga se hace participe con una población de 238 ejemplares.

Radio SANTA FE, publica en su portal que la cadena productiva implica tres dimensiones, la primera es su relación con la producción de forrajes, henos y otros productos usados en la alimentación equina, la segunda corresponde a los espectáculos ya que por lo menos dos veces por semana se realizan exposiciones en cualquiera de su grados las cuales mueven la economía local de los municipios donde se organizan, de igual manera han propendido a conservar el patrimonio cultural del país, y a la creación de empresas que generan una demanda de productos y servicios.

En tercer lugar, deriva la compra y venta de equinos, así mismo la genética con la venta de saltos, pajillas y embriones que a su vez demanda trabajo a profesionales en el sector.

Para el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MinAgricultura, 2014), Colombia no es un país potencialmente exportador porque aún no cumple satisfactoriamente con los requisitos sanitarios solicitados por países con alto estatus sanitario por lo que se requiere apoyo de las autoridades sanitarias y gubernamentales para lograr oficializar el estatus sanitario del sector. Caso contrario ocurre con las importaciones que muestran mayores movimientos ya que Colombia ha sido escenario de importantes eventos ecuestres, ferias internacionales y también porque los productores, con el objetivo de mejorar las razas y los movimientos importan Caballos de alta calidad genética.

En el departamento de Santander se ha venido fortaleciendo la producción y la comercialización de equinos, pues se cuenta con buenos ejemplares de silla los cuales han tenido buenos reconocimientos en las diferentes ferias nacionales en las que participan, por otra parte en Santander se cuenta con planta de beneficio de equinos autorizada por el INVIMA en donde recibe animales sanos de diferentes partes para el sacrificio y faenado y sitios acreditados para expendio de carne y comercialización de subproductos del sacrificio.

En Málaga ha crecido la producción equina, pues en las diferentes fincas existe uno o dos caballos para el trabajo, transporte o la recreación de sus habitantes, asimismo, este municipio cuenta con tres criaderos los cuales tienen ejemplares de alta calidad genética para la exposición, la venta de pie de cría y comercialización de semen. Cada año se organiza un festival en donde se muestran los mejores ejemplares Criollos Colombianos en sus diferentes andares los cuales compiten con caballos de otras regiones por los mejores lugares.

### 2.3 Características Seminales en Equinos

El semen es una combinación de fluidos seminales y células espermáticas, provenientes de las vías genitales excretoras, glándulas accesorias y de los testículos; en donde estos dan origen a la parte celular, mientras que las glándulas secretan la parte líquida es decir el plasma, el cual sirve como estimulante, vehículo y diluyente del espermatozoide, proporcionándoles energía y protección para asegurar su sobrevivencia (HAFEZ, 1996).

La producción de semen de los garañones no tiene influencia del fotoperiodo y se puede colectar semen durante todo el año, sin embargo, hay notables variaciones en cuanto al número de montas por eyaculado, volumen, número total de espermatozoides y motilidad. (Serrano, 2011).

Para la obtención de muestras seminales equinas, con características homogéneas y con concentraciones espermáticas similares, es necesario en primera medida realizar un agotamiento de las reservas seminales extra gonadales mediante colectas, recelos o servicios (Rozo, 2014). Realizando como mínimo 3 colectas repetidas, de esta manera, eliminamos semen viejo que puede tener alteraciones en la calidad espermática.

En la tabla número 1 se referencias varios autores que obtuvieron datos sobre las características reproductivas de los Caballos Criollos Colombianos.

Tabla 1  
*Características del semen equino referenciado por diferentes autores*

| AUTOR                  | VOL <sup>1</sup> | MT <sup>2</sup> | MP <sup>3</sup> | VAP <sup>4</sup> | MN <sup>5</sup> | HOS <sup>6</sup> | VE <sup>7</sup> |
|------------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| (Restrepo U. M., 2014) | 79±14.5          | 79,5±1<br>6.0   | 37,1±2<br>1,3   | 45,3±11,<br>8    | 83,0±6,<br>6    | 80,2±7,<br>9     | 79,7±1<br>6,0   |
| (Pizarro et al, 2013)  | NR <sup>8</sup>  | NR              | 77,5±1<br>0,6   | NR               | 83,6±5,<br>78   | 70,4±1<br>5,5    | 79,9±1<br>5,5   |

|                         |                |               |               |                |               |    |               |
|-------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|----|---------------|
| (Buzón,<br>2013)        | 65,74±3,<br>52 | 93,7±0,<br>99 | 75,9±1,<br>49 | 84,9±0,4<br>1b | 72,6±2,<br>14 | NR | NR            |
| (Quinte<br>ro,<br>2014) | 36,4±13,<br>8  | 73±5,3        | 68±5,3        | NR             | 71,2±4,<br>3  | NR | 71,2±4,<br>18 |
| (Mesa,<br>2010)         | 70.4±28.<br>0  | 71.2±1<br>1,2 | NR            | NR             | 67,78         | NR | 73,3±6        |

<sup>1</sup>VOL: Volumen, <sup>2</sup>MT: Motilidad total, <sup>3</sup>MP: Motilidad progresiva, <sup>4</sup>VAP: Velocidad media, <sup>5</sup>MN: Morfología normal, <sup>6</sup>HOS: Integridad de la membrana, <sup>7</sup>VE; Vitalidad espermática, <sup>8</sup>NR: No reporta.

## 2.4 Colecta de Semen

La mayoría de sementales pueden ser entrenados para eyacular en una vagina artificial, pero en algunos se debe emplear otros métodos alternativos como el uso de preservativos, colectores cervicales, electro eyaculación entre otros como la masturbación (Dalmau, s,f).

La correcta selección de V.A, es fundamental en el proceso de recolección como evaluación del semen, ya que proporciona unos resultados más satisfactorios y permite la obtención de muestras menos contaminadas. El modelo Missouri se encuentra altamente difundido por ser muy accesible económicamente, es muy liviana, fácil de manejar y fácil de limpiar; está constituida por un forro doble de látex termosellado cuya función es formar una cámara donde se introduce agua a una temperatura de 40 a 42°C y aire y se sella con una válvula (Dalmau, s,f). En el extremo de vagina se coloca una bolsa de goma de forma que se pueda ejercer presión sobre el glándulo del pene, ya que esta y la temperatura del agua son los dos factores principales que determinan la eyaculación (Ruiz, 1997).

La disponibilidad del espacio es muy importante para la recolección de la muestra seminal esta debe ser una zona de un área espaciosa, libre de obstáculos, limpia, libre de cualquier distracción para el caballo de pisos antideslizantes. Debe ser un lugar seguro para el semental, la yegua (si se usa), como también para la persona que lleva la vagina artificial y la que conduce al garañón. Así

mimo el lugar debe ser tranquilo para que los animales se habitúen a la donación de semen y cerca al laboratorio para que el análisis espermático sea lo más inmediato posible (Valencia, Garcia, & Gispert, s.f).

El esperma en caballos puede ser recogido mientras esta monta sobre una yegua en celo natural o inducido o sobre un potro o maniquí. No obstante, la elección entre uno u otro soporte depende frecuentemente del semental. Si se usa una hembra esta debe ser de buen carácter, dócil y tolerante a los comportamientos del semental como relinchos reiterados, mordiscos y manotazos. Asimismo, se deben tener características como la alzada, la condición corporal y la manifestación evidente o intensa del celo. Es necesario prepararla para la recogida protegiendo la cola con un vendaje para disminuir la contaminación y se lava la zona perineal con jabón neutro y soluciones antisépticas ya que en esta zona contacta el pene durante la monta (Dorado et al., 2008).

Antes de llevar al semental a las áreas de monta se recomienda hacer un examen físico general para determinar su capacidad reproductiva; en esta observación se tienen en cuenta el aspecto, pelaje, estado de carnes y otras características como el estado de salud, aplomos, entre otros como los defectos testiculares que son muy importantes ya que el tamaño del testículo afecta la producción y liberación de espermatozoides. Posteriormente se debe cepillar el pelo y los cascos y llevarlo a un área donde se lavará el pene, los testículos y la parte media de los miembros posteriores con agua tibia, lo ideal es que el pene este erecto para poderlo lavar, esta erección ocurre naturalmente en sementales ya experimentados antes de la monta o, otros requieren del proceso de recelo a una hembra (Boeta, Diaz, & Hayen, s.f.).

Para lavar el pene se coloca al semental junto a una pared y en contacto visual con la yegua (Dorado et al., 2008). Con el uso de guantes de látex se toma una esponja suave o mota de algodón y se limpia suavemente haciendo movimientos circulares eliminando todo el esmegma, la suciedad

o cualquier otro material extraño que se haya acumulado; en la uretra inserte el dedo meñique en busca de un bulto duro, sácalo lentamente de la punta del pene del caballo; así mismo presta atención a cualquier anormalidad. No se recomienda el uso de jabones antisépticos por que destruyen las bacterias beneficiosas que residen dentro del prepucio y sobre el pene, dichas bacterias viven en armonía y desempeñan un papel directo en la prevención del exceso de crecimiento de bacterias patógenas que producen infecciones (Loving, 2006).

## **2.5 Técnicas de Análisis Seminal**

La evaluación del eyaculado tras su extracción en vivo o post-mórtem es fundamental para conseguir unos niveles de fertilidad aceptables (Posado, Bartolome, & Gonsalvez, s.f). Como es conocido los espermatozoides de esta especie son extremadamente sensibles a alteraciones celulares generadas por diversos factores (Pizarro, Restrepo, Echeverry, & Rojano, 2013). El desarrollo de biotecnologías para la reproducción permite una máxima distribución, evaluación y una adecuada disponibilidad de material germinal de ejemplares de interés mediante su conservación a largo plazo lo cual favorece el mejoramiento genético de la especie (Loomis&Graham, 2018).

El espermiograma clásico permite realizar una primera evaluación eficaz de la calidad espermática prediciendo a su vez el potencial de fertilidad e infertilidad y sus posibles causas. Para ello incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática (Cuevas, 2013).

Con el fin de predecir la fertilidad potencial del semen equino, el análisis de rutina es basado en la evaluación macroscópica o física del eyaculado y en la evaluación por microscopia de los



espermatozoides (Betancur, Úsuga, & Rojano, 2013). Este incluye la determinación de aspectos como el volumen del semen, el pH, el color, la motilidad total, motilidad progresiva, vigor espermático, concentración espermática, y morfología espermática; el semen debe ser evaluado teniendo en cuenta el número de espermatozoides por mililitro de semen, dicha evaluación tiene un tiempo de duración de más o menos cinco minutos a una temperatura de 38 °C (Wernli, 2010).

**2.5.1 Evaluaciones macroscópicas.** Deben realizarse durante las primeras horas después de su recolección o inmediatamente para analizar por medio de la observación.

🕒 **Volumen :**El eyaculado de los equinos está integrado por una masa de volumen considerable que varía entre 50 y 300 ml y está integrado por tres ondas eyaculatorias que en tiempos distintos se vierten en el colector (Díaz, 2010), estas provienen de los testículos, las vías de conducción y de las secreciones de las glándulas accesorias (López, s.f); la primera procede de la próstata, es rica en electrolitos y de efectos espermio-estimulantes, la segunda procede de las ampollas de Henle y contiene espermatozoides y la tercera procede de las vesículas seminales, que proporcionan la mayor parte del eyaculado y desde el punto de vista biológico representa un medio de tamponización y de protección a los espermatozoides.

El volumen habitualmente se determina en recipientes calibrados en mililitros (ml), los équidos en condiciones normales presentan un gran volumen eyaculado, pero si bien estos pueden variar en función de la estacionalidad, edad del semental, frecuencia de recogida, así como las diferencias entre sementales (Dorado et al., 2013).

🕒 **Color:** El semen tiene una apariencia homogénea el color varía entre blanco y gris claro y ocasionalmente amarilloso si el animal consume ciertas vitaminas; un color rosado o rojo sugiere la presencia de sangre (hematospermia) (Montoya, 2009); así mismo, puede dar una indicación de la concentración espermática, si el eyaculado frecuentemente es blanco amarillento representa una concentración entre 250 y 500 millones de células espermáticas por ml.

🕒 **pH :** Hasta la fecha existen diversas apreciaciones sobre el pH del eyaculado en las diferentes especies animales, variando desde el ligeramente ácido al ligeramente básico (Cuevas A. B., 2013). Este debe ser determinado inmediatamente después de la recolección, ya que el metabolismo espermático produce una disminución de este a medida que pasa el tiempo (Leixelard, 2005). La evaluación se hace con ayuda de las cintas de pH o un pHmetro, en el equino esta entre 7.0 a 7.6; sin embargo el metabolismo espermático acidifica el medio y la presencia de sustancias contaminantes como la orina y procesos inflamatorios le dan valores más altos (Sánchez, Martinez, & Gonzalez, 2013).

**2.5.2 Evaluaciones microscópicas.** Se debe tener en cuenta con anterioridad las condiciones de temperatura precisas con el fin de asemejar las condiciones fisiológicas, este tipo de evaluaciones me permiten observar.

🕒 **Motilidad:** La Universidad Nacional de Colombia (UNC, 2017) explica varios aspectos esenciales de un correcto metabolismo espermático, si el semen está expuesto a bajas temperaturas, vidrios contaminados o mal manejo, la motilidad disminuye rápidamente, en cambio eyaculaciones repetidas la motilidad tiende a hacer más alta en animales que llevan mucho tiempo sin servir. Usualmente la motilidad total y la motilidad progresiva son calculadas en porcentaje y su

evaluación dura entre más o menos cinco minutos y los materiales usados al igual que el semen debe estar a 37°C (Amann & Pickett., 1987).

🕒 **Vigor:** Es la velocidad con la que los espermatozoides atraviesan el campo visual; la escala que se utiliza es de 0 a 4, evaluando 0 a los espermatozoides inmóviles y 4 a los que avanzan rápidamente (Gomez y Migliorisi., s.f)

🕒 **Concentración espermática:** Uno de los parámetros más importantes en la evaluación de fertilidad; tradicionalmente el recuento de espermatozoides se realiza utilizando la cámara de Neubauer método recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Cardona, Cadavid., & Berdugo, 2007). Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensión bajo el microscopio, Esta tiene el tamaño de un portaobjetos y está fabricada en vidrio óptico, en el fondo de la cámara están grabadas dos cuadrículas de recuento separadas una de la otra, el campo central es de 0.1 mm. la cuadrícula de recuento muestra nueve cuadros grandes, cada uno de 1mm<sup>2</sup>, el cuadrado central está dividido en 25 cuadrados medianos con aristas de 0.2mm estando cada cuadrado mediano subdividido en 16 cuadrados pequeños con aristas de 0.05mm y una superficie de 0.0025mm<sup>2</sup>. La concentración está fuertemente influenciada por un mayor número de variables entre ellas el tamaño testicular, la edad o la raza. Su valor medio oscila entre 50 a 150 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, junto con el volumen es fundamental en la estimación del número total de espermatozoides eyaculados, parámetro empleado en la determinación del número de dosis destinadas a inseminación artificial (Cuevas A. B., 2013).

🕒 **Morfología:** Se basa en la relación directa que hay en la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad; los defectos se clasifican en anomalías en la cabeza, en la pieza intermediara, en la cola y según el órgano en donde pueden haberse generado se diferencia en anomalías primarias o secundarias o

defectos mayores y menores (Hidalgo, s.f). Los espermatozoides del equino difieren en algunos aspectos respecto a otras especies domésticas, debido a la unión abaxial de la pieza intermedia, una leve asimetría en la cabeza, un menor volumen acrosomal y el menor tamaño de la cabeza; sin embargo, es importante resaltar que el porcentaje de esta población espermática en el equino es menor respecto a otras especies, reportándose entre un 50 a 60% de normalidad en la mayoría de estudios realizados (Restrepo, Úsuga, & Rojano., 2013).

🔗 **Vitalidad:** El test Eosina o de Williams Pollack, calcula el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos de una gota de semen la cual es mezclada con una gota del colorante con eosina al 0.5% en una lámina portaobjetos en donde se hace un extendido de la mezcla y se deja reposando durante 30 minutos, y se procede a contar 100 espermatozoides en un microscopio a 100x (Rodrigo, 2016). Los espermatozoides vivos conservaron su membrana intacta porque no absorbieron el colorante, en tanto los muertos absorbieron el color (Balitán, Blanco, Cabrera, & Hernández, 2015).

## 2.6 Aspectos Microbiológicos del Semen

**2.6.1 Microbiota.** La flora microbiana normal, también denominada microflora o microbiota, se refiere a los diferentes microorganismos que habitan en las superficies internas y externas de los seres vivos convencionalmente sanos; dichos ecosistemas microbianos están conformados por una multitud de bacterias, hongos y protozoarios que se localizan en ambientes específicos como la piel, tracto gastrointestinal, el sistema reproductivo entre otros como el medio ambiente que nos rodea (Gamiño, Barrios, Cardenas, & Anaya, 2005). La principal función de estos organismos es prevenir enfermedades limitando el crecimiento de microorganismos patógeno ya sea por la

producción de moléculas o simplemente por obstaculizar el crecimiento de los patógenos potenciales que intentan colonizar (Reid, 2004).

**2.6.2 Microbiota seminal.** La superficie del pene y el prepucio del semental normalmente es habitada por una variedad de bacterias comensales consideradas la mayoría como patógenas, las alteraciones de la flora normal bacteriana sobre los genitales externos pueden causar el crecimiento excesivo de bacteria oportunistas potencialmente patógenas que pueden causar la infección y la inflamación del tracto reproductivo de la yegua (Spergser & Aurich., 2006). La mayor parte de la contaminación es oriunda del sistema urinario, siendo las infecciones genitourinarias responsables en 15% de los casos de infertilidad en los machos, así mismo pueden ser oriundas cuando se realiza la monta natural o en los procesos de colecta para la inseminación artificial (Fernandes, 2012).

El eyaculado puede ser contaminado por microorganismos localizados en la mucosa del pene y del prepucio, así mismo la contaminación puede ocurrir durante los procesos de manipulación, como las instalaciones, los equipo utilizados, principalmente la mucosa de la vagina artificial, el copo colector, el diluyente, las paletas usadas para el envase del semen, el nitrógeno líquido utilizado en la criopreservación del semen y principalmente el profesional son también puntos crítico para la contaminación de semen.

El semen del semental contiene numerosos tipos de bacterias la mayoría de estudios identifican diferentes especies de gérmenes en el esperma, aunque se han implementado algunas reglas higiénicas que disminuyan la contaminación de semen como lo es el lavado del pene, el uso de vagina artificiales y la utilización de antibióticos (Clément, Vidament, & Guerin, S,f).

Es importante adoptar las medidas higiénicas durante la colecta y el procesamiento del semen, pues siempre habrá la presencia de microorganismos en el eyaculado, siendo un potencial

desfavorable para la conservación del semen y eventualmente en la fertilidad, la esterilidad del semen es inalcanzable, es por esto que muchos se preguntan cómo controlar los microorganismos inespecíficos en el semen y como prevenir cualquier asociación de patógenos (Thibier, 2004).

## 2.7 Bacterias del Semen

Bajo la mayoría de circunstancias las glándulas sexuales accesorias y los testículos deberían estar libres de bacterias, pero cuando se realizan pruebas de laboratorio bacteriológicas de semen se encuentran algunas bacterias, causantes de diversas alteraciones fisiológicas (Blanco, 2002).

**2.7.1 *Acinetobacter spp.*** Las bacterias de este género son bacilos y cocobacilos Gram negativos, fermentan la glucosa y son aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivo y oxidasa negativo, crecen a temperatura óptima de 33 a 35°C (Marcos, S,f). En medio sólido, normalmente forma colonias lisas, convexas, de bordes enteros y de color amarillo pálido, muchas de ellas crecen muy bien en Agar MacConkey produciendo colonias de color rosa. Para Nieves y Salazar (2005) Las especies de este género se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza, siendo el agua y el suelo sus principales nichos ecológicos. se han aislado de numerosos focos y fuentes incluyendo la leche y sus derivados, aves de corral y comida congelada.

**2.7.2 *Escherichia coli.*** Es una bacteria Gram negativa no esporulada, puede ser aerobia o anaerobia facultativa, ha sido relacionada con inflamaciones del tracto genitourinario como la uretritis, cistitis, prostatitis, debido generalmente a la mala higiene del paciente o por la cercanía

del intestino grueso como hábitat natural. Es la bacteria más aislada y frecuente en la eyaculación de los hombres infértiles ya que causa el 60 a 85% de los casos de prostatitis bacteriana crónica que causa daño en el espermatozoide es por esto que se considera como una bacteria uropatogénica (UPEC), Estudios en ratones se ha demostrado que cuando es inoculada al epidídimo induce daño inflamatorio con disminución de la masa testicular y baja concentración espermática (Villegas, Boguen, & Uribe, 2017).

**2.7.3 *Enterococcus spp*:** Son cocos Gram positivos, son catalasa negativa y anaerobios facultativos, y capaces de crecer en condiciones un tanto extremas; hacen parte de la flora normal del tracto gastrointestinal tanto humano como animal y tracto genitourinario femenino humano (Acosta S. , 2005).

**2.7.4 *Pseudomona aeruginosa*:** Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, se encuentra ampliamente distribuida en suelos húmedos, agua, vegetación, humanos y animales. su temperatura optima de crecimiento es de 37°C; es responsable de numerosos casos entre ellos infecciones urinarias (DATABIO, 2016), tales como la epididimitis y la prostatitis, de igual manera está relacionada con la perdida de motilidad espermática, reducción de la fecundación y muerte embrionaria (Conza, Calle, Echevarria, Falcon, & Ceron, 2004).

**2.7.5 *Staphylococcus epidermis*:** El género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, la especie epidermis es integrante de la flora normal de la superficie corporal en donde sobrevive gracias a sus lipasas. sus colonias son generalmente de menor tamaño, de color crema y no presentan pigmentación (V.Seija, s,f). En animales es causante de la

mastitis (Velasco y Yamasaki., 2002). En una evaluación en donde se inyectó esta bacteria a nivel intratesticular en ratones los cuales se sacrificaron tres semanas después a la infección, se observaron cambios en la forma de la cabeza de los espermatozoides, reducción en el acrosoma, y en los testículos se presentó una vacuolización en el epitelio intratubular e hipertrofia de las células de Leydig (Lozano, Velasco, Pacheco, & Peña, 2018).

**2.7.6 *Staphylococcus saprophyticus*:** Es un microorganismo anaerobio facultativo, Posee cuatro biotipos, siendo el biotipo tres el causante de las infecciones primarias del tracto genitourinario tanto del hombre como de la mujer (Alice, Lopez, & Cartín., 1979), además habitan en la flora normal de la piel mucosas; en cerdos y pollos habita en el tracto gastrointestinal.

## **2.8 Relación de la Microbiota y Calidad Seminal**

Una gran variedad de bacterias comensales y potencialmente patógenas, del tracto reproductivo del macho o de la manipulación del eyaculado durante la recolección pueden contaminar el semen de cualquier especie animal, disminuyendo la calidad seminal debido a la competencia entre bacterias y espermatozoides por los nutrientes presentes en el plasma seminal, causando aglutinación de los espermatozoides móviles y la reducción en la capacidad de reacción del acrosoma así como las alteraciones en la morfología celular (Restrepo & Dúque, 2016).

En el semen, algunos microorganismos encontrarían las condiciones óptimas para sobrevivir, ocasionando daños en los espermatozoides, pero después de la eyaculación por algún efecto directo sobre la membrana plasmática espermática o por efectos indirectos inducidos por los factores



solubles producto del metabolismo bacteriano, desencadenando proceso de infertilidad o infecciones en el tracto reproductivo de la hembra. Por lo tanto determinar los efectos que tienen los microorganismos al estar en contacto con el semen, contribuiría a mejorar el diagnóstico de casos de infertilidad donde la única causa aparente son los procesos infecciosos (Suárez et al., 2015).

Agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y protozoos han sido identificados como causales de pérdidas reproductivas, el impacto de esto trae detrimento en la rentabilidad de la producción, ya que las pérdidas pueden presentarse en los distintos estadios del ciclo reproductivo provocando fallas en los procesos de ovulación, mortalidad embrionaria, abortos y fallas en la concepción entre otras (Campero, s.f).

## **2.9 Técnicas Para el análisis Microbiológico del Semen**

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesario para el crecimiento y desarrollo. Estas integran el reino procariota pues tienen estructuras como la membrana celular, núcleo y ribosomas que son los encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico ADN, portador de la información genética (Pirez y Mota., S.f).

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas.

**2.9.1 Medios de cultivo:** Es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos, estos pueden ser naturales sintéticos y semisintéticos de consistencia líquida, sólida y semisólida. Según su composición, a causa de los requerimientos químicos estos pueden ser comunes, enriquecidos, selectivos, diferenciales y de transporte (López y Torres., 2006). En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario incubar por 24 horas para visualizar su crecimiento sobre la superficie, esto permite la formación de colonias aisladas, que es un paso fundamental para la identificación bacteriana (Barrero, s,f). En la actualidad los profesionales tienen la posibilidad de contar con medios de cultivo preparados en placas, tubos, frascos listos para usar, existen también Placas Petrifilm de 3M, que son una herramienta segura y sencilla para análisis de alimentos (Santambrosio, 2009). Cuando se usan medios deshidratados se deben elaborar teniendo en cuenta las instrucciones las instrucciones dadas por el fabricante, que se especifican en el prospecto del envase. Por lo general en medios deshidratados se reconstituye en agua destilada indicada por el fabricante, en caso de medios que contienen agar como agente gelificante. Hay que disolver y calentar a la vez hasta que este reconstituido completamente, hay que esterilizarlo para asegurarse de que no crecerá ningún microorganismo contaminante, esta se realiza en una autoclave a 121°C durante 15 a 20 min. Finalmente se espera que la temperatura baje a 45°C, para fraccionarlo en placas siempre cerca del mechero para evitar la contaminación ambiental, dejar a temperatura ambiente hasta que se solidifique por completo y se refrigera a 4°C para su almacenamiento (Barrero, s,f).

**2.9.2 Siembra y aislamiento de microorganismos.** El proceso de colocar las bacterias u otros microorganismos en medios de cultivo, recibe el nombre de siembra, esta se puede hacer a partir de muestras biológicas tales como orina, semen, secreciones etc., de análisis para el control de

calidad muestras de alimento, cosméticos, entre otros como los medicamentos, de igual manera se puede hacer siembra de un cultivo microbiano a otro (Rojas, 2011). Inicialmente la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas, para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades es necesario separar uno de otros obteniendo cultivos puros en donde el aspecto de la colonia sirve para diferenciar distintas especies microbianas. En el procedimiento de inoculación el asa de siembra, debe calentarse al rojo sobre la llama inmediatamente antes y después de hacer la transferencia, ya que la flama destruye cualquier forma de vida sobre la superficie de la aguja, durante la siembra se sostiene el tubo con la mano izquierda y se sostiene el capuchón entre los dedos meñiques y lunar de la mano derecha, manteniendo el tubo lo más posible cerca de la llama (Bailón, Cervantes, & González, 2003). La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido. Usando métodos como la estría, estría por agotamiento, siembra por punción o por dilución. Una vez se introduce a la estufa de cultivo a la temperatura deseada.

**2.9.3 Crecimiento bacteriano.** Según sus requerimientos atmosféricos, las bacterias se clasifican en Aerobias estrictas, que solo crecen en presencia de oxígeno, Anaerobias estrictas que crecen en ausencia de oxígeno y facultativas que crecen tanto en aerobiosis como anaerobiosis. En cuanto a temperatura cuando esta es baja 2 a 5°C, se denominan Psicofilicas, mesófilas si su temperatura va de 10 a 45°C, y Termófilas si crecen a temperatura superior a 50°C (Fernández et al., 2010).

**2.9.4 Conteo de unidades formadoras de colonia:** Nos permite conocer el estado bacteriológico de un material, es necesario conocer el número y tipo de bacterias por unidad de

volumen presentes en una muestra representativa. La técnica se basa en contar las Unidades Formadoras de Colonia o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. (Camacho et al., 2009). El método de recuento de colonias en placa, es muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra; transcurrido el tiempo de incubación se elige aquella dilución en la que el número de colonias se encuentra entre 30 y 300 y el resultado se expresa en UFC/ml, teniendo en cuenta el volumen sembrado y factor de dilución.

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\text{Promedio colonias contadas}}{0,1} * 10^3$$

En donde: UFC/ml: Unidades formadoras de colonia por mililitro.

0,1: Cantidad de muestra sembrada

$10^3$ : Inversa del factor de dilución

**2.9.5 Morfología.** La forma microscópica de las bacterias está determinada por la rigidez de su pared celular, básicamente se diferencian según su forma en cocos, bacilos y espirilos. La morfología bacteriana debe ser observada en el microscopio dado el tamaño de estos pequeños microorganismos (Pirez y Mota., S,f). Existen métodos rápidos aplicables a la microbiología, técnicas de identificación de bioquímicas, pruebas de detección de antígenos y anticuerpos y tinciones rápidas. Las tinciones microbiológicas permiten observar a los microorganismos en función de la capacidad de los mismos para retener o no, determinados colorantes, estas pueden realizarse siguiendo distintos métodos, como la tinción de Gram; que permite hacer diferenciaciones taxonómicas separando dos grandes grupos de bacterias, según se comporten ante la tinción (Gram-positivas de color violeta azulado y Gram negativas, de color rojo a rosado) (López, Castillo, & Salavert, S,f).

**2.9.6 Pruebas bioquímicas:** Se emplean para identificar de forma clara y precisa la presencia y ausencia de una enzima o de un grupo de enzimas, o una vía metabólica en uno o más microorganismos. No todas las bacterias poseen las mismas propiedades se diferencian por que poseen una enzima en particular mediante la adición de sustrato y esperando que ocurra la reacción. Estas se clasifican en tres grupos; Universales, Diferenciales y Especificas (Briceño, s,f). La realización de una prueba bioquímica implica cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o un inhibidor y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya que por viraje de un indicador o por agregado de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación (Martinez, 2007).

Existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, a continuación, enumeramos las que se utilizan con mayor frecuencia (Tabla 2).

🕒 **Catalasa:** Es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromo. Las bacterias, hidrolizan el Hidrogeno en agua y el oxígeno gaseoso que se libera produce burbujas (Hylary, 2014), el principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococacceae* (Positiva), de *Streptococcus ssp* y *Enterococcus spp* (negativa) (Fernández et al., 2010).

🕒 **Citrato** Es un medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar el citrato como única fuente de carbono y energía. Solo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberan iones de amonio lo que junto con el metabolismo del citrato, genera una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color de verde a azul (MediaUmh, s,f). Esta prueba permite diferenciar enterobacterias

negativas como la *Escherichia* y *Shigella* y las citrato positivas tales como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Serratia*.

🕒 **Medio SIM:** La prueba Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM), Se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, que degrada el aminoácido triptófano a indol. Al añadir al medio SIM el reactivo de Kovacks o de Erlich, reacciona tanto con el indol como el triptófano produciendo compuestos de color rojizo, que se identificara en el medio porque produce un anillo característico de esta prueba.

La producción de  $\text{SH}_2$ , se manifiesta por un ennegrecimiento del medio, como consecuencia como la consecuencia de la formación de un precipitado negro; la movilidad se expresa por un crecimiento difuso desde la línea de inoculación hacia la paredes del tubo, mientras que aquellos microorganismos no móviles, concentran su crecimiento alrededor de la línea de inoculación (DIFCO, 2009).

Tabla 2  
Características bioquímicas de bacterias

| Bacteria                     | Indol    | Gas      | $\text{H}_2\text{S}$ |
|------------------------------|----------|----------|----------------------|
| <i>E. coli</i>               | Positivo | Positivo | Negativo             |
| <i>Salmonella Enterica</i>   | Negativa | Positivo | Positivo             |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Negativo | Negativo | Negativo             |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | Negativo |          |                      |

🕒 **TSI:** Es uno de los más usados para ver la fermentación de Carbohidratos en la familia de las enterobacterias, se pueden tener varias posibilidades de fermentación de acuerdo a las características metabólicas. se utiliza para determinar si un bacilo gramnegativo utiliza la glucosa, lactosa o sacarosa de manera fermentativa y forma sulfuro de hidrogeno (Forbes, 2007).

Cuando se fermenta solo la glucosa, se observa el pico de flauta alcalino (rojo), y la columna amarilla, ya que los microorganismos acidifican primero la glucosa virando el color amarillo, 24 horas después de que la glucosa ha sido consumida en 0,1%, el organismo comienza a usar las peptonas aeróbicamente alcalinizando el pico que vira nuevamente a rojo por liberación  $\text{NH}_3$ .

La fermentación de la lactosa y/o sacarosa y lactosa, se observa un pico de flauta y una columna acida; la lactosa y la sacarosa se encuentran al 1%, los microorganismos utilizan primero la glucosa y cuando se termina comienzan a utilizar la lactosa y sacarosa. Cuando no hay fermentación de lactosa y glucosa hay microorganismos incapaces de fermentar los hidratos de carbono y utilizan las peptonas en forma aeróbica en el pico, quedando el fondo sin cambio de color. A si mimos el gas se produce a partir del ácido fórmico obtenido en la producción de glucosa.

En la tabla 3 están descritos los resultados de las pruebas bioquímicas para algunas bacterias patógenas del semen.

Tabla 3

*Resultados de la fermentación de carbohidratos para algunas bacterias*

| Microorganismo               | Pico       | Columna       | Resultado                   |
|------------------------------|------------|---------------|-----------------------------|
| <i>Shigella sp.</i>          | Rojo-      | Amarillo+     | Fermentación GLU            |
| <i>Escherichia coli</i>      | Amarillo + | Amarillo+ Gas | Fermentación GLU-LAC-SAC    |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | Rojo-      | Rojo-         | No fermentación GLU-LAC-SAC |

## 2.10 Antibiogramas

Los antibióticos son moléculas bactericidas y/o bacteriostáticas que controlan las infecciones bacterianas; su uso incorrecto favorece la multirresistencia o falla terapéutica en el caso de

bacterias naturalmente resistentes, generando un riesgo la salud (Rodríguez, Recalde, & Padilla, 2017).

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana o antibiogramas permiten seleccionar los antibióticos a utilizar en el tratamiento contra procesos infecciosos, Estos se pueden clasificar en métodos cuantitativos y cualitativos, los primeros son aquellos procedimientos que permita determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima. La realización de estos procedimientos requiere la utilización de cepas de control con resultados conocidos (Taroco, Seija, & Vignoli, S,f).

El Agar Mueller Hinton, es utilizado en la estandarización del procedimiento de difusión de discos para la determinación de sensibilidad a antibióticos de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas de crecimiento rápido. El procedimiento está basado en la difusión de las sustancias antimicrobianas que impregnan en un disco de papel a través de un gel de agar, en este método los diámetros de los halos de inhibición se correlacionan con la concentración mínima inhibitoria. Los resultados pueden ser informados como Resistentes/Intermedio/Sensibles (DIFCO, 2009).

Los antibióticos son utilizados en la criopreservación de semen equino con el fin de controlar la proliferación de microorganismo, adicionándolos a los diluyentes usados para la refrigeración y congelación de semen. Para que estos eliminen la contaminación bacteriana y fúngica y reducir el riesgo se endometritis (Varner et al., 1998). Los antibióticos más empleados son la penicilina G-potásica o sódica cristalina, la Gentamicina, Amikacina, la estreptomycin entre otros como la amoxicilina + Acido clavulinico y la Cefepime (Palma, 2001).

## **2.11 Hongos**



Es un concepto general que incluye mohos y levaduras, se hayan distribuidos ampliamente en el suelo, las plantas, el agua y en el aire, la mayoría son saprofitos y la minoría son patógenos que parasitan organismos animales y vegetal (Reyes, 2013).

Los hongos son miembros multicelulares o unicelulares heterotróficos, son saprofitos o parásitos obligados, cuyos requerimientos nutritivos son similares a los de las bacterias; son aerobios estrictos o facultativos, y crecen en amplio margen de temperatura de 2-50°C.

Esto son reconocidos en el laboratorio por su morfología macroscópica y microscópica, de acuerdo con ello se dividen en dos grupos:

## **2.12 Filamentosos**

La hifa o el filamento, son estructuras cilíndricas, pueden tener tabiques o septos en un numero variable o no tenerlo y ser aceptados, poseen poros pequeños, según la forma que adopten pueden ser vesiculosas, nodulares, pectinadas, en raqueta y otras; al conjunto de hifas unidas y entrelazadas se les denomina micelio el cual puede ser aéreo o reproductivo; el micelio nutritivo es aquel que se introduce en el medio de cultivo para absorber nutrientes y el aéreo se desarrolla en la colonia del hongo que de acuerdo con el género y la especie van a tener diferentes formas y colores. Así mismo pueden ser algodonosos, pulverulentas, cerebriformes y los pigmentos pueden ir de amarillo, verdes, violetas y rojos (Aponte, s,f).

## **2.13 Levaduras**

Son filogenéticamente un grupo diverso de hongos unicelulares en los cuales las fases telemorfas o sexuales de división celular se dan por fisión o gemación, su estructura es de tipo eucariótico, pero sin sistema fotosintético con pared rígida. Dentro del grupo de los microorganismos juegan un papel muy importante en la producción y deterioro del alimento, tecnológicamente intervienen en tres tipos de alimento como son el pan, el vino y cerveza (Chávez, 1998). Los hongos levaduriformes; forman colonias suaves, cremosas, con pigmentos variados según el género y la especie pueden ser blancas, crema, café o negras, van estar constituidas por células redondas, ovales o gemantes denominadas blastosporas o blastoconidias (Aponte, s,f).

#### **2.14 Observación Macroscópica y Microscópica**

Toma en cuenta las características que desarrollan las colonias que crecen en medios como el Agar Sabouraud; teniendo en cuenta la topografía de la colonia, la pigmentación en anverso y reverso la textura y el tamaño de crecimiento (Olivo, s,f).

La observación microscópica se efectúa alrededor de 400 a 500x de luz en el microscopio, en donde podemos detectar el tipo de forma reproductiva, tamaño, agrupamiento, y el color a si mismo podemos describir las características de las hifas. Esta observación debe realizarse a partir de los cultivos en placa, tomando con un gancho o una cinta pegante una pequeña muestra de micelio a la cual se le añade una gota de Azul de lactofenol o lugol entre otros.

#### **2.15 Mohos y Levaduras Presentes en el Semen**

Las actuales técnicas microbiológicas de diagnóstico facilitan la detección de un gran número de gérmenes que afectan la calidad del semen y conducen a la infertilidad. La mayoría de las infecciones por hongos son asintomáticas, aunque se ha reportado que algunas generan lesiones, úlceras genitales, inflamación escrotal, verrugas y afectación negativa de la calidad seminal, perjudicando la movilidad, viabilidad y las funciones mitocondriales de los espermatozoides; por lo que infiere que tienen una relación directa con la alteración del potencial fértil masculino (Castrillón, Duque, & Cardona, 2016).

Diferentes tipos de mohos y hongos se han encontrado en el semen sin que haya sido verdaderamente posible precisar; a continuación, nombramos los más importantes (Parez, 1985):

**2.15.1 *Aspergillus spp.*** Es un hongo filamentoso hialino, saprofita, perteneciente al filo *Ascomycota*; se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual y asexual, macroscópicamente las especies de este género presentan textura aterciopelada, granular o algodonosa, el color de las colonias varía según la especie y puede ser verde amarillo, negro o marrón. Se hospedan en humanos, bovinos, equinos y aves (DATABIO). En cerdos la ocratoxina producida por la especie *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium spp*, afecta la calidad del semen del verraco y la producción espermática, Durante la espermatogénesis, la micotoxina altera la estabilidad de la membrana del espermatozoide debido a su potente acción inhibitoria de la síntesis proteica (Biro et al., 2003). En bovinos y equinos pueden ocasionalmente causar abortos.

**2.15.2 *Fusarium spp.*** Es un género de moho que forma parte de la flora del campo, su temperatura óptima de crecimiento es de 18 a 30°C, son considerados oportunistas. Algunas de sus especies producen toxinas que afectan al hombre y animales (Tapia y Amaro., 2014).

La clasificación morfológica se basa en las características macro y microscópica del cultivo, el tipo de micelio aéreo, pigmentación y tasa de crecimiento en la colonia, el color que desarrolla depende de la especie y puede ser blanco, crema, rojo o purpura, la especie de este género pueden producir tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidios y clamidosporas.

La presencia de micotoxina Zearalenona, producida por un *Fusarium spp*, produce en el macho síntomas tales como inflamación en el prepucio, atrofia de los testículos, disminución de libido asociado a la disminución de testosterona, reducción de la producción y la calidad de semen; por otra parte la presencia de esta especie en el semen reduce la capacidad de los espermatozoides para unirse al zona pelucida (A.Quiles, 2016).

**2.15.3 *Penicillium spp*.** Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que terminan en células conidiogénas llamada fialides, los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris, la pared es de textura lisa o rugosa (Carrillo, s,f).

**2.15.4 *Candida spp*:** Es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C, en el huésped, y como hongo en aspecto filamentoso, a 25°C, en la naturaleza. Perteneció al género *Ascomycota* y se reproduce por gemación. Macroscópicamente, en Agar Sabouraud, crecen formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas. En forma de levadura presentan un aspecto de células redondas u ovaladas, agrupadas en pequeños grupos (DATABIO, s,f). El efecto de esta levadura en el semen ha sido poco estudiado y sobre los espermatozoides poco entendido, aunque se ha demostrado que

puede generar cambios en PH del plasma seminal, además afecta la morfología, la movilidad y las funciones mitocondriales de los espermatozoides (Castrillón et al, 2016).

**2.15.5 *Rhodotorula spp.*** Forma parte de los hongos levaduriformes, forma parte de la micro flora comensal de la piel, uñas, membrana de la mucosa, aparecen también en el queso y en los productos lácteos y diversas fuentes ambientales como el aire, suelo; además pueden aislarse en orina y heces. Se caracteriza por producir un llamativo pigmento rojizo y tener ocasionalmente rudimentarios pseudomicelios (Cardona y Cure, 2001).

## **2.16 Flora Microbiana Presentes en Yeguas**

Una yegua fértil es aquella que, una vez en contacto con el microorganismo patógeno en el útero, puede revertir el proceso infeccioso ya sea por los mecanismos de defensa humoral o celular, generando un rápido retorno al ambiente uterino normal; mientras una yegua susceptible es aquella que no responde efectivamente y falla en la limpieza produciendo inflamación del útero sin crear un ambiente ideal para el descenso del embrión (Acosta y Alvares, 2010).

Los microorganismos no específicos capaces de causar fallos en la fertilidad, generalmente requieren la intervención de factores predisponentes para su establecimiento y desarrollo en el útero de los animales domésticos. Existen un grupo de factores que predisponen a la contaminación del útero con diferentes agentes microbianos (Fernández, Silveira, & López, 2006).

Los factores predisponentes más importantes, se pueden agrupar en tres tipos: El primero es el manejo y medio ambiente, en donde se incluyen los factores relacionados con el estrés, la alta producción y las enfermedades metabólicas y carenciales. Por otra parte, las condiciones del parto

teniendo consideración la higiene, distocias y traumatismo y finalmente las condiciones uterinas, en donde se considera la disminución de la inmunidad local. el tono uterino, la capacidad fagocitaria de los leucocitos. Entre otras como la aparición del celo.

El proceso reproductivo de los equinos, se puede ver afectado por microorganismos tales como virus, bacterias y hongos; Las principales infecciones bacterianas que producen abortos son por *Salmonella abortus equi*, *Leptospira spp*, *Streptococcus epidermicus* y virus como el *herpes virus equino* (Ahumada, 2018). La endometritis subclinica, es la más frecuente causando la infertilidad en yeguas, las bacterias más patógenas causantes tenemos *Estreptococos equi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *klebsiella pneumonie*.

Básicamente los organismos patógenos se introducen durante la monta natural o inseminación artificial, después del parto, durante el examen y como resultado de la insuficiencia de barreras físicas a la infección. Cuando los mecanismos de defensa uterinos están funcionando adecuadamente, la infección bacteriana no interfiere con la reproducción (Acosta y Alvares, 2010).

### 3. Marco conceptual

**Equinos:** Es un animal mamífero herbívoro, que pertenece al orden de los perisodáctilos, comúnmente llamados caballos, los cuales se caracterizan por ser cuadrúpedos, de cuello largo y arqueado.

**Caballo Criollo Colombiano:** Es una raza originaria en Colombia, poseedora de características propias, debido al mejoramiento de su fenotipo, está dotado de sensibilidad, fuerza, brío, velocidad y suavidad.

**Estabulado:** Sistema en donde los animales permanecen confinados todo el tiempo.

**Garañón:** Es un semental, que proviene de los équidos de extraordinaria corpulencia que se echa a las yeguas para la procreación de hembras y machos.

**Vagina artificial:** Usadas para la recolección de semen y estimulación del glande.

**Semen:** Es un líquido viscoso y blanquecino, compuesta por un conjunto de secreciones producidas por diferentes glándulas del aparato genital del macho que se juntan en el momento de la eyaculación, instante en el que este líquido es expulsado a través de la uretra.

**Pene:** Es el órgano genital masculino encargado de la reproducción y de la expulsión de la orina y el semen.

**Espermatozoide:** Es la célula reproductora sexual masculina o gameto masculino encargado de fecundar al ovulo, aportando la información genética complementaria a la célula femenina.

**Evaluación seminal:** El análisis seminal o espermograma incluye la evaluación de los espermatozoides, plasma seminal y la presencia de otras células como los leucocitos; es un examen de laboratorio esencial en la evaluación de la infertilidad.

**Fertilidad:** Es una cualidad que tiene todo ser viviente de procrear y reproducirse, ocurre luego de que el ovulo de una hembra se une con el espermatozoide del macho.

**Microbiología:** Ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos que no son visibles al ojo humano.

**Microorganismos:** Son aquellos seres vivos más diminutos que solo pueden ser apreciados a través de un microscopio.

**Esterilización:** Eliminación o muerte de todos los microorganismos que contienen un objeto o sustancia y que se encuentran acondicionados de tal forma que no puedan contaminarse nuevamente.

**Medio de cultivo:** Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismo.

**Agar:** Se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo.

**Medios generales:** Son aquellos que permiten el crecimiento de todo tipo de microorganismos.

**Medio cromogénico:** Es un medio solido diferencial, que permite simultáneamente el recuento, a aislado, e identificación directa de las colonias de cada bacteria la cual se identifica por medio de un color específico.

**Medios selectivos:** Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

**Pruebas bioquímicas:** Permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de investigación.

**Antibiograma:** Es una prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un antibiótico o a un grupo de antibióticos.

#### 4. Marco legal

El intercambio de genética, existe prácticamente desde la domesticación de los animales, este se daba entre poblaciones vecinas e inclusive durante las guerras en donde los reproductores de diferentes especies pasaban a hacer un botín muypreciado. En tiempos modernos ha surgido una



serie de dificultades en el de comercio animales vivos, como problemas económicos y sanitarios que limitan el comercio de reproductores. Pero con el advenio de nuevas biotecnologías de la reproducción, como la inseminación artificial y la transferencia embrionaria, el semen y los embriones pasaron a solucionar en parte estos problemas (Etcheverry, 2009).

Desde el punto de vista sanitario, Organización Mundial de Salud (OIE) es el organismo que fija las pautas para el intercambio genético, sus recomendaciones son adoptadas por los países para comercializar internacionalmente genética de manera segura.

El comercio intracomunitario y la importación de semen y embriones están regulados por las directivas 88/407/CEE y 89/556/CEE, respectivamente, del consejo; estas directivas establecen unas normas sanitarias que el semen y los embriones deben cumplir para ser recogidos, almacenados, importados o comercializados dentro de la Unión Europea. De igual manera existen listas de los países y centros aprobados para importar estos productos; también establecen normas respecto a la certificación sanitaria del semen y los embriones comercializados.

En nuestro país, el ICA, ejerce el control técnico y científico del material genético, destinado a la reproducción animal para prevenir riesgos en la salud animal y mejorar productividad pecuaria del país, a través de la vigilancia sobre los centros de recolección de semen y embriones, bovinos, pequeños rumiantes, porcinos equinos y granjas aviares de reproductoras e incubadoras (ICA, S,f).

Mediante la resolución N°. 020033 de mayo 05 de 2016, por medio de la cual se establecen los requisitos sanitarios y de bioseguridad para el registro de centrales de recolección y procesamiento, recolección e importadores de material genético de las especies de interés zootécnico y se dictan otras disposiciones”.

Así mismo establece un documento en donde da a conocer la estructura y los lineamientos del Sistema de Buenas Practicas de Bioseguridad (BPB) para la producción en Colombia de material seminal y embriones (Anzola, Pedraza, Lezzaca, & Correa, 2007).

Para darle cumplimiento a la primera resolución se debe contar con instalaciones aisladas de otro tipo de producción y cualquier foco de contaminación; las cuales deben contar con agua potable en el área de procesamiento, áreas administrativas, de recepción material genético a procesar, laboratorio de procesamiento y zonas de lavado de materiales y equipos. separadas, delimitadas y señalizadas; así mismo debe contar con bodega de almacenamiento de materiales y de residuos líquidos y sólidos (Soto, 2017).

El anterior autor también afirma que el personal debe ser responsable, capacitado para cumplir con todas las normas de bioseguridad y portar la dotación adecuada. Asimismo, el laboratorio debe contar con el formato POE, que soporte las actividades descritas del procedimiento y un formato que cuente con el ingreso del personal y visitantes, como también de debe hacer el mantenimiento periódico de los equipos, instalaciones, calibración de equipos instrumento de medición.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Ubicación**

Los equinos del grupo estabulado pertenecen al Criadero LA COMARCA, ubicado en la Vereda el Guácimo del Municipio de Málaga-Santander; en donde se colectaron cuatro Caballos Criollos Colombianos, los cuales se encuentran confinados las 24 horas del día en pesebreras de manera

individual y su actividad reproductiva es frecuente ya que son usados como reproductores para el servicio de las hembras que se encuentran en este establecimiento. El grupo de equinos no estabulados están ubicados en la vereda Pescadero del mismo municipio, estos últimos se encuentran a potrero abierto y no están siendo usados para la reproducción. Las lecturas inmediatas de calidad seminal se hicieron a campo y las no inmediatas se hicieron en el laboratorio de la Universidad Industrial de Santander- Sede Málaga junto con las pruebas microbiológicas, para identificar la microbiota presente semen y evaluar cómo influye está en la calidad espermática de animales estabulados y no estabulados.

## 5.2 Animales

Se utilizaron 7 equinos de la raza Criollo Colombiano (Tabla 4), con edad entre 3 y 12 años, todos están sanos, sin signos de enfermedad clínica y sin problemas reproductivos evidentes. Los animales en pesebrera son mantenidos bajo un manejo nutricional y sanitario idéntico, consumen concentrado a las 9 am, 2.pm, pasto picado 12 m y heno a las 6 am y 4 pm, sal mineralizada cada dos días y agua a voluntad. Los animales no estabulados son mantenidos en condiciones de pastoreo con agua a voluntad (Tabla 4).

Tabla 4  
*Cantidad de animales usados cada grupo para el experimento*

| Nº | RAZA | EDAD AÑOS | ESTADO REPRODUCTIVO | GRUPO      |
|----|------|-----------|---------------------|------------|
| 1  | CCC  | 12        | Activo              | Estabulado |
| 2  | CCC  | 7         | Activo              | Estabulado |
| 3  | CCC  | 5         | Activo              | Estabulado |

|   |     |   |          |               |
|---|-----|---|----------|---------------|
| 4 | CCC | 6 | Activo   | Estabulado    |
| 5 | CCC | 4 | Inactivo | No estabulado |
| 6 | CCC | 6 | Inactivo | No estabulado |
| 7 | CCC | 7 | Inactivo | No estabulado |

### 5.3 . Colección de Semen

Las colectas de semen se realizaron en el segundo semestre del año 2018. Inicialmente fueron realizadas 3 colectas para limpiar el tractor reproductivo de la presencia de semen extragonadal, e uniformizar los grupos, descartando los eyaculados. Seguido a estas colectas pre-experimentales se colectaron las muestras para el experimento durante el mes de junio

**5.3.1 Preparación de la yegua:** Para la estimulación del garañón, se usó una yegua que estuviera en Estro (celo), a la cual se limpió la vulva y la región de la cola con agua y jabón para evitar que la cabeza del pene se contamine cuando entre en contacto con la hembra, así mismo se vendó la cola para evitar que con los pelos de la cola corte o lastime el pene del caballo. Finalmente se atan los miembros anteriores y posteriores para evitar algún golpe que pueda afectar al caballo o a las personas que intervienen en el proceso.



*Figura 1. Limpieza y cepillado de la hembra.*



*Figura 2. Vendaje de los pelos de la cola*

#### **5.4 Preparación del Semental**

El macho fue llevado por el personal que conoce su comportamiento hasta el sitio en donde se colectará, a donde está la yegua, con el objetivo que se le acerque y se estimule con mayor rapidez, una vez expuesto el miembro se aleja de la yegua y con agua a 37°C se lava y se limpia el pene, lo que permite eliminar el esmegma y restos de suciedad presentes en la región externa del pene. Previo se realizó a cada ejemplar una valoración física y andrológica para estimar su conformación general, la edad, la condición corporal, sus movimientos y su libido y comportamientos.



*Figura 3 Estimulación del semental*



*Figura 4 Limpieza de pene y prepucio del macho*

## **5.5 Preparación de la Vagina Artificial**

Para realizar las colectas del material seminal se usó la técnica de Vagina Artificial tipo Missouri, la cual está constituida por un forro de látex doble, termosellado, que forma una cámara en donde se introduce agua a 46°C y aire, esta se sostiene de una funda de cuero para facilitar su movimiento; dentro de esta se introduce una funda sanitaria limpia y esterilizada la cual tiene una bolsa recolectora con filtro para poder separar la porción gelatinosa del eyaculado, asimismo, otros agentes extraños tales como tierra, esmegma u otras partículas que puedan contaminar el semen.

Esta funda se pega con cinta adhesiva al forro y finalmente se impregna gel lubricante no espermicida y se cubre el extremo hasta el momento de la colecta para evitar contaminación.



*Figura 5 Vagina artificial equina modelo MISSOURI*



*Figura 6. Lubricación de la vagina artificial*

## **5.6 Colecta de Semen**

Luego de la limpieza del pene se vuelve a acercar el semental a la yegua para que este se estimule, cuando el pene estuvo totalmente erecto y protruido se deja que el macho monte la yegua y se desvía el pene hacia el interior de la vagina artificial para que este eyacule con facilidad, con la mano derecha se sostiene la vagina haciendo unos pequeños movimientos para la estimulación y

la mano izquierda se coloca ventral del pene con el objeto de palpar las pulsaciones asociadas con la eyaculación. Inmediatamente se retira la V.A y se coloca en posición vertical para que el semen escurra hacia la bolsita recolectora.



*Figura 7. Colecta de semen equino*



*Figura 8 Eyaculado del caballo dentro de bolsa colectora*



## 5.7 Evaluación Semen

Una vez obtenido el semen, se hicieron en campo los análisis inmediatos, y se registraron los datos de la calidad del eyaculado.

🕒 **Características macroscópicas:** Se retiró de la bolsa colectora y se depositó en tubos falcón para medir el volumen libre de gel, el color del eyaculado y el pH el cual se midió con cinta de pH y se comparó el resultado acidez o alcalinidad con tabla de pH.

🕒 **Motilidad y vigor:** Estos análisis subjetivos duran menos de cinco minutos y los materiales tales como la platina del microscopio, la lámina porta y cubre objetos y el semen deben estar a 38°C, para la evaluación se toma una gota de semen y se observa a 100x para observar el movimiento global e individual de los espermatozoides, el cual se califica en una escala de 0 a 100% y en cuanto al vigor de 0 a 5.

🕒 **Viabilidad:** La determinación de células vivas y muertas se realizó con la tinción de Eosina, en donde se mezcla 10 µl semen con 10 µl de solución de eosina, en un portaobjeto, con la ayuda de un cubreobjetos se hace un extendido de la solución por toda la lámina y de deja en reposo por 30 minutos, posteriormente se observa en el microscopio de contraste de fase a 40x en donde se cuenta 100 espermatozoides, y se reporta el porcentaje de vivos cuando estos no son teñidos con el colorante y los muertos cuando estos son color morado.

🕒 **Concentración:** Con una micropipeta se tomó 10 µl de muestra (semen diluido en formol salino), y se transfirió a la cámara de Neubauer por medio de capilaridad entre el piso de esta y el cubreobjetos, se dejó que esta se sedimentara por cinco minutos y se procede hacer el conteo de las células espermáticas con la ayuda de un microscopio a 40 x. Para obtener el total de millones

de espermatozoides por mililitro de semen se dividió el número de células por el área contada, multiplicada por la altura de la cámara y por la dilución utilizada.

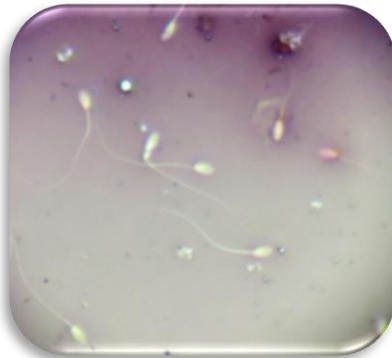
○ **Morfología:** El número de espermatozoides con alteraciones o sin alteraciones, se hace observando al microscopio a 1000x, en donde se coloca 3  $\mu$ l de muestra (semen y formol) y se procede a identificar la morfología espermática realizando el conteo de 100 células espermáticas. Finalmente, estas anormalidades son reportadas en porcentaje y se hace el conteo del tipo de defecto y en qué lugar del espermatozoide se produce dicha alteración.



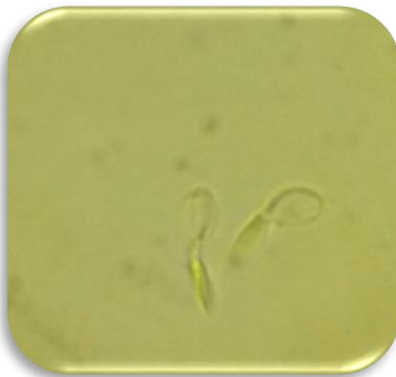
*Figura 9. Observación microscópica de espermatozoides*



*Figura 10 Observación microscópica de espermatozoides*



*Figura 11 Espermatozoides de equino, teñidos con Eosina-Nigrosina*



*Figura 12 Defecto de cola enrollada en el espermatozoide*

## 5.8 Análisis Microbiológico

**5.8.1 Normas de laboratorio** .Para el acceso al laboratorio de microbiología de la UIS-Sede Málaga, se procuró tener en cuenta las normas de bioseguridad con el fin de prevenir y controlar riesgos biológicos; para la protección de personal es indispensable el uso de gorro, bata, guantes y tapabocas, las puertas y ventanas permanecieron cerradas durante el proceso para evitar la contaminación por fuentes de aire.; antes de iniciar el trabajo se limpió y se desinfecto el área de trabajo y algunos equipos que usaron para experimento. De igual manera el material de vidriería se lavó con detergente Neutro y se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente esterilizarlo en la autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

**5.8.2 Preparación de medio de cultivo:** Para la preparación de los medios de cultivos deshidratados se empleó un Erlenmeyer al cual se le añadió agua destilada y la cantidad indicada del medio, se mezcló hasta conseguir una solución homogénea, asimismo se procedió a calentar para lograr la disolución completa del agar, y se sometió a autoclave a 121°C a 15 libras de presión por 15 minutos para la esterilización si así lo indicaba la etiqueta. Después de haber alcanzado el equilibrio de presiones y para evitar la sobre carga térmica del medio de cultivo se sacó de la autoclave y se dejó enfriar a 45°C removiéndolo en sentido circular para entremezclarlo de manera uniforme. Finalmente se vierte 20 ml del medio en cajas de Petri evitando la formación de humedad en las tapas de las cajas de vidrio y se deja solidificar, en cuanto a los tubos de agar inclinado estos se colocan en posición inclinada de tal manera que se forme una placa de 3 cm en forma de pico de flauta.

Los medios de cultivo usados para el experimento y la dilución utilizada para cada uno se describen en la tabla 5.

Tabla 5  
*Medios de cultivo usados en el experimento*

| Nombre                       | Referencia   | Tipo cultivo | Dilución  |
|------------------------------|--------------|--------------|-----------|
| <b>Agar Nutritivo</b>        | 105450-MERCK | Simple       | 20gr/lts  |
| <b>Agar Sabouraud</b>        | 105438 Merck | Selectivo    | 65 gr/lts |
| <b>Agua Peptona</b>          | 107228       |              | 25 gr/lts |
| <b>CHROMagar Orientation</b> | AD-MP12-3    | Mixto        | 0         |
| <b>Agar MacCONKEY</b>        | (AD-MP12-3), | selectivo    | 0         |
| <b>Agar Muller Hinton</b>    | (AD-MP16-3)  | Antibiograma | 0         |
| <b>Agar TSI</b>              | Merck        | Bioquímica   | 65 gr/lts |
| <b>Citrato</b>               | Merck        | Bioquímica   | 23 gr/lts |
| <b>Medio sim</b>             | BioXon       | Bioquímica   | 30 gr/lts |

## 5.9 Siembra

Se preparó un volumen de agua peptona, de acuerdo a las instrucciones y se distribuyeron en tubos de ensayo cada uno en porciones de 9 ml, y se pasan bien sellados a autoclave. Posteriormente se miden 1ml de muestra de semen el cual fue transportado al laboratorio a temperatura ambiente en tubos falcón y se transfiere al tubo que contiene el diluyente, para obtener una dilución 1, de esta última se pasa 1 ml a tubo de ensayo hasta hacer dos diluciones sucesivas es decir  $10^{-3}$ .

La siembra para el conteo de UFC, se hizo en superficie en donde se adiciono a cada placa con agar Nutritivo y Sabouraud 0.1 ml de muestra y se distribuyó con la ayuda de un asa de vidrio

estéril por toda la superficie del medio. Cada placa se rotulo con el nombre del animal, la fecha y el número de la colecta y se colocaron en la incubadora de forma invertida, para el crecimiento de bacterias se incubaron a 36°C durante 24 horas y los hongos a 25° por 72 horas. De igual forma se colocó una placa con agar para conocer si la incubadora estaba contaminada.

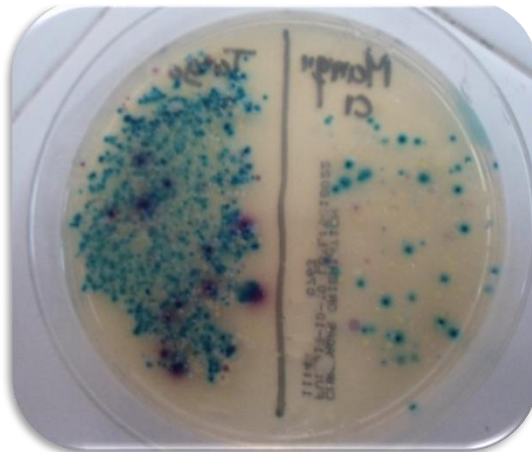
Para la identificación directa y diferenciación se usó un medio comercial no selectivo CHROMagar Orientation (AD-MP54-3), el cual se dejó reposar 30 minutos antes de su uso y se le adiciono 0.1 ml de semen haciendo un extendido en forma de estría de extremo a extremo sobre toda la superficie de la placa se dejó encubando de manera invertida a 36°C durante 24 horas.



*Figura 13 Siembra de semen en Agar Nutritivo*



*Figura 14 Siembra en CHROMagar ORIENTATION con asa de alambre*



*Figura 15 Crecimiento colonias bacterianas en CHROMagar Orientation*

### **5.10 Conteo Unidades Formadoras de Colonias**

El conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) presentes en un mililitro de muestra, se contó cada caja y se promedió el resultado al cual se multiplica por el inverso de la solución el resultado se multiplica por la cantidad de la muestra sembrada (0.1 ml).

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\text{Promedio colonias contadas}}{0,1} * 10^3$$

En donde: UFC/ml: Unidades Formadoras de colonia por mililitro.

0,1: Cantidad de muestra sembrada

10<sup>3</sup>: Inversa del factor de dilución

### 5.11 Morfología Bacterias

Mediante la observación física se pudo observar las estructuras externas de las bacterias tales como la forma, la elevación, el margen, el color, tamaño, y la textura. Para la observación microscopia se realizó una coloración de Gram mediante el siguiente procedimiento:

1. Hacer un frotis de la colonia más representativa con asa de alambre esterilizada.
2. Hacer un extendido sobre una lámina portaobjetos húmeda y fajar al calor.
3. Vierta sobre el frotis Cristal de violeta y dejar actuar por 1 minuto.
4. Lave con agua de la llave a baja presión y escurra.
5. Adicione Lugol y deje actuar durante 1 minuto.
6. Lave con agua de la llave a baja presión y escurra.
7. Agregue solución decolorante por 30 minutos.
8. Lave con agua de la llave a baja presión y escurra.
9. Cubra con Fucshina y deje actuar por 1 minuto.
10. Lave con agua de la llave a baja presión y escurra.
11. Secar la lámina al calor o temperatura ambiente en posición inclinada.
12. Observar la lámina al microscopio a100x, usando aceite de inmersión.



13. Interprete el tipo de morfología. (Microorganismos Gram positivos: Violeta y microorganismos Gram negativos: Rosados).



*Figura 16 Bacilos Gramnegativos*



*Figura 17 Cadenas de Bacilos Grampositivos*

### **5.12 Aislamiento en Medios Selectivos**

Para la identificación del tipo bacteriano en una población mixta de microorganismos se empleó el Agar MacCONKEY(AD-MP12-3), producto listo para usar, el cual se dejó reposar durante 30 minutos antes de su uso, para inoculación se dividió y se marcó la placa con el microorganismo y

los datos del animal; la siembra hizo en forma de estría tomando con un asa una colonia representativa del medio no selectivo CHROMagar Orientation(AD-MP54-3), y finalmente se deja encubando a 36°C por 24 horas, la interpretación de los resultados se hizo observando el crecimiento post incubación y tomando como referencia el catálogo del proveedor del medio de cultivo.



*Figura 18 Crecimiento bacteriano en Agar MacCONKEY*



*Figura 19 Crecimiento Escherichia Coli en Agar MacCONKEY*

### 5.13 Metabolismo Microbiano

La identificación presuntiva se llevó a cabo mediante un subcultivo en una serie de medios diferenciales cuyos resultados se interpretaron inmediatamente o después de un proceso de incubación. Para la realización de estas pruebas bioquímicas se usaron los siguientes reactivos a los cuales se incorporó cada microorganismo aislado en agar MacCONKEY(AD-MP12-3), teniendo en cuenta las indicaciones de siembra que se presentan en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6

*Descripción del procedimiento para las pruebas bioquímicas*

| PRUEBA                                       | MEDIO/REACTIVO                                                 | PROCEDIMIENTO                                                                                                                    | INTERPRETACIÓN                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Indol y<br/>Motilidad.</b>                | SIM                                                            | Siembra por picadura,<br>con asa recta,<br>incubación a 36°C por<br>24 horas y adicionar<br>dos gotas de reactivo<br>de Kovac's. | <b>Indol+:</b> Anillo cereza en la<br>superficie.<br><br><b>Indol-:</b> Anillo amarillo.<br><br>Movilidad+:Desplazamiento<br>del crecimiento alrededor del<br>inoculo. |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  | <b>K/A:</b> Parte inferior amarilla y<br>superior roja                                                                                                                 |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  | Glu +Lac, Sac –                                                                                                                                                        |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  | <b>A/A:</b> Amarillo Glu-Lac-Sac +                                                                                                                                     |
| <b>Fermentación<br/>de<br/>carbohidratos</b> | Agar Hierro triple,<br>azúcar, glucosa,<br>lactosa y sacarosa. | Siembra mixta e<br>Inoculación de medio<br>con asa redonda y<br>incubar a 36°C por 24<br>horas.                                  | <b>K/K:</b> Rojo, Glu, Lac ,Sac –<br><br>H2S +: Ennegrecimiento<br><br>Gas+: Burbujas                                                                                  |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                        |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                        |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                        |
| <b>Citrato</b>                               | Agar Citrato                                                   | Siembra mixta.<br>Incubación a 37°C por<br>24 horas.                                                                             | <b>Positivo:</b> Azul intenso<br><br><b>Negativo:</b> Verde                                                                                                            |
|                                              |                                                                |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                        |

---

|                 |                       |                          |                                   |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|
|                 |                       | Sobre un portaobjetos    |                                   |
|                 |                       | limpio realice el frotis |                                   |
|                 |                       | de una colonia y         | <b>Positivo:</b> Efervescencia    |
| <b>Catalasa</b> | Peróxido de hidrogeno | adicione dos gotas de    | <b>Negativo:</b> No efervescencia |
|                 | 3%                    | reactivo.                |                                   |

---

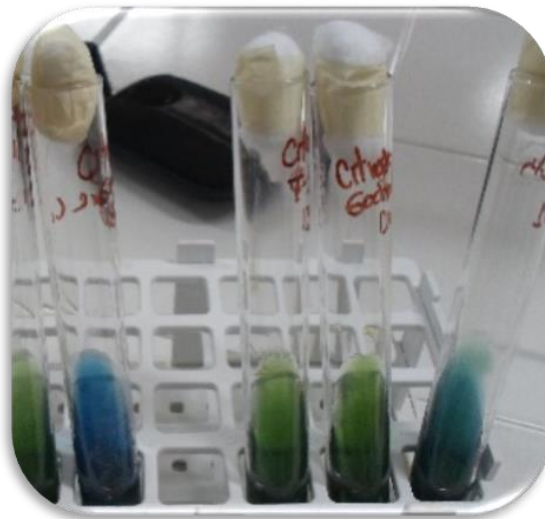
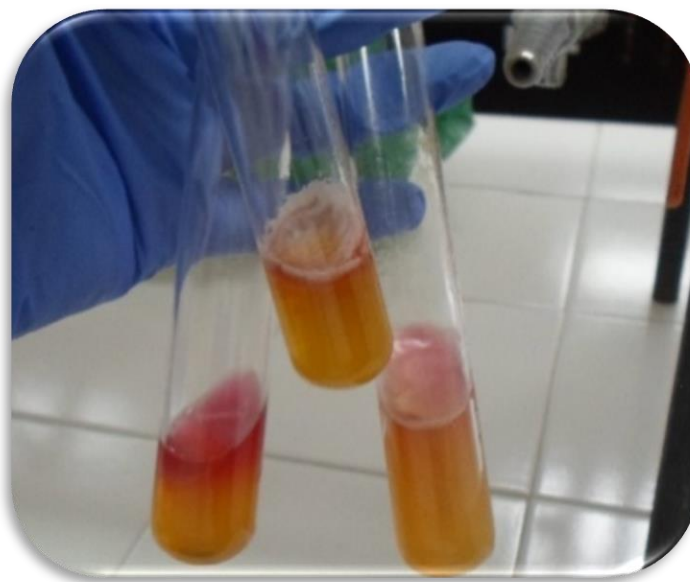


Figura 20 Citrato Azul, positivo y Citrato verde, negativo



Figura 21 TSI, K/A: Roja y Amarilla-A/A: Amarillo-K/K: Rojo



*Figura 22 Medio SIM positivo a Indol*

#### 5.14 Antibiograma

La determinación de la medida de sensibilidad o resistencia del microorganismo a una concentración de un antibiótico, se diluyo la colonia en suero fisiológico y con un hisopo estéril se sembró masivamente sobre el Agar Muller Hinton (AD-MP16-3) para luego repartir e impregnar cada sensidisco con un antibiótico diferente sobre la superficie de la caja y dejar encubar a 37°C por 24 horas. e interpretar los resultados al día siguiente midiendo de inhibición de crecimiento alrededor del sensidisco. Los antibióticos que fueron utilizados para probar la sensibilidad de las bacterias a dicho antibiótico están descritos en la tabla 7.

Tabla 7

*Descripción de los antibióticos usados para el antibiograma*

| ANTIBIÓTICO                    | CONCENTRACIÓN |
|--------------------------------|---------------|
| Disco Amoxicilina/A.Clavulanic | 20/10 mcg     |

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| <b>Disco Penicilina</b>  | 10 mcg |
| <b>Disco Amikacina</b>   | 30 mcg |
| <b>Disco Gentamicina</b> | 10 mcg |
| <b>Disco Cefepime</b>    | 30 mcg |

### 5.15 Morfología Fúngica

Para el estudio microbiológico de los hongos de una muestra, se observaron macroscópica y microscópicamente, así mismo se hizo el conteo de UFC. Para la identificación microscópica se hizo una preparación de cinta engomada, que consistió en colocar una gota de colorante azul de lactofenol, sobre la superficie de un portaobjeto, con una cinta transparente, se presionó suave y firmemente con la parte del pegamento la superficie de la colonia, recogiendo una porción del micelio aéreo y se pegó sobre la gota de colorante evitando la formación de burbujas; finalmente se observó en un objetivo de 40x para identificar las características generales de los hongos.

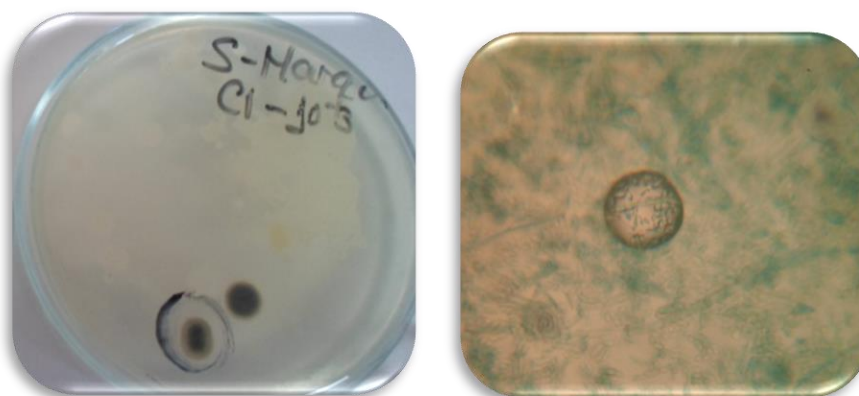
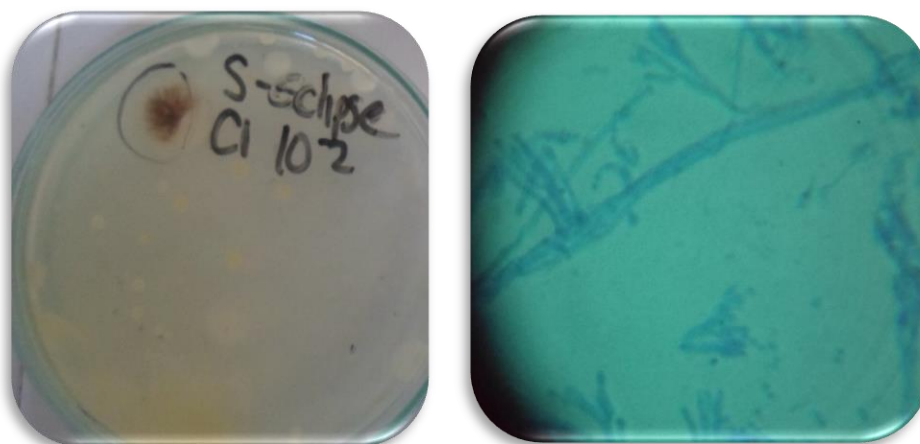
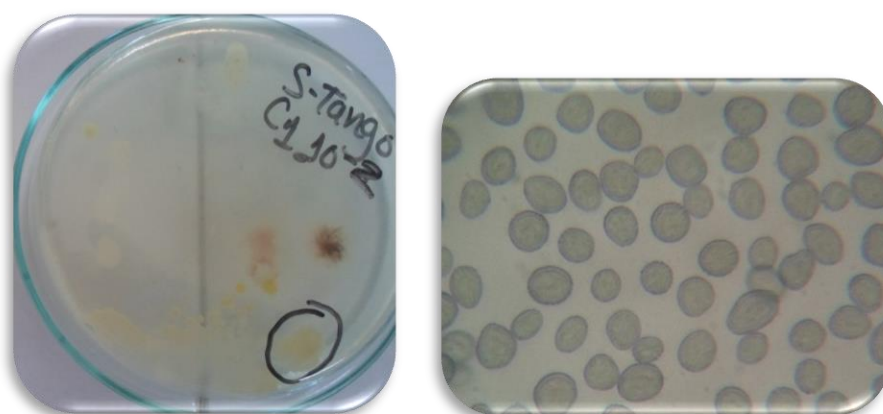


Figura 23 *Aspergillus fumigatus* macroscópicos y microscópicos



*Figura 24* *Penicillium sp* macroscópico y microscópicos



*Figura 25* Morfología macroscópica y microscópica de levadura sp

### 5.16 Análisis Estadístico

La prevalencia de los microorganismos aislados fue calculada como la proporción de casos positivos sobre el total de casos, expresado en porcentaje. Fue realizada una estadística descriptiva, mostrando la media y el error estándar para todas las variables. Mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado se verificó la normalidad de los datos. Para la comparación de las medias entre

los grupos estabulado y no estabulado, se realizó la prueba de Mann-Whitney, considerando un intervalo de confianza del 95%. Para determinar el grado de asociación entre la calidad seminal con la microbiota, fue realizado un análisis de correlación de Spearman entre las variables seminales y la carga de microorganismos (UFC/ml). Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico R® (R versión 3.4.2, 2017-09-28).

## 6. Resultados

### 6.1 Resultados de las Características Espermáticas del Semen

Los resultados de las colectas realizadas en los 7 Caballos Criollos Colombianos (n=14) se obtuvieron los siguientes datos de las características espermáticas (Tabla 8).

Tabla 8

*Descripción de las características espermáticas de Caballos Criollos Colombianos (Media y Error Estándar)*

| VARIABLE                  | MEDIA | E.E. |
|---------------------------|-------|------|
| Volumen (ml)              | 54,86 | 6,44 |
| pH                        | 7     | 0    |
| Motilidad total (%)       | 75    | 3,01 |
| Vigor (0-5)               | 3,25  | 0,20 |
| DMA (%)                   | 37,86 | 3,19 |
| DME (%)                   | 13,29 | 2,48 |
| Morfología Cabeza (%)     | 12,86 | 2,75 |
| Morfología Intermedia (%) | 12,21 | 2,89 |
| Morfo de Cola(%)          | 22,43 | 2.80 |



|                                                 |        |       |
|-------------------------------------------------|--------|-------|
| <b>Defectos totales (%)</b>                     | 51,14  | 4,43  |
| <b>Concentración (sptz x 10<sup>6</sup>/ml)</b> | 169,11 | 24,30 |
| <b>Integridad de membrana plasmática (%)</b>    | 89,07  | 12,51 |
| <b>Membrana plasmática dañada (%)</b>           | 38,79  | 6,32  |

DMA: Defectos mayores, DME: Defectos Menores.

Al evaluar la calidad seminal de los Caballos Criollos Colombianos usados en el experimento, se encontraron diferencias en los defectos de la pieza intermediaria y defectos totales; donde se evidencio que los animales del grupo estabulado presentaban mayor porcentaje de estas anomalías; sin embargo, los defectos de cabeza y de cola no presentaron diferencias significativas entre grupos y en las demás características seminales no se observaron diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla 9

*Medias  $\pm$  error estándar de las características espermáticas del semen in natura de equinos estabulados y no estabulados.*

| VARIABLE                                        | GRUPOS                          |                                 | VALOR DE P |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|
|                                                 | ESTABULADOS                     | NO ESTABULADOS                  |            |
| <b>Volumen</b>                                  | 57,25 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>   | 51,67 $\pm$ 12,82 <sup>a</sup>  | 0,4489     |
| <b>pH</b>                                       | 7,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>    | 7,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>    | 0,4489     |
| <b>Motilidad total (%)</b>                      | 73,13 $\pm$ 4,32 <sup>a</sup>   | 77,50 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup>   | 0,6094     |
| <b>Vigor (0-5)</b>                              | 3,19 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>    | 3,33 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>    | 0,7652     |
| <b>Concentración (sptz x 10<sup>6</sup>/mL)</b> | 157,50 $\pm$ 27,85 <sup>a</sup> | 184,58 $\pm$ 45,28 <sup>a</sup> | 0,8518     |
| <b>DMA (%)</b>                                  | 43,63 $\pm$ 3,61 <sup>a</sup>   | 30,17 $\pm$ 4,10 <sup>a</sup>   | 0,0753     |
| <b>DME (%)</b>                                  | 17,00 $\pm$ 3,58 <sup>a</sup>   | 8,33 $\pm$ 2,20 <sup>a</sup>    | 0,1319     |
| <b>Defectos Totales (%)</b>                     | 60,63 $\pm$ 5,15 <sup>a</sup>   | 38,50 $\pm$ 3,68 <sup>b</sup>   | 0,0073     |
| <b>Morfo Cabeza (%)</b>                         | 15,25 $\pm$ 4,46 <sup>a</sup>   | 9,67 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>    | 0,5534     |

|                                              |                           |                         |        |
|----------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------|
| <b>Morfo Intermedia (%)</b>                  | 17,25±4,13 <sup>a</sup>   | 5,50±1,77 <sup>b</sup>  | 0,0280 |
| <b>Morfo de Cola (%)</b>                     | 25,63±3,72 <sup>a</sup>   | 18,17±3,93 <sup>a</sup> | 0,3283 |
| <b>Integridad de membrana plasmática (%)</b> | 103,75±20,84 <sup>a</sup> | 69,50±2,08 <sup>a</sup> | 0,1419 |
| <b>Membrana plasmática dañada (%)</b>        | 46,13±10,31               | 29,00±3,24              | 0.2398 |

Letras diferentes en la misma línea representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por el método de Mann Withney

## 6.2 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Teniendo en cuenta el conteo de colonias que crecieron en los medios de cultivo utilizados en esta técnica, la aparición de bacterias y hongos presentes en el semen fue mayor en animales estabulados; como se evidencia en la tabla 10.

Tabla 10

*Medias  $\pm$  error estándar del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de Bacterias y Hongos presentes en semen in natura de equinos estabulados y no estabulados.*

| UNIDADES FORMADORAS<br>DE COLONIAS | GRUPOS                      |                            | Valor de<br>P |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------|
|                                    | ESTABULADOS                 | NO<br>ESTABULADOS          |               |
| Bacterias                          | 2015,75±199,09 <sup>a</sup> | 888,17±129,14 <sup>b</sup> | 0,0013        |
| Hongos                             | 1269,88±148,35 <sup>a</sup> | 449,83±60,62 <sup>b</sup>  | 0,0007        |

Utilizando el valor de las UFC de bacterias fueron obtenidas unas correlaciones con las características espermáticas y la carga de bacterias. Fue comprobada una relación significativa entre las UFC y la motilidad espermática, el vigor y la morfología espermática, como puede observarse en la tabla 11.

Por otro lado, otras correlaciones fueron de la cantidad de UFC de hongos con las características espermáticas, mostrando unas correlaciones altas relacionados con los defectos mayores (0.48), específicamente los defectos de pieza intermediaria (0.71) y defectos totales (0.57), además una correlación positiva con UFC de bacterias (0.65).

Tabla 11

*Correlaciones entre cantidad de colonias bacterianas y características espermáticas*

| VARIABLE             | UFC BACTERIAS | VALOR P |
|----------------------|---------------|---------|
| UFC Bacterias        | 1,00          | <0,0001 |
| UFC Hongos           | 0,65          | 0,0186  |
| Volumen              | 0,16          | 0,5825  |
| pH                   | 0             | 0,999   |
| Motilidad Total%     | -0,34         | 0,0233  |
| Vigor (0-5)          | -0,20         | 0,0484  |
| Defectos Totales (%) | 0.60          | 0.0238  |
| DMA (%)              | 0,43          | 0,0123  |
| DME(%)               | 0,39          | 0,0171  |
| Morfo Cabeza(%)      | 0,48          | 0.0855  |
| Morfo Intermedia(%)  | 0,34          | 0.2285  |
| Morfo Cola(%)        | 0.46          | 0.099   |

DMA: Defectos mayores, DME: Defectos menores

### 6.3 Morfología Bacteriana

En las colonias cultivadas en Agar Nutritivo sometidas a proceso de tinción de Gram para la clasificación de los diferentes grupos de bacterias, hubo mayor porcentaje de flora Gram negativa en los dos grupos; en general la forma que más predominó fueron los bacilos y seguidamente que cocos (Tabla 12).

Tabla 12

*Frecuencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en semen in natura de equinos estabulados y no estabulados, cultivadas en Agar Nutritivo.*

| MORFOLOGIA      | GRUPOS      |                |
|-----------------|-------------|----------------|
|                 | ESTABULADOS | NO ESTABULADOS |
| Gram positiva % | 32,14       | 25,00          |
| Gram negativa%  | 67,86       | 75,00          |

En la tabla 13 se muestra el crecimiento de la microbiota mixta de siete muestras de semen de caballo, cultivadas en un medio cromógeno, así mismo se da a conocer el porcentaje de participación que tuvo la bacteria durante el experimento.

Tabla 13

*Frecuencia de la flora Gram negativa y Gram positiva presente en siete muestras de semen equino, cultivadas en medio cromogenico (CHROMagar ORIENTATION)*

| BACTERIA                            | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|-------------------------------------|------------|------------|
| <i>Acinetobacter</i>                | 6/7        | 85,71      |
| <i>Escherichia coli</i>             | 6/7        | 85,71      |
| <i>Enterococcus</i>                 | 7/7        | 100        |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>     | 3/7        | 42,86      |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 5/7        | 71,43      |

#### 6.4 Cultivo de Bacterias

A continuación, se describe el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en el volumen del semen de cada caballo seleccionado en experimento. En donde se contempló un crecimiento bacteriano similar de todos los animales (Tabla 14).

Tabla 14

*Flora Gram negativa y Gram positiva presente en muestras de semen de cada equino cultivadas en medio cromogenico (CHROMagar ORIENTATION).*

| Anima<br>l | Colect<br>a | <i>E.<br/>coli</i> | <i>Acinetobact<br/>er</i> | <i>Enterococ<br/>us</i> | <i>S. epidermis</i> | <i>S.<br/>saprophyticus</i> |
|------------|-------------|--------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|
| C1         | 1           | ✓                  | ✓                         | ✓                       | ✓                   | ●                           |
| C2         | 1           | ✓                  | ✓                         | ✓                       | ●                   | ✓                           |

|    |   |   |   |   |   |   |
|----|---|---|---|---|---|---|
| C2 | 2 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| C3 | 1 | ✓ | ✓ | ✓ | ● | ✓ |
| C3 | 2 | ● | ✓ | ✓ | ✓ | ● |
| C4 | 1 | ✓ | ● | ✓ | ● | ✓ |
| C4 | 2 | ✓ | ✓ | ✓ | ● | ✓ |

✓= Presencia del microorganismo, ●=Ausencia del microorganismo

### 6.5 Agar MacConkey.

Es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento de microorganismo Gram negativos, al usar este medio de cultivo en nuestro experimento pudimos aislar *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, las cuales fueron comprobadas por medio de pruebas Bioquímicas.

Tabla 15

*Frecuencia de bacterias aisladas presentes en siete muestras de semen equino, cultivadas en Agar MacCONKEY medio selectivo y diferencial.*

| BACTERIA                     | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|------------------------------|------------|------------|
| <i>Escherichia coli</i>      | 5/7        | 71,43      |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 3/7        | 42,86      |

### 6.6 Antibiógramas

El grado de sensibilidad de las bacterias para cada antibiótico se determinó como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R). A continuación, en la tabla 16, se observan los resultados del antibiógrama por caballo, observando que por individuo hay diferencias en la resistencia a los diferentes antibióticos, a pesar de ser la misma especie bacteriana. En la tabla 17 se describen los porcentajes generales de sensibilidad, intermedio y resistencia que cada bacteria obtuvo en todos los antibiógramas.

Tabla 16

Resultado de antibiograma para las bacterias aisladas en Agar MacCONKEY

| ANIMAL | Bacteria                        | AMC | AMK | CEF | GN | PN |
|--------|---------------------------------|-----|-----|-----|----|----|
| C1     | <i>E. coli</i>                  | S   | I   | I   | S  | R  |
| C2     | <i>E. coli</i>                  | R   | S   | I   | R  | I  |
| C3     | <i>E. coli</i>                  | I   | R   | I   | R  | R  |
| C4     | <i>E. coli</i>                  | S   | S   | I   | R  | I  |
| C2     | <i>Pseudomona</i><br><i>sp.</i> | S   | S   | S   | S  | S  |
| C3     | <i>Pseudomona</i><br><i>sp.</i> | S   | S   | S   | S  | S  |

AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulinonico, AMK: Amikacina, CEF: Cefepime, GN: Gentamicina, PN: Penicilina, S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente

Tabla 17

Resultados generales de sensibilidad que cada bacteria presento frente a cada antibiótico dado en porcentaje.

| Antibiótico | <i>E. coli</i> |    |    | <i>Pseudomona</i> |   |       |
|-------------|----------------|----|----|-------------------|---|-------|
|             | R              | I  | S  | R                 | I | S     |
| AMC         | 20             | 20 | 60 | 0                 | 0 | 100   |
| AMK         | 20             | 20 | 60 | 33,3              | 0 | 66,67 |
| CEP         | 20             | 60 | 20 | 0                 | 0 | 100   |
| GN          | 40             | 20 | 40 | 0                 | 0 | 100   |
| PN          | 40             | 60 | 20 | 0                 | 0 | 100   |

AMC: c, AMK: Amikacina, CEF: Cefepime GN: Gentamicina, PN: Penicilina, S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente

## 6.7 Mohos y Levaduras

En las muestras de semen cultivadas creció diversos géneros de mohos y levaduras. A continuación, mostramos la frecuencia con la que se observaron estos microorganismos (Tabla 18).

Tabla 18

*Proporción de hongos presentes en semen in natura de equinos estabulados y no estabulados, cultivadas en Agar sabouraud*

| GÉNERO                  | GRUPOS      |                |
|-------------------------|-------------|----------------|
|                         | ESTABULADOS | NO ESTABULADOS |
| <i>Aspergillus sp</i> % | 40          | 50             |
| <i>Fusarium sp</i> %    | 20          | 0              |
| <i>Penicillium sp</i>   | 10          | 16,67          |
| <i>Levadura sp</i>      | 20          | 33,33          |
| <i>Rhodotorula sp</i>   | 10          | 0              |

## 7. Discusión

El semen de equinos contiene flora bacteriana, que en todas las colectas crecieron entre 315 a 2900 UFC/ml. De manera similar, la carga de hongos y levaduras se encontró en el 100% de las colectas entre 260 e 2127 UFC/ml. El origen de estos microorganismos puede ser directamente de las mucosas internas del tracto reproductivo, así como la introducción de microorganismos presentes en el ambiente o del tracto reproductivo de la hembra. La microbiota provenientes del medio ambiente puede ser vehiculizado por la formación de bioaerosoles y contaminar las mucosas de los animales o indirectamente pueden contaminar las muestras posteriormente a la colecta (Lanza, Bustos, Marfil, & Guida, 2018). Por consiguiente, el conocimiento del microbioma en el que habitan los equinos es una herramienta de control importante para minimizar la contaminación del aparato reproductivo del macho.

La mayoría de los eyaculados recolectados en animales sanos se encuentran contaminados con microorganismos. Kristula (2004) afirma que provienen de ambientes internos como la mucosa del prepucio y la uretra o de ambientes externos, los cuales influyen en la fertilidad del semental (Pasing et al., 2013). Como se ha indicado, en condiciones normales, el semen del eyaculado

contiene microorganismos no patógenos, como fue encontrado en el presente experimento. Sin embargo el exceso de carga de microorganismo pueden incidir en problemas de infertilidad (Zalzala et al., 2017).

El conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables en el semen de equinos estabulados sobrepasa los límites permitidos según el Código Zoosanitario Internacional de la OIE-2001 para semen fresco. Cifras elevadas evidencian una alta carga contaminante de bacterias afectando la sanidad reproductiva de estos sementales y muestran la necesidad de tomar medidas urgentes en aras de mejorar la calidad higiénica del semen. El nivel de contaminación, dependerá de la higiene y el cuidado durante la recolección y procesamiento del semen, y de las medidas de saneamiento y desinfección de las pesebreras.

Para la proliferación microbiana se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los dos grupos tanto para hongos como bacterias (UFC/ml). En los animales estabulados el promedio de UFC/ml de bacterias fue de  $2015,75 \pm 199,09$  y en los no estabulados  $888,17 \pm 129,14$ , en el caso de los hongos las UFC/ml reportaron  $1269,88 \pm 148,35$  y  $449,83 \pm 60,62$ , respectivamente para estabulados y no estabulados. El recuento total de aerobios mesofilos y de mohos y levaduras es alto en general, pero como se puede observar en los resultados el promedio se multiplica en animales que habitan en pesebrera las veinticuatro horas del día, en donde por sus condiciones de habitación ellos orinan y defecan en el mismo lugar, beneficiando la proliferación de microorganismo patógenos o no patógenos, caso que no ocurre en equinos sueltos en potrero. para equinos no se reporta esta variable en semen fresco. Restrepo et al (2016) encontraron que la reducción en la proliferación de colonias bacterianas en semen congelado por efecto de las preparaciones antibiótica respecto a la muestra control; en cuanto a los hongos no hubo diferencias en la



proliferación por efectos de los antibióticos (Restrepo & Dúque, 2016), debido a que la mayoría de los diluyentes no contienen agentes antimicóticos en su preparación.

El porcentaje de bacterias Gram negativas fue mayor para ambos grupos, al tomar siete muestras de semen para la siembra en agar mixto, se reportó el crecimiento de bacterias del genero *Enterococcus* en todas las muestras, la *Escherichia coli* y *Acinobacter*, obtuvieron el mismo porcentaje de crecimiento, seguido de las especies del genero *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus saprophyticus*, al hacer el aislamiento en agar selectivo para bacterias Gram negativas este nos reporta crecimiento de colonias de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeuroginosa*, a las cuales se realizaron pruebas bioquímicas para conforma el metabolismos eficiente de las bacterias

En el semen equinos se ha reportado una moderada incidencia del genero *Corynobacterium* y *Stafilococus*, de igual forma se reporta una baja incidencia de microorganismos de la familia de las *enterobacteriaceae*, y bacterias como la *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus equi* entre otras (Madsen & Christensen., 1995).

En la mayoría de estudios, las bacterias comúnmente aisladas fueron *Staphylococcus spp*, *Streptococcus* y *Escherichia coli*. La mayoría de estas bacterias se consideran no patógenas, sin embargo *Streptococcus zooepidermicus* y *Escherichia Coli* se consideran de patogenicidad cuestionable; a menudo se asocian con una reducción en la fertilidad causado por la endometritis. (Rota et al., 2011).

El análisis de la calidad microbiológica del semen es un aspecto fundamental en programas de reproducción con monta natural, debido a la presencia de estos microorganismos saprofitos y patógenos causan disminución de la calidad seminal sin demostrar signos clínicos, ni afecciones

genitales en los machos, y si pueden afectar la fertilidad y transmitir enfermedades a la hembra o caso contrario.

Los machos en el momento de la cobertura están transmitiendo a las hembras una carga de microorganismos de su flora normal y del microbioma ambiental y los están depositando en el ambiente uterino. Por el lado de las hembras, va a depender de la capacidad de reacción inflamatoria del útero para resolver la infección y conseguir mantener o iniciar una gestación.

La microbiota presente en el semen no afectó la motilidad, el vigor espermático, ni la concentración, pareciendo que estos animales fueran asintomáticos. Sin embargo, si afecta la morfología espermática, que tiene mayor impacto en la fertilidad. A pesar que otros autores señalan que la presencia de altas cargas microbianas está relacionada con la pérdida de motilidad espermática, reducción de la fecundación y muerte embrionaria Martínez et al., (1984). Destacan la importancia del análisis microbiológico, porque en ocasiones el semen de buena motilidad puede tener altas cargas bacterianas y afectar su fertilidad.

Al comparar los datos de la calidad seminal entre los grupos de animales confinados y no confinados no hubo diferencias mayores en estas variables, pero si se observaron anomalías en cuanto a la morfología de los espermatozoides, pues esta varió notoriamente entre grupos.

Si confrontamos las variables que se evalúan inmediatamente en la muestra de semen, entre los dos grupos, podemos percibir, que el promedio del volumen fue mayor en el grupo de los equinos criados en pesebrera que en el de los machos en potrero, aunque dicha diferencia no es significativa, pues la cantidad de eyaculado puede variar de 30 hasta 250 ml, dependiendo de las características individuales, la edad, la producción espermática, la época del año, la frecuencia de montas y el método de recolección. (Bustos & Rodríguez, 1996). El volumen del semen fue mayor en caballos estabulados porque son animales reproductivamente activos y están en contacto

permanente con la hembra para la estimulación y son mejor alimentados, caso contrario con los que se encontraban en las fincas, sin embargo todas las muestras se colectaron en época reproductiva en donde la producción de semen es más alta debido a las horas luz; para (Roman, S,f) la mayoría de los ejemplares producen entre el 50 y un 75% de esperma al principio de la etapa de la reproducción.

Al medir con tiras de pH la fracción de semen libre de gel este fue de 7,0 para todas las muestras al igual como lo reporta (Pérez et al, 2017). Existen algunos factores que pueden influir sobre el pH normal del semen tales como la frecuencia de eyaculación y la concentración espermática entre otros como la infección de las glándulas accesorias; un pH, alto se puede asociar a contaminación del eyaculado con orina o jabón (Boeta, Díaz, & Hayen, S,f). Lo que nos demuestra que durante la colecta no hubo contaminación con orina.

Estimar la motilidad de los espermatozoides, es determinar la proporción de células que se mueven progresivamente. En un semental fértil normal debe tener una motilidad progresiva inmediata  $\geq 60\%$  (Rodríguez, Ambrosius, & fumuso, 2018). Valores menores de 50% son muy indicativos de infertilidad (Goldman, 2001). En el experimento el porcentaje fue del 77,5% para los animales no estabulados y los estabulados del 73,13%, fue alto para los dos grupos lo que proyecta una fertilidad alta en los ejemplares (Werli, 2010). A esto se suma la eficiente velocidad en el que las células atraviesan el campo en forma de ondas (Vigor), para los dos grupos el rango fue 3 considerando como un valor intermedio.

Los valores de concentración espermática media, fluctúan entre los 150 a 300 millones/ml, (Hafez y Hafez, 2000), al confrontar los valores de cada grupo constatamos de que estos están dentro del rango anteriormente expuesto, pero el promedio vario notoriamente siendo mayor en animales no estabulados los que a su vez presentaron menor volumen, estas dos variables presentan

inestabilidad debido a un mayor número de variantes como la edad del animal, el tamaño testicular, el método de colecta, entre otros, (Mocé & Grahman., 2008). Sin embargo, la evaluación del volumen y de la concentración espermática son fundamentales en la estimación del número total de espermatozoides eyaculados, parámetro empleado en la determinación del número de dosis destinadas a la inseminación artificial, y por tanto, en la evaluación del rendimiento del eyaculado o de un semental (Cuevas A. B., 2013).

Las anormalidades de los espermatozoides pueden clasificarse en mayores/menores o primarios y secundarios, los defectos mayores son aquellos que provienen del testículo durante la espermatogénesis, mientras que las anormalidades secundarias se considera que ocurren después de que los espermatozoides abandonan el testículo. Al observarlos al microscopio debemos tener presente que los espermatozoides del equino normal difieren de otras especies domésticas, ya que la unión abaxial de la pieza intermedia presenta una leve asimetría en la cabeza, un menor volumen acrosomal y finalmente un menor tamaño de la cabeza.

Se pudo observar múltiples variables que evalúan la morfología espermática y por consiguiente sus anormalidades con más detalle en cada estructura espermática. En donde el promedio fue menor para el grupo de equinos criados en ambiente natural que en los confinados, aunque no hubo diferencias representativas de un grupo a otro en la mayoría de las variables; si se afectaron los defectos totales y los defectos de pieza intermediaria los cuales presentaron diferencias significativas, en donde el valor de P fue  $<0,05$ .

La correlación entre la morfología y la fertilidad no ha sido totalmente establecida en equinos (Blanchard et al., 2002), sin embargo, se conoce que es uno de los factores que más impacta en la fertilidad, principalmente los defectos mayores. El eyaculado del caballo, no presenta un porcentaje bajo de morfoanomalías, llegando a superar el 20% de las anomalías en sementales

fértiles; se sabe que determinados defectos morfológicos, tales como gotas citoplasmáticas, colas dobladas tiene un efecto menor sobre la fertilidad que otros como cabeza suelta, formas anormales de la cabeza o pieza intermediara. A si mismo existe una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides normales y la motilidad espermática (Varner, 2008). Por ejemplo defectos en la cola o diferencias geométricas en la cabeza pueden generar un movimiento anormal que incapacite al espermatozoide para su progresión en el aparato genital de la hembra y la posterior fecundación (Dresdner & Katz., 1981).

Para los reproductores muestreados el promedio de viabilidad estuvo por encima de la media de los espermatozoides muertos para los dos grupos, sin embargo, el resultado de esta variable fue mejor en animales estabulados. El plasma seminal tiene como función proporcionar un medio de transporte y ayudar a mantener la viabilidad de los espermatozoides y debido al aumento de volumen genera una distribución uniforme dentro del cuerpo y los cuernos uterinos.

La morfología y la viabilidad tienen una relación directa pues los espermatozoides que presentan daño en la membrana acrosomal, o que haya sufrido reacción acrosomal tienen la misma incapacidad de fecundar que uno no viable o uno no motil (Spizziri, Bruemmer, & Grahan, 2010).

Las anteriores técnicas de evaluación espermática ayudan al productor a conocer la capacidad fecundante del garañón, al cual se le exige el máximo rendimiento físico, vigor y coraje en su trabajo, a la vez a sus espermatozoides se someten a duras pruebas, porque al momento de penetrar el tracto reproductivo de la hembra solo uno entre millones el cual debe ser mejor dotado, el más fuerte, y el más rápido será el que alcance la fertilización.

La contaminación microbiana del semen es un parámetro de calidad que se utiliza para asegurar el éxito de la inseminación artificial, la flora bacteriana del semen son las que se encuentran como

saprophytas en la superficie del pene y del prepucio, o bien pueden provenir de los testículos, epidídimo.

La realización de exámenes microbiológicos del semen ayuda a mejorar los índices de fertilidad del animal, ya que como se comprobó existe una gran variedad de microorganismos presentes en el eyaculado y en los órganos genitales que hacen parte del sistema reproductivo del macho como, son los testículos, el pene, la uretra y el prepucio. la cantidad de microorganismos presentes pueden desencadenar afecciones a los genitales y signos clínicos en la hembra y en el macho por contaminación a su sistema reproductivo.

La contaminación del semen puede producirse por diferentes vías, durante la colecta o como se dijo anteriormente puede provenir del aparato genito-urinario y durante el procesamiento de la muestra. Al momento de la monta, corre una gran variedad de microorganismos, pertenecientes a la flora normal o a la microbiota del ambiente, los cuales son depositados directamente en el útero lo que de acuerdo al sistema inmunológico de la hembra puede generar o no infecciones sanitarias del tracto reproductivo y por ende bajas tasas de fecundación. (Bielanski, 2007).

Al usar técnicas como la monta directa, estamos predisponiendo al garañón a que su sistema reproductivo se contamine con infecciones causadas por microorganismos patógenos presentes en el tracto reproductivo de la hembra y a su vez este contamine a otras yeguas, es por esto que se recomienda la técnica de Inseminación artificial ya que emplea un mejor control sanitario.

Para (Conza, Calle, Echevarria, Falcon, & Ceron, 2004) las bacterias *Pseudomona aeuroginosa* y *Escherichia coli*, que son las mismas que se aislaron en el presente estudio, han sido asociadas con alteraciones en la calidad seminal, la *E. coli* tienen efecto espermicida y que además podría ser la causa de aglutinación espermática en el eyaculado; así mismo es responsable de la disminución de los parámetros de motilidad y vitalidad de las células espermáticas La presencia

de la *Pseudomona* está relacionada con la pérdida de motilidad espermática, reducción de la fecundación y muerte embrionaria.

En la mayoría de los estudios la *E. coli*, es el patógeno más comúnmente reportado, y es la causante de inhibir la movilidad de los espermatozoides seleccionados, A si mismo se demostró que causa daños estructurales de los espermatozoides que se correlacionan con disminución en movimiento espermático (Morales, Echevarria, & Villeda, 2018). Es por esta razón podemos afirmar que en nuestro estudio la presencia de esta bacteria está fuertemente relacionada con los resultados de la morfología espermática y los defectos totales de las células espermáticas

De la población de hongos que crecieron en las muestras de semen, podemos inferir que al igual que las bacterias, el grupo con mayor participación de géneros fue en donde se encontraban los animales confinados. La mayoría de estas especies aisladas son saprofitos, es decir que se alimentan de materia orgánica, o de otros organismos muertos en descomposición, es por esto que los equinos aislados en pesebreras fueron más sensibles o predispuestos a este tipo de infección ya que ellos orinan y defecan en el mismo lugar donde el animal pasa el mayor tiempo. Hay que tener en cuenta que cada género posee diferentes especies las cuales se diferencian unas a otras por las características morfológicas. Restrepo et al (2016) reporta la presencia de mohos y levaduras como la *Cándida albicans*. en semen de los equinos.

De los resultados se pudo observar que hay diferencias en las especies de mohos y levaduras entre grupos estabulado y no estabulado, además hubo más especies de hongos en los animales estabulados. El principal hongo encontrado es el *Aspergillus sp* en ambos grupos, seguido por las levaduras.

Una relación interesante fue encontrada entre la carga de UFC/ml de hongos y su efecto sobre la morfología de la pieza intermediaria, estos valores tuvieron una alta correlación (0.71,  $p=$

0,0044). Además de encontrar que, a mayor cantidad de bacterias, mayor cantidad de hongos estaban presentes en los eyaculados. Al parecer la microbiota presente en el semen afecta la morfología de los espermatozoides, debido a la competencia por el mismo sustrato y por el efecto nocivo que los metabolitos bacterianos provocan en la membrana mitocondrial y alterando el metabolismo espermático (Acosta et al., s,f).

Existe una serie de patógenos ya sea virus, bacterias y hongos que han sido identificadas u asociadas con el semen, algunos de estos microorganismos tiene la capacidad de adherirse a la superficie de los espermatozoides y otros pueden asociarse con el plasma seminal o con las células presentes en el semen y de esta manera causar daños en el espermatozoide (HARE, 1985).

Por otra parte, varios autores afirman que las infecciones causadas por bacterias y virus propician las condiciones óptimas para el desarrollo de infecciones por hongos, las cuales la mayoría son asintomáticas, aunque se han reportado que pueden generar lesiones, úlceras genitales, inflamación escrotal y afectar negativamente la calidad seminal. El 90% de la micosis reportadas son ocasionadas por la *Candida spp*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus* y *Coccidioides spp*; que el contacto de estos con el semen afecta a la movilidad, viabilidad y funciones mitocondriales de los espermatozoides por lo anterior podemos decir que la presencia de estos géneros tienen una relación con el potencial reproductivo del macho (Castrillón, 2016).

Lanza (2018), en su investigación sobre la composición fúngica de bioaerosoles ambientales en corrales, equinos encontró que los géneros que más predominó en las muestras fue *Cladosporium* sp, el cual se encuentra con mayor incidencia en el medio ambiente y en los hisopados nasofaríngeo. Otros como el *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarios* sp, son frecuentemente aislados de cultivo de aire espirados o de muestras nasofaríngeas del caballo; El ingreso vía nasal de agentes micóticos por medio de bioaerosoles puede ser relevante si se tiene en cuenta que



pueden desencadenar respuestas de hipersensibilidad que comprometen la salud de los animales. Por lo anterior expuesto por (Lanza, 2018) podemos afirmar que en el medio ambiente existen microorganismo los cuales colonizan las mucosas de los animales generando o no signos patológicos que alteran su productividad, así mismo se debe considerar que el cambio es un factor influyente en la composición de la micota ambiental.

Los antibióticos son utilizados en los diluyentes con el fin de controlar la proliferación de microorganismo y reducir el riesgo de endometritis en las hembras inseminadas con estos eyaculados, por lo cual ante un aislamiento siempre debe realizarse un antibiograma (Losinno, Córdoba, & Fumso, s,f).

En el estudio se aisló bacterias del genero *E. coli* y *Pseudomona aeuroginosa*, en cuatro caballos Criollos colombianos, las cuales se sometieron a pruebas de antibióticos para determinar la sensibilidad o resistencia que tiene cada ejemplar para utilizarlos eficientemente, La susceptibilidad de la *E. coli* fue intermedia para la amoxicilina + acido clavilínico en los cuatro ejemplares, en los demás antibióticos vario el resultado de acuerdo con el semental. El caso de la *Pseudomona* fue sensible para el grupo de antibióticos usados en el experimento.

Los antibióticos y antimicóticos son utilizados en la criopreservación y en la refrigeración del semen en equino con el fin de controlar la proliferación de microorganismos, sin embargo esto puede tener efectos negativos sobre los espermatozoides, pues produce una disminución en la movilidad espermática pos descongelación. (Restrepo & Dúque, 2016), su adición es obligatoria en las diluciones de semen, como medida preventiva para la reducción de contaminantes en las dosis inseminantes (ELAZHARY, 1980).

La gentamicina, es un antibiótico que posee un espectro antimicrobiano principalmente a bacterias Gram negativas como la *Pseudomona aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus serratia*; y a la Gram

positivas *S. aureus*, *S. epidermis* entre otras. (PEDIAMÉCUM, 2015). La gentamicina, ampliamente utilizada en los diluyentes para semen equino, ha presentado efectos negativos en la movilidad y la velocidad de los espermatozoides durante la refrigeración y el almacenamiento prolongado (Aurichv & Spergser., 2007). La combinación de penicilina potásica y sulfato de amikacina no afecta la motilidad espermática, proveyendo de mayor espectro de actividad antibacteriana en semen refrigerado. (Jaramillo, Cristina, & Saltos, 2007).

Comprobar la efectividad de los antibióticos empleados para disminuir el crecimiento bacteriano es un punto fundamental en programas reproductivos que quieran implementar el uso de semen refrigerado o congelado. El uso de diluyentes se ha constituido como una alternativa para compensar las deficiencias antioxidantes del semen equino durante su congelación, además busca garantizar la máxima viabilidad y fertilidad posible del semen crio preservado. (Duque, 2016)

Sin embargo el o los antibióticos más apropiados para usar pueden variar entre sementales, dependiendo de la flora bacteriana en sus eyaculados y el efecto que los antibióticos pueden ejercer sobre la motilidad espermática después del enfriamiento y almacenamiento (Jaramillo, Cristina, & Saltos, 2007).

En los objetivos se quizó dar a conocer cómo influye la presencia de microorganismos en la calidad seminal y como estos afectan los parámetros de calidad espermática en grupos de animales estabulados y no estabulados, para identificar el efecto del ambiente sobre las características reproductivas y microbiológicas. Según Cerna (2017) los análisis de calidad seminal cumplen un rol fundamental como instrumentó cuantitativo y cualitativo sobre el estado del reproductor, técnicas como los espermogramas y espermocultivos brindan información de los parámetros seminales y de los microorganismos que podrían afectarlo.

Existen varios métodos para estudiar la microbiota presente en el semen, no obstante, presenta grandes limitantes como la dificultad en el cultivo, la caracterización de la especie y el proceso de obtención de muestra, es por esto que requiere de un profesional con experiencia en el procesamiento de muestras para microbiología y de equipos y materiales de alto costo.

## 8. Conclusiones

En este estudio se concluye que analizar el semen de Caballos Criollos Colombianos, es fundamental para detectar la presencia y la carga de microorganismo patógenos y no potogenos con efecto deletéreo sobre la calidad seminal y espermática.

Técnicas como la monta directa, la manipulación del semen y el medio ambiente son factores causantes de la proliferación y crecimiento de microorganismos en las mucosas y órganos del aparato reproductivo del macho, causando problemas sanitarios y de fertilidad.

La calidad seminal presenta diferencias entre los equinos estabulados con actividad reproductiva, en comparación con el grupo no estabulados e inactivos reproductivamente. Se evidencio notoriamente en la morfología espermática de estos dos grupos, la influencia de la carga de microorganismos presente.

El hallazgo observado de bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomona aeuruginosa*, incidieron en la morfología del espermatozoide, principalmente encontrando un aumento de los defectos mayores, afectando la pieza intermediaria, encargada del metabolismo espermático y es un defecto que afecta directamente la fertilidad del semen.

En el género de los hongos, los que presentaron mayor representatividad fueron los *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Penicillum sp*, *Levadura sp* y *Rhodotorula sp* los cuales están relacionados con

problemas sanitarios en los órganos urogenitales, disminución de la calidad seminal, metritis e fertilidad en la especie equina.

🕒 El antibiótico que mostro mayor sensibilidad fue la Amoxicilina + Ácido Clavulinc, el cual sería el mas eficiente para combatir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* presentes en el eyaculado de los equinos.

🕒 A pesar de la adecuada higienización de los materiales de colecta, la limpieza en el pene y el prepucio de macho, estas prácticas pueden minimizar el crecimiento bacteriano mas no eliminan totalmente la presencia de microorganismos en el eyaculado.

## 9. Recomendaciones

🕒 Establecer un sistema de manejo semiestabulado ayudaría a disminuir la proliferación bacteriana presente en el entorno y a su vez la contaminación de microorganismo a animales susceptibles.

🕒 Hacer cultivos microbiológicos del ambiente en donde los animales habitan para conocer la microbiota presente y como incide está en la calidad de vida de los animales.

🕒 Hacer hisopados del tracto genitourinario del macho para saber en qué región hay más proliferación de microorganismos.

🕒 Hacer un estudio del tracto reproductivo de la yegua para conocer la microbiota y compararla con la encontrada en el macho.

- 🕒 Mejorar la higienización del pene y prepucio del macho usando productos más fuertes teniendo en cuenta que no afecta las mucosas del aparato reproductivo, la calidad del semen y la población microbiana.
- 🕒 Usar medicamentos homeopáticos para mejorar la calidad seminal y aumentar los mecanismos de defensa de los animales.
- 🕒 Adicionar productos que ayuden a disminuir las infecciones por hongos y que estos no incidan en problemas de metritis en yeguas.

### Referencias Bibliográficas

- A.Quiles. (2016). *Efecto de las micotoxinas en la reproducción porcina*. Recuperado de .  
<https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15114/articulos-porcino/efecto-de-las-micotoxinas-en-la-reproduccion-porcina.html>
- Aceros, P. (Ed). (s.f). *Planificación y Manejo de la Explotación Equina*,Valladoild,México: Consejería de Agricultura y Ganaderia.
- Acosta. (1997). *Inseminación artificial en equinos* (Tesis de pregrado). Universidad Autonoma Agraria "Antonio Narro".Coahuila,México.
- Acosta y Alvares. (2010). *Estudio retrospectivo de cultivos endiometriales determinado los agentes bacterianos y su resistencia o sensibilidad a un grupo de antimicrobianos en yeguas* (Tesis de pregrado).Universidad de la Salle,Bogotá,Colombia.
- Acosta, S. (2005). Enterococcus. *Codeinep*,5(3),1-16.
- Agüero. (2012). *Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado* (Tesis de postgrado).Universidad central,Caracas, Venezuela.
- Ahumada y Ramirez. (2018). *Enfermedades virales y bacterianas que causan abortos en yeguas*.(Tesis de pregrado).Universidad Coperativa de Colombia,Villavicencio,Colombia.
- Aitken et al. (2012). *The Simmet Lecture: New Horizons on an Old Landscape – Oxidative Stress, DNA Damage and Apoptosis in the Male Germ Line*. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2012.02049>.
- Alice, Lopez, & Cartín.(1979). Staphilococcus Saprophyticus. *Revista Medica de Costa Rica*,Vol,468, 120-121.
- Amann & Pickett. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.*Elsevier*,7(3),145-173.
- Anzola et al. (2007). Buenas prácticas de bioseguridad en centros productores de embriones y semen. Bogotá,Colombia: Imprenta Nacional de Colombia.

Aponte y Sanchez. (s,f). Generalidades de la micologia. *Vladech*,01(5),1-7.

Aurichv & Spersger. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Elsevier*,67(5),912-918. 912-918.

Bailón, Cervantes, & González, (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. Recuperado de <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>.

Balitán, Blanco, Cabrera, & Hernández. (2015). Factores asociados a la baja calidad del esperma. *Revista Universidad y Ciencia*,8(12),13-26.

Barrero, L. (s,f). Microbiología Clínica. En L. Barrero. Madrid, España: Síntesis, S.A.

Betancur, Úsuga, & Rojano. (2013). Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*,8(1),69-81.

Bielanski. (2007). Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Elsevier*,68(1) 1-22.

Biro et al. (2003). Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A challenged boars. *Elsevier*,60(2),199-207.

Blanchard et al. (Ed). (2002). Manual de reproducción equina. Texas, Estados Unidos: Mosby.

Blanco. (2002). *Evaluación bacteriológica de semen de verracos aparentemente sanos según el sistema de crianza semitecnificada* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Boeta, Díaz, & Hayen. (s,f.). *Manual de la práctica de profundización en reproducción equina*. Recuperado de: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales\\_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Equinos.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Equinos.pdf)

Briceño, K. (s,f). *Pruebas bioquímicas: tipos, para qué sirven e importancia*. Venezuela: Lifeder.com. Recuperado de <https://www.lifeder.com/pruebas-bioquimicas-microbiologia>.

- Bustos & Rodríguez. (1996). Seasonality and freezability vs routine parameters in stallion semen. *Histology and Histopathology*,11(1) 427-430.
- Buzón.(2013). *Analisis cinetico y morfometrico del espermatozide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyser*(Tesis de doctorado).Universidad de Córdoba,Córdoba,Colombia.
- Camacho. (2014). *Evaluación de los diluyentes inra 82 y botucrio para la criopreservación espermática de caballos criollos colombianos*(Tesis de pregrado).Universidad de la Salle,Bógota,Colombia.
- Camacho et al. (2009).*Cuenta en placa de bacterias*.Recuperado de [http:// depa . fquim.unam.mx/ amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa\\_6527.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf)
- Campero, C. (s,f). Rol de la hembra en las enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan la reproducción en el bovino. *Inia*,101(2),6-10.
- Cardona y Cure. (2001). Aislamiento de *Rhodotorula* sp. en un paciente críticamente enfermo. *Infectio*,5(3),179-182.
- Cardona, Cadavid., & Berdugo. (2007). Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Scielo*,32(4),443-445.
- Carrillo,L.(s,f).*Penicillium*.Recuperado <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files.pdf>
- Castillo et al. (2016). Valores hematologicos en caballos criollos Colombianos del Valle de Aburra.*ResearchGate*,367(3),245-261.
- Castrillón et al. (2016). Infecciones micóticas del tracto urogenital masculino, importantes aunque poco frecuentes: revisión sistemática.*ResearchGate*,27(6),527-538.
- Casuey et al. (2008). Pathologic Effects of Clinical UterineI nflammation on the Equine EndometrialMucosa.*Theriogenology*,54(3),276-277.
- Cataño, E. (2010). *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance.*Iatreia*,23(3),240-249.



- Cerna, M. (2017). *Identificación de las bacterias aisladas de muestra seminales en pacientes con problemas de fertilidad utilizando el sistema automatizado vitek 2 durante 2016* (Tesis de licenciatura). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.
- Chávez, S. A. (1998). *Optimización de la producción del agente de biocontrol* (Tesis de doctorado). Universidad de Lleida, Lleida, España.
- Clément, Vidament, & Guérin. (S,f). Microbial Contamination of stallion semen. *Biology of reproduction*, 52(1), 779-786.
- Conza et al. (2004). Evaluación Bacteriológica en verracos usados como reproductores en granjas porcinas de la zona de Lurín, Lima. *Rev Inv Vet Perú*, 15(2), 163-165.
- Cuevas. (2013). *Análisis cinético y morfológico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer* (Tesis de doctorado). Universidad de Córdoba, Córdoba, Colombia.
- Dalmau, C. S. (s,f). Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. Recuperado de <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/40091/38520>
- DATABIO. (2012). *Aspergillus* spp. Recuperado de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/contenidos/fichas%20de%20agentes%20biologicos/Aspergillus%20spp.pdf>
- DATABIO. (2016). *Pseudomonas* spp. Recuperado de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudomonas%20aeruginosa%202017.pdf>
- DATABIO. (s,f). *Candida albicans*. Recuperado de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Candida%20albicans.pdf>
- Díaz, N. (2010). Características del eyaculado equino y sus variaciones. *Ciencia y Tecnología ganadera*, 4(1), 23-30.
- Dorado et al. (2013). Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: effects of body weight, age, and semen quality. *Elsevier*, 79(7), 1100-1109.
- Dresdner & Katz. (1981). Relationships of Mammalian Sperm Motility and Morphology to Hydrodynamic Aspects of Cell Function, *Biology of reproduction*, 25(5), 920-930.

- Duque, R. (2016). Criotolerancia de Semen Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente. *Revista Investigación veterinaria Perú*,28(1), 120-129.
- Elazhary.(1980). Bovine Herpesvirus Type 1 in the Sperm of a Bull From a Herd With Fertility Problems. *Can.Vet*,21(2),336-339.
- Etcheverry, M. (2009). Exportación de genética bovina: Diagnostico de situación, fortalezas y debilidades para competir en el mercado internacional.*Sitio Argentino de Producción Animal*,11(43),4-14.
- Fernandes, G.(2012). *Efeito antibacterianos na qualidade espermatica e na microbiota do semen ovino* (Tesis de maestria).Universidad de Brasília,Brasília,Brasil.
- Fernández et al. (2010). *Procedimientos en microbiología clinica*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Fernández, Silveira, & López. (2006). Las infecciones uterinas en la hembra. *Revista electronica de veterinaria*,7(10)1-8.
- Forbes, B. (2007). *Diagnostico microbiologico*.Texas,Estados Unidos:Médica panamericana.
- Gamiño, Barrios, Cardenas, & Anaya. (2005). Flora norma,probióticos y salud humana. *Acta Universitaria*,15(3),34-40.
- Goldman, B. (2001). Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *PubMed*,16(4), 283-301.
- Gomez y Migliorisi. (s.f). protocolo para la evaluación de semen en rumiantes.*Sitio Argentinode producción Animal*.15(5),1-9.
- Hernandez. (Marzo de 2011). *Manejo reproductivo en equinos*(Tesis de pregrado).Universidad Autonoma Agraria "Antonio Narro",Coahuila,México.
- Hernandez, B. (2017). la contaminación bacteriana del semen de ecos recogido mediante vagina artificial. *Redvet*,18(12)1-9.

- Hidalgo, T. (s,f). *Análisis del semen bovino*. Información ganadera, Recuperado de: <https://ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/192/1/Archivo.pdf>
- Hylary, Q.G. (2014). *Pruebas bioquímicas*. Recuperado de <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/pruebas-bioquimicas.html>.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2017). *Censo pecuario nacional*. Recuperado de <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>
- Instituto Colombiano Agropecuario. (S,f). *Material Genético*. Recuperado de <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/bioseguridad-y-recursos-geneticos.aspx>
- Jaramillo, Cristina, & Saltos. (2007). *Efectos de la centrifugación en la motilidad espermática del semen equino refrigerado* (Tesis Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- Lanza, B. M. (2018). Composición fúngica de bioaerosoles ambientales en corrales. *Rev Inv Perú*, 29(4), 1475-1480.
- Leixelard, M. A. (2005). *Caracterización andrológica de potros de raza Chilota* (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Loomis & Graham. (2018). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Elsevier*, 105(2) 119-128.
- López y Torres. (2006). *Medios de Cultivo*. Recuperado de [www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf)
- López, Castillo, & Salavert. (S,f). *Técnicas de identificación*. Recuperado de <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>
- López, J. (s,f). *semen*. *R. Vet*, 1. Recuperado de <https://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/macho/fisiologia-reproductiva-del-macho/semen>
- Losinno, Córdoba, & Fumso. (s,f). *Infecciones de transmisión sexual en equinos*. Recuperado de [http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Fisiopatologia-de-la-Reproduccion/images/Documentos/2016/Infecciones\\_de\\_transmision\\_sexual\\_en\\_equinos\\_1.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Fisiopatologia-de-la-Reproduccion/images/Documentos/2016/Infecciones_de_transmision_sexual_en_equinos_1.pdf)

- Love, v(2000). variación intra e inter-semental en la morfología del esperma y su relación con la fertilidad. *PubMed*,5(56) 93-100.
- Loving, N. (2006). *Todos los sistemas del Caballo*. Barcelona,España: Hispano Europea, S.A.
- Lozano, Velasco, Pacheco, & Peña (2018). Impacto de *Staphylococcus epidermidis* en el testículo murino. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*,2(38) 10-14.
- Madsen & Christensen. (1995). Flora bacteriana del semen recolectada de sementales de sangre caliente daneses por vagina artificial. *PubMed*,36(1) 1-7.
- Marcos, A. (S,f). *Acinetobacter baumani*. Control Calidad SEIMC. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/acinetobacter.pd>.
- Martinez, H. A. (2007). *Propuestas de guia de aplicación de tecnicas de microbiologia(Bacterias y Hongos)Para ser utilizado en Microbiologi general* (Tesis de licenciatura).Universidad de el Salvador, San Salvador,El Salvador.
- Martinez, M. y. (2015). Aislamiento de *Rhodotorula*. Presentación de un caso en paciente con leucemia mieloide aguda.*Medisur*,11(5),542-545.
- Mendell, H. (2013). Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. *BIOMEDICA Revista del Instituto Nacional de Salud*,34(10),21-22.
- Mesa, A. M. ( 2010). Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba*,17(1),2908-2915.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2014). *cadena equina,asnal y mular*. Recuperado <https://sioc.minagricultura.gov.co/Equino/Documentos/005%20%20Documentos%20T%C3%A9cnicos/Diagnostico%20Cadena%20Equina,%20Asnal%20y%20Mular.pdf>
- Montoya, A. I. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*,15 (2),145-169
- Morales et al. (2007). Sperm DNA fragmentation and implications for fertility. *Revista Iberoamericana de fertilidad*.24(5),305-313.

- Morales, Echevarria, & Villeda. (2018). Microorganismos patógenos productores de alteraciones seminales relacionadas con infertilidad. *ScienceDirect*. 31(3), 131-143
- Morrell & Wallgren. (2014). Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders. *PubMed*. 3(4), 934-946.
- Nieves y Salazar. (2005). *Acinetobacter spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos*. Recuperado de <https://medicina.ufm.edu/wpcontent/uploads/2017/03/Acinetobacter.pdf>
- Olivo, K.B. (s.f). *Identificación de Hongos*. Recuperado de [https://www.academia.edu/4213597/Identificaci%C3%B3n\\_de\\_Hongos](https://www.academia.edu/4213597/Identificaci%C3%B3n_de_Hongos) Objetivo Identificar una especie de hongo filamentoso Procedimiento Observación macroscópica de mohos Determinar
- Palma, G. (2001). *Biotechnología de la reproducción*. Argentina: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Parez, M. (1985). Las más importantes enfermedades genitales, de los bovinos (profilaxis, tratamiento, higiene de la recogida del espermatozoides). *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.* 4(1), 89-109.
- Pasing et al. (2013). Desarrollo de la microflora genital en los sementales utilizados para la inseminación artificial a lo largo de la temporada de cría. *Elsevier*. 139(2), 53-61.
- Pediamécum. (2015). *Gentamicina*. Recuperado de <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Gentamicina.pdf>
- Peréz et al. (2017). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida. *Rev inv vet Perú*. 28(4), 918-927.
- Pirezy Mota. (S.f). *Morfología y estructura bacteriana*. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- Pizarro et al. (2013). Efecto del plasma seminal sobre el estado redox del semen equino criopreservado. *Revista MVZ Córdoba*. 18(3), 3672-3680.
- Posado, Bartolome, & Gonsalvez, G. (s.f). *Fragmentación del ADN nuclear en espermatozoides*. Recuperado de <http://anvtmexico.com/Documentos/FRAGMENTACI%C3%93N%20DEL%20ADN%20NUCLEAR%20EN%20ESPERMATOZOIDES%20DE%20TORO%20DE%20LIDIA.pdf>

Quintero, D. D. (Octubre de 2014). *Evaluar el efecto crioprotector de la dimetilformamida en diferentes tiempos de adición en la criopreservación de semen en caballos criollos colombianos*(Tesis de pregrado).Universidad la Salle.Bogotá,Colombia.

Reid, G. (2004). When Microbe Meets Human.*Clinical Infectious Diseases*.39(6),827-830.

Restrepo, & Dúque, R. &. (3 de junio de 2016). Microbial growth and post-thaw quality of stallion semen cryopreserved in presence of antibiotics. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.27(2)316-325.

Restrepo, U. M. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *La sallyista de investigación*.11(2) 63-70.

Restrepo, Úsuga, & Rojano.(2013). Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*.8(1),115-127.

Reyes,O.E.(2013).*MicologiaVeterinaria*.Recuperado<http://repositorio.una.edu.ni/2470/1/nl73n322.pdf>

Riaño, N. C. (19 de Julio de 2018). *La economía que se esconde detrás del sector equino colombiano. Agronegocios*.Recuperado de <https://www.agronegocios.co/ferias/la-economia-que-se-esconde-detras-del-sector-equino-colombiano-2751121>

Rodrigo, A. ( 2016). Prueba de vitalidad:espermatozoides inmoviles vivos o muertos. *Revista especializada en reproducción asistida y embarazo*.Recuperadode <https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-vitalidad-de-los-espermatozoides>.

Rodríguez, Ambrosius, & fumuso.(2018). *Azoospermia,como causa de infertilidad en padrillo*(Tesis de pregrado).Facultad de Ciencias Veterinarias-UNCPBA.Tandil,Buenos Aires

Rodríguez, Recalde, & Padilla. (2017). Análisis del uso de antibióticos en antibiogramas de urocultivos realizados por un laboratorio clínico de la región centro-occidental de Colombia.*Universidad y Salud*.19(3),378-387.

Rojas, A. (2011). *Conceptos y practica de microbiologia general*. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

- Roman, m. b. (s,f). *factores que afectan la calidad del semental*. recuperado de <http://www.hvsmveterinario.com/casosclin/1%2031%20factores%20que%20afectan%20a%20la%20fertilidad%20del%20semental.pdf>
- Rota et al. ( 2011). Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *ScienceDirect*,76(3), 464-470.
- Rozo, C. A. (2014). *Evaluación de los diluyentes INRA 82 y BOTUCRIO para la criopreservación espermática de Caballos Criollos Colombianos*. Recuperado de [http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/16983/76111203\\_2014.pdf?sequence=3](http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/16983/76111203_2014.pdf?sequence=3)
- Ruiz, M. A. (1997). *Inseminación artificial en equinos*(Tesis de pregrado)Universidad Autonoma Agraria"Antonio Narro".Saltillo,México.
- Sánchez, Martinez, & Gonzalez. (2013). *Analisis seminal equino y bovino*. Recuperado de <https://invitrosperm.blogspot.com/2013/01/analisis-seminal-equino-y-bovino.html>
- Santambrosio, E. (2009). *Preparación de medios de cultivo*. Recuperado el 11 de enero de 2019, dePreparacióndemediosdecultivo:[https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicoI.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoI.pdf)
- Serrano, E. D. (03 de 2011). *Manejo reproductivo en equinos*(Tesis de Pregrado).Universidad Autonoma Agraria"Antonio Narro",Coahuila,México.
- Soto, P. D. (2017). *Requisitos exigidos según el ICA,para el montaje de un labortorio reproductivo para las especies equinas y bovinas* (Tesis de pregrado).Universidad de Ciencias Aplicadas y ambientales U.D.C.A.Bogotá,Colombia.
- Spergser & Aurich.(2006). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa.*Elsevier*,67(5),912-918
- Spizziri, Bruemmer, & Grahah,(2010). Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa.*PubMed*.118(2-4),255-264.
- Suárez et al. (2015). Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. *Revista Chilena de obstetricia y ginecologia*,80(1),33-40.
- Tapia y Amaro. (2014). Género Fusarium. *Rev Chilena Infectol*,31(1) 85-86.

- Taroco, Seija, & Vignoli. (S,f). *Métodos de estudio de sencibilidad antibiotica*. Recuperado de <http://higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36>.
- Thibier, M. (2004). *Reproductive biotechnologies and risks of disease spreading*. Recuperado de <https://www.isah-soc.org/userfiles/downloads/symposiums/2004/Thibier.pdf>
- Troedsson & lui. (04 de 05 de 2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Science Direct*.70(5),415-420
- V.Seija.(s,f).*Género Staphylococcus*.Recuperado <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Valencia, Garcia, & Gispert. (s.f). *Inseminación Artificial en Caballos*. Recuperado de: [https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion\\_artificial\\_en\\_caballos.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion_artificial_en_caballos.pdf)
- Varner. (2008). Desarrollos en la evaluación del semen de sementales. *Elseiver*,70(3) 448-462.
- Varner et al. (1998). Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *PubMed*,50(4),559-573.
- Velasco y Yamasaki. (2002). Bacterias de interes veterinario. *Medicina Veterinaria*,19(1) 1-11.
- Villegas, Boguen, & Uribe (2017). *Effect of Uropathogenic Escherichia coli on Human Sperm Function and Male Fertility*. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/-i-escherichia-coli-i-recent-advances-on-physiology-pathogenesis-and-biotechnological-applications/effect-of-uropathogenic-i-escherichia-coli-i-on-human-sperm-function-and-male-fertility>
- Wallgren, M. (2014). Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders.*Pathogens*.3(4)934-946.
- Werli, J. (2010). *Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes*(Tesis de pregrado).Universidad de la Salle, Bogotá,Colombia.
- Zalzala et al. (2017). Comparative study of physical properties and bacterial contamination between local and imported straws frozen semen. *Journal of entomology and zoology studies*,5(4),1969-1973

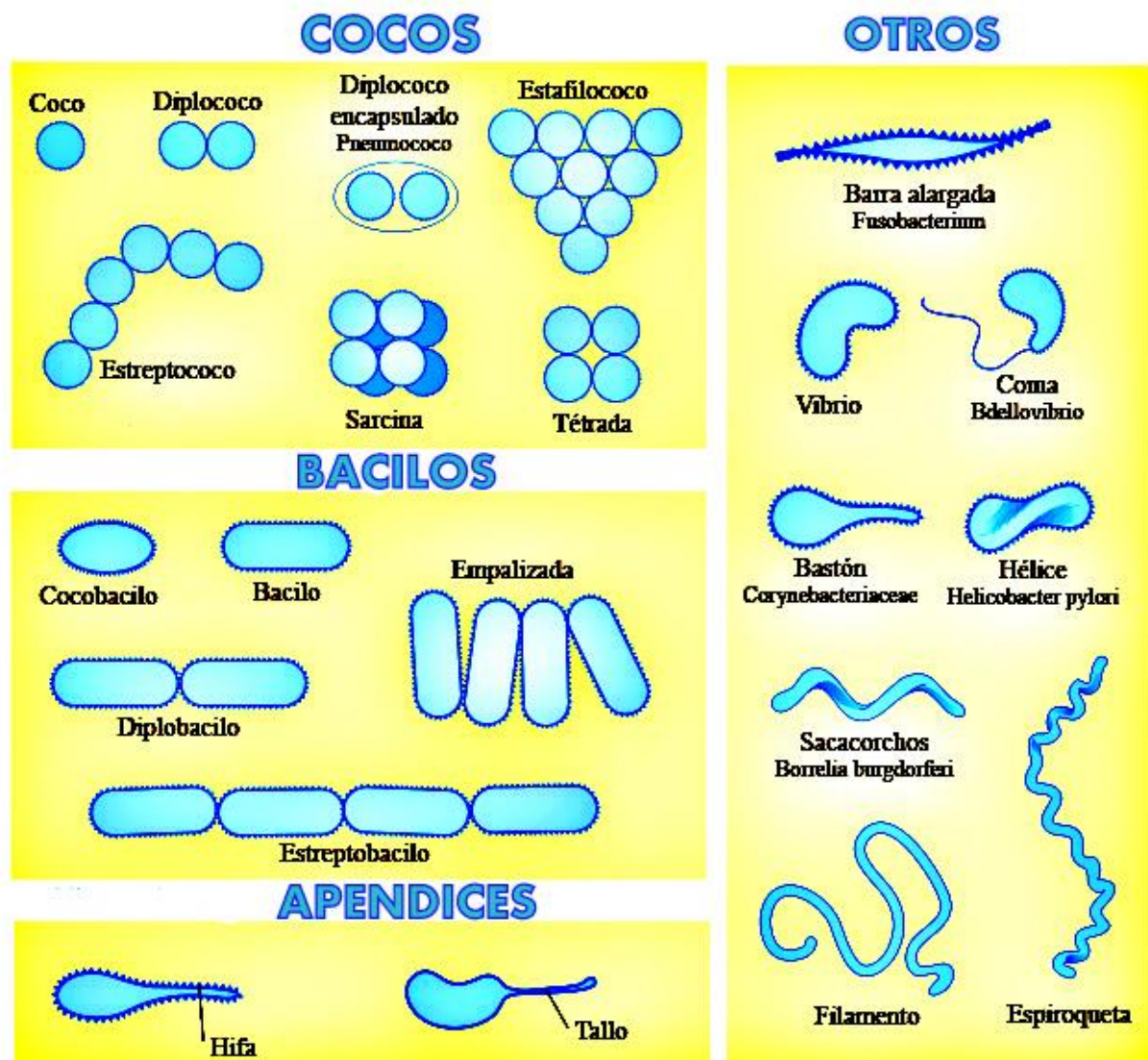


## Apéndices

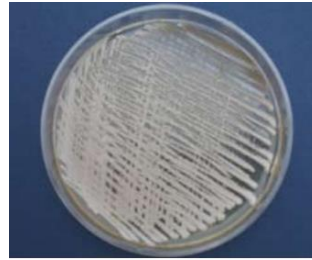
### *Apéndice A Evaluación de morfología espermática*

| ANIMAL:                          |   | FECHA:                                       |  |
|----------------------------------|---|----------------------------------------------|--|
| DEFECTOS MAYORES                 | % | DEFECTOS MENORES                             |  |
| Defecto de acrosoma              |   | Cabeza Delgada                               |  |
| Vacuolas/ pouch formation        |   | Cabeza gigante                               |  |
| Cabeza pequeña anormal           |   | Cabeza pequeña normal                        |  |
| Cabeza Piriforme                 |   | Cabeza suelta normal                         |  |
| Cabeza estrecha en la base       |   | Cola insertada abaxial, retroaxial o oblíqua |  |
| Cabeza suelta o patológica       |   | Cola enrollada o doblada simple              |  |
| Cabeza con contorno anormal      |   | Gota citoplasmática distal                   |  |
| Cabeza con cresta nuclear        |   | <b>Total de Defectos Menores</b>             |  |
| Gota citoplasmática proximal     |   | <b>Total de Alteraciones Morfológicas</b>    |  |
| Espermatozoide subdesenvolvido   |   | <b>4. OTROS ELEMENTOS(Score +, ++, +++)</b>  |  |
| Formas teratológicas             |   | Medusas                                      |  |
| Alteración pieza intermediaria   |   | Células primordiales                         |  |
| Cola enrollada en la cabeza      |   | Células gigantes                             |  |
| Cola fuertemente enrollada       |   | Leucocitos                                   |  |
| Defecto DAG                      |   | Glóbulos rojos                               |  |
| Cola enrollada con gota anexa    |   | Células epiteliales                          |  |
| <b>Total de Defectos Mayores</b> |   | Observaciones:                               |  |

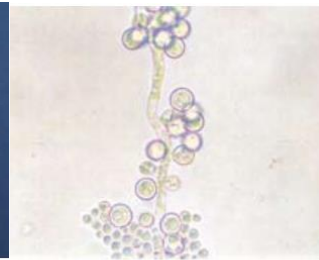
*Apéndice B Morfología microscópica de bacterias*



### Apéndice C Morfología de hongos



Desarrollo de *C. glabrata* sobre agar sabouraud dextrosa.



Clamidospora de *Candida albicans*.

Lima, 2007

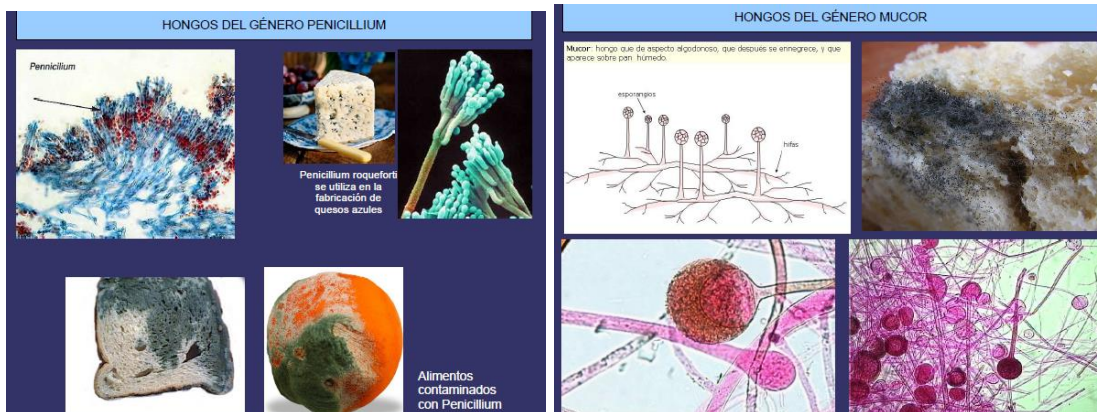


Desarrollo de *Rhodotorula rubra* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a temperatura ambiente.



Fina cápsula de *Rhodotorula rubra* visible al examen directo con tinta china.

Lima, 2007



**Apéndice D Tablas de sensibilidad a los antibióticos***Tabla de sensibilidad E. coli frente a cada antibiótico*

| ANTIBIOTICO                            | BACTERIA         | RESISTENTE | INTERMEDIO | SENSIBLE  |
|----------------------------------------|------------------|------------|------------|-----------|
| <b>Amoxicilina +<br/>Ac clavulanic</b> | Escherichia coli | $\leq 13$  | 14-17      | $\geq 18$ |
| <b>Amikacina</b>                       | Escherichia coli | $\leq 12$  | 13-14      | $\geq 15$ |
| <b>Cefepime</b>                        | Escherichia coli | $\leq 14$  | 15-17      | $\geq 18$ |
| <b>Gentamicina</b>                     | Escherichia coli | $\leq 14$  | 15-16      | $\geq 17$ |
| <b>Penicilina</b>                      | Escherichia coli | $\leq 11$  | 15-17      | $\geq 18$ |

*Tabla de sensibilidad P. aeruginosa frente a cada antibiótico*

| ANTIBIOTICO                            | BACTERIA                 | RESISTENTE | INTERMEDIO | SENSIBLE  |
|----------------------------------------|--------------------------|------------|------------|-----------|
| <b>Amoxicilina +<br/>Ac clavulanic</b> | Pseudomona<br>Aeruginosa | $\leq 13$  | 14-16      | $\geq 17$ |
| <b>Amikacina</b>                       | Pseudomona<br>Aeruginosa | $\leq 14$  | 14-16      | $\geq 17$ |
| <b>Cefepime</b>                        | Pseudomona<br>Aeruginosa | $\leq 14$  | 15-17      | $\geq 18$ |
| <b>Gentamicina</b>                     | Pseudomona<br>Aeruginosa | $\leq 12$  | 13-14      | $\geq 15$ |
| <b>Penicilina</b>                      | Pseudomona<br>Aeruginosa | $\leq 12$  | 13-15      | $\geq 16$ |