



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA PECUARIA

**TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA DEL SEMEN DE
REPRODUCTORES DE LA UNIDAD HATO PORCINO ESPAM
MFL**

AUTOR:

YEISSON BLADIMIR VERA CIFUENTES

TUTOR:

ING. ERNESTO ANTONIO HURTADO PhD.

CALCETA, MAYO 2018

DERECHOS DE AUTORÍA

Yeisson Bladimir Vera Cifuentes, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

.....

YEISSON B. VERA CIFUENTES

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ernesto Antonio Hurtado, médico veterinario y doctor en ciencias, docente, certifica haber tutelado la tesis EVALUACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA DEL SEMEN DE REPRODUCTORES DE LA UNIDAD HATO PORCINO ESPAM MFL, que ha sido desarrollada por Yeisson Bladimir Vera Cifuentes, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo con el **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
ING. ERNESTO ANTONIO HURTADO PHD.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han APROBADO la tesis EVALUACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA DEL SEMEN DE REPRODUCTORES DE LA UNIDAD HATO PORCINO ESPAM MFL, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Yeisson Bladimir Vera Cifuentes, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
DR. ALEX J ROCA CEDEÑO

MIEMBRO

.....
DR. FREDDY A. ZAMBRANO ZAMBRANO MG. SC

MIEMBRO

.....
DR. DERLYS H. MENDIETA CHICA

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A Dios que nos protege,

A mi familia, por su infinito apoyo

.....
YEISSON B. VERA CIFUENTES

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a mi familia, que con su amor, consejos y apoyo me ayudaron a alcanzar esta meta

.....
YEISSON B. VERA CIFUENTES

CONTENIDO GENERAL

CARÁTULA.....	I
DERECHOS DE AUTORÍA.....	II
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
DEDICATORIA.....	VI
CONTENIDO GENERAL.....	VII
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
PALABRAS CLAVE:.....	X
ABSTRACT.....	XI
KEY WORDS.....	XI
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1.PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2.JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3.OBJETIVOS.....	3
1.3.1.OBJETIVO GENERAL	3
1.3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.4.HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1.INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CERDAS	4
2.2.MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE SEMEN PORCINO.....	4
2.3.MATERIALES PARA REALIZAR LA COLECTA DE SEMEN	4
2.4.MÉTODO DE RECOLECCIÓN MANUAL.....	5
2.5.EVALUACIONES DE CALIDAD SEMINAL.....	6
2.5.1.CONTROL MACROSCÓPICO.....	6
2.5.1.1.VOLUMEN	6
2.5.1.2.COLOR.....	6
2.5.1.3.OLOR	6
2.5.1.4.PH..	7
2.5.2.CONTROL MICROSCÓPICO	7
2.5.2.1.MOTILIDAD	7
2.5.2.2.AGLUTINACIÓN.....	7
2.6.DILUCIÓN DEL SEMEN	8
2.7.DILUYENTES DE SEMEN PORCINO	8
2.8.ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SEMEN	9
2.9.ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL SEMEN	9
2.10.EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN EN EL SEMEN	10
2.11.CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN	12
2.11.1.CONTROL HIGIÉNICO Y SANITARIO	12
CAPÍTULO III.DESARROLLO METODOLÓGICO.....	14
3.1.UBICACIÓN Y MANEJO DE LOS REPRODUCTORES.....	14
3.2.COLECTA DE LOS REPRODUCTORES	14
3.3.EVALUACIÓN DEL SEMEN	14
3.4.ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SEMEN	15
3.5.DISEÑO EXPERIMENTAL	15
3.6.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16

CAPÍTULO IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SEMEN.....	18
4.1.1.AGLUTINACIÓN.....	18
4.1.2.MOTILIDAD.....	18
4.1.3.PH.....	19
4.1.4.UFC (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS).....	20
4.2.CORRELACIONES ENTRE VARIABLES.....	22
4.2.1.CORRELACIÓN ENTRE PH Y UFC.....	22
4.2.2.CORRELACIÓN ENTRE MOTILIDAD Y AGLUTINACIÓN.....	22
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	23
5.1.CONCLUSIONES.....	23
5.2.RECOMENDACIONES.....	23
BIBLIOGRAFÍA	24
ANEXOS	27

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 2.1 Bacterias frecuentes en el semen.....	11
Cuadro 2.2 Bacterias no frecuentes en el semen.....	11
Cuadro 4.1. Estadística descriptiva de la variable aglutinación con respecto al genotipo	18
Cuadro 4.2 Prueba T para la variable aglutinación	18
Cuadro 4.3 Estadística descriptiva de la variable motilidad con respecto al genotipo.....	19
Cuadro 4.4 Prueba T para la variable motilidad	19
Cuadro 4.5 Estadística descriptiva de la variable pH con respecto a los factores en estudio ...	20
Cuadro 4.6 Análisis de varianza de la variable pH para los factores bajo estudio	20
Cuadro 4.7 Estadística descriptiva de la variable UFC con respecto a los factores en estudio .	21
Cuadro 4.8 Análisis de varianza de la variable UFC con respecto a los factores bajo estudio ..	22
Cuadro 4.9 Correlación entre variables pH y UFC.....	22
Cuadro 4.10 Correlación entre variables motilidad y aglutinación	22
Anexo 1: Reproductor sobre el maniquí de colección	28
Anexo 2: Recolección del semen.....	28
Anexo 3 Dilución del semen porcino	28
Anexo 4 Análisis de motilidad y aglutinación del semen porcino	29
Anexo 5 Empaque de las muestras de semen porcino	29
Anexo 6. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, primera semana	30
Anexo 7. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, primera semana.....	31
Anexo 8. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, segunda semana	32
Anexo 9. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, segunda semana	33
Anexo 10. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, tercera semana	34
Anexo 11. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, tercera semana	35
Anexo 12. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, cuarta semana	36
Anexo 13. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, cuarta semana	37
Anexo 14. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, quinta semana.....	38
Anexo 15. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, quinta semana	39

RESUMEN

Con el fin de evaluar el nivel de contaminación del semen porcino, identificar las bacterias que la producen y valorar sus efectos sobre la calidad seminal; se evaluaron 20 muestras de semen (10 frescas y 10 diluidas) de dos cerdos de genotipos Landrace x Pietrain y Duroc, utilizados como reproductores en el hato porcino de la carrera de Pecuaria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, con un arreglo de tratamientos bifactorial, para estudiar las variables: aglutinación, motilidad y pH, asimismo la presencia y cantidad de colonias bacterianas en el semen. No se encontraron diferencias estadísticas para las variables de aglutinación y motilidad, los promedios obtenidos se encontraron dentro del rango normal. Tampoco en la cantidad de unidades formadoras de colonias ($9,6 \times 10^6$ y $1,1 \times 10^7$ ufc/ml) para semen fresco y diluido respectivamente. Sin embargo, estas sobrepasaron los rangos normales establecidos. Se determinó la presencia de *E. coli* en 11 (51,0%) de las 20 muestras analizadas. La variable pH reportó diferencias estadísticas ($P < 0,01$) entre los tipos de semen evaluados y los promedios obtenidos fueron de 9 y 8,55 para el semen fresco y diluido respectivamente. La correlación entre la aglutinación y el porcentaje de motilidad del semen resultó negativa, por lo que se deduce deficiencias de higiene durante el proceso de colección y manipulación en el laboratorio, lo que implica maximizar las medidas de bioseguridad en todo el proceso.

PALABRAS CLAVE:

Cerdos, reproducción, contaminación, aglutinación, bacterias.

ABSTRACT

In order to evaluate the level of contamination of swine semen, identify the bacteria that produce it and assess its effects on seminal quality; We evaluated 20 semen samples (10 fresh and 10 diluted) of two pigs of Landrace x Pietrain and Duroc genotypes, used as reproducers in the pig herd of the Faculty of Livestock of the Agricultural Polytechnic Superior School of Manabi. A completely randomized block design was used, with a bifactorial treatment arrangement, to study the variables: agglutination, motility and pH, as well as the presence and quantity of bacterial colonies in the semen. No statistical differences were found for the agglutination and motility variables, whose averages were found within the normal range. Neither in the amount of colony forming units (9.6×10^6 and 1.1×10^7 cfu / ml) for fresh and diluted semen respectively. However, they exceeded the established normal ranges. The presence of *E. coli* was determined in 11 (51.0%) of the 20 samples analyzed. The variable pH reported statistical differences ($P < 0.01$) between the types of semen evaluated and the averages obtained were 9 and 8.55 for the fresh and diluted semen respectively. The correlation between the agglutination and the percentage of semen motility was negative, so that hygiene deficiencies are deduced during the collection and manipulation process in the laboratory, which means to maximize the biosecurity measures in the whole process.

KEY WORDS

Pigs, reproduction, contamination, agglutination, bacteria

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El eyaculado de los verracos pasa desde su origen en el testículo y glándulas sexuales accesorias que se encuentran libres de bacterias (Pineida y Santander, 2007). Por varios ambientes hasta que es introducido en el tracto genital de la hembra, y esto supone un riesgo de contaminación (Pérez *et al.*, 2001).

Aunque la mayoría de ellos son parte de la microflora normal también existen bacterias oportunistas o patógenas. Se considera anormal cuando el conteo de bacterias por mililitro sobrepasa los 1×10^4 cuando una bacteria específica logra sobrevivir en el semen (Althouse citado por Pineida y Santander 2007).

Pérez *et al.* citados por Cuesta *et al.* (2011) indican que las bacterias más frecuentes en el eyaculado del verraco son: *Micrococcus*, *Staphylococcus* (epidermidis y aureus), *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter*, *Corynebacterium* (pyogenes, suis), *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus fecalis* y *Citrobacter*, siendo la mayoría de éstas provenientes de la contaminación de la zona del prepucio por restos fecales.

Al considerar lo manifestado por los autores antes citados, y teniendo en cuenta la realidad actual, se puede explicar que el semen porcino por la naturaleza de sus métodos de extracción y procesamiento es altamente susceptible a la contaminación bacteriana, teniendo como consecuencia el deterioro de la calidad seminal y una relación directa en la disminución de la fertilidad de los hatos porcinos.

Ante la exposición de esta idea surge la siguiente interrogante. ¿Existirá una carga microbiológica en el semen de los reproductores del hato porcino de la ESPAM MFL que afectará negativamente la calidad del mismo?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Sala *et al.* citados por Acosta *et al.* (2011) indican que en los últimos años se le ha dado mucha importancia a la calidad higiénica sanitaria del semen, pues se conoce que numerosos agentes patógenos, bacterianos o virales, pueden estar presentes en el mismo, porque provienen del aparato urogenital de los sementales o se encuentran en el medio donde están alojados dichos machos.

Los microorganismos presentes en el semen afectan la viabilidad de los espermatozoides, debido a la competencia por el mismo sustrato y por el efecto nocivo que los metabolitos bacterianos provocan sobre la membrana celular, y que debido a la contaminación se presentan fenómenos de aglutinación, disminución del tiempo de conservación, retorno de las cerdas al estro y descargas vaginales posteriores a la inseminación (Tiniolli *et al.*, 2002. citados por Acosta *et al.*, 2011)

Para que un diluyente pueda cumplir con su función, debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico del espermatozoide, proteger a la célula frente al shock térmico por el frío, controlar el pH del medio, mantener la presión osmótica, así mismo, debe inhibir el desarrollo microbiano (Gadea citado por Benítez *et al.* 2009).

Se ha escrito también que más de 4000 colonias bacterianas contaminando al semen pueden matar algunos o todos los espermatozoides (PIC, 2008).

Es importante el monitoreo microbiológico de las muestras seminales ya que una alta contaminación bacteriana puede ocasionar problemas de diferente índole e influir directamente en la fertilidad de los hatos. El presente trabajo se realizará con el fin de identificar la flora bacteriana conforme a las características de las colonias, que pudieran encontrarse en el semen de los verracos del hato porcino de la ESPAM MFL, y evaluar su posible efecto sobre la calidad del semen.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar microbiológicamente el semen (fresco y procesado) de los reproductores del hato porcino de la ESPAM MFL.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los tipos de bacterias presentes en el semen de los verracos.

Estimar la magnitud de las unidades formadoras de colonias en el semen (fresco y diluido)

Valorar la calidad seminal de los reproductores del hato porcino.

Determinar la correlación entre la calidad del semen y la presencia de colonias bacterianas.

1.4. HIPÓTESIS

El semen de los reproductores (Duroc) y (Landrace x Pietrain) de la unidad de docencia investigación y vinculación hato porcino ESPAM "MFL" está libre de altas cargas bacterianas que influyan sobre la calidad del mismo.

CAPÍTULO II.MARCO TEÓRICO

2.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CERDAS

Rocha (2005) indica que la inseminación artificial (IA) es una biotecnología de la reproducción de primera generación que consiste en la introducción del semen en los órganos genitales de la hembra sin la intervención del macho, facilitando la fecundación y producción de una cría.

Kubus (2010) menciona que la inseminación artificial como técnica posee ciertas ventajas tales como:

Permite controlar la calidad espermática de los sementales que están sujetos a múltiples efectos ambientales, de manejo y sanitarios.

Reducción del riesgo de transmisión y aparición de enfermedades infectocontagiosas por vía sexual.

Se reduce la entrada de animales portadores de enfermedades del exterior.

Sin embargo, un manejo inadecuado de esta técnica trae consigo ciertas desventajas citadas a continuación: Posibilidades de errores humanos y exposición del semen a factores ambientales, sin la debida protección (Franco, 2010).

2.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE SEMEN PORCINO

En la extracción del material seminal se utiliza un potro o maniquí, forrado de piel de bovino por ser más resistente y durable, en el cual se puede impregnar con secreciones vaginales de una hembra en celo o fracciones del semen de otros cerdos,; esto produce un estímulo suficiente para aumentar la actividad sexual en el macho(Ortiz, 2010).

2.3. MATERIALES PARA REALIZAR LA COLECTA DE SEMEN

Para recoger el eyaculado pueden usarse bolsas plásticas desechables con un filtro de papel para evitar la contaminación del semen, antes de la recolección deberán ser colocadas dentro de un termo de colección que debe tener una temperatura aproximada de 37°C, para evitar el choque térmico del semen, todos

este proceso debe realizarse usando guantes de colección que son de vinilo no empolvados (Córdova *et al.*, 2015).

2.4. MÉTODO DE RECOLECCIÓN MANUAL

Le Coz (2006)^a explica que la técnica de recolección es simple pero debe realizarse cautelosamente los pasos mencionados a continuación para que sea eficiente:

Esperar que el pene salga del prepucio mientras el verraco se excita sobre el potro.

Poner la mano en contacto con el pene dejándola resbalar sin apretar, para acostumbrar al verraco al contacto.

Cuándo el verraco se encuentra bien instalado sobre el potro y el pene sobresale bien del prepucio, apretar la extremidad del pene bloqueando con los dedos las espirales, pero teniendo cuidado de dejar sobrepasar la punta fuera de la mano.

Continuar hasta la prolongación del pene que precede a la eyaculación.

Una vez que empieza la eyaculación se debe seguir apretando levemente la extremidad distal del pene aplicando una presión discontinua para estimular al verraco.

Sánchez (2008) reporta que en el eyaculado se distinguen tres fracciones bien diferenciadas que son:

Pre-espermática: de 10-15 cc, constituida fundamentalmente por secreciones de la próstata, vesículas seminales y de la glándula de Cowper. Se caracteriza por ser transparente y carecer de espermatozoides. A esta fracción se le denomina Tapioca.

Espermática o rica: con un volumen de 70 cc (30-100 cc), está constituida por espermatozoides y secreciones de la próstata y vesículas seminales. Tiene un color blanquecino lechoso.

Post-espermática: de unos 150 cc, contiene una pequeña cantidad de espermatozoides y secreciones prostáticas y de la glándula de Cowper. Es de color blanquecino transparente.

El tiempo de colección puede variar de 5 a 15 minutos, siendo su término determinado por la retracción espontánea del pene. Después de la colección, retire de manera cuidadosa el filtro que contiene la secreción gelatinosa (Le Coz, 2006).

2.5. EVALUACIONES DE CALIDAD SEMINAL

El análisis de semen es una técnica de laboratorio sencilla, que permite determinar varios aspectos de la calidad del material que se estudia. Entre los datos que se obtienen, la información vinculada a la concentración y comportamiento de los espermatozoides es la de mayor relevancia (Bravo, 2015).

2.5.1. CONTROL MACROSCÓPICO

Las muestras de semen se estudian macroscópicamente en cuanto a sus características físicas: volumen, color, olor y ph.

2.5.1.1. VOLUMEN

Se cuantifica en cc o ml. Para realizar su medida se utilizan probetas graduadas o una balanza digital, se considera que 1 g 1 ml (Kubus, 1999 citado por Caiza, 2009). La fracción espermática que debe colectarse normalmente alcanza volúmenes de 80 a 150 ml (PIC, 1996).

2.5.1.2. COLOR

El color normal es blanco cremoso a un blanco lechoso, pero en todo caso su apariencia ha de ser opaca, lo que indica una gran concentración de espermatozoides (Rivera, 1997). Se consideran colores anormales al amarillo, rosado, rojizo, rojo, café, lo cual es indicativo de problemas inflamatorios del sistema genital y/o urinario (PIC, 1996).

2.5.1.3. OLOR

El olor del semen de verraco es sui generis y se caracteriza por estar afectado ligeramente por feromonas del aparato genital. La aparición de olores anómalos,

semejante a orina o amoníaco, puede ser debido a alteraciones patológicas del aparato genital o a la mezcla del semen con orina, durante la eyaculación (Kubus citado por Caiza, 2009).

2.5.1.4. PH

Caicedo citado por Caiza (2009) indica que el pH del eyaculado de un verraco depende de la proporción de constituyente aportado por las glándulas anexas y que además puede variar su valor por manipulación, tiempo previo a su medida, contaminación bacteriológica, concentración, etc. Esta evaluación debe realizarse inmediatamente después de obtenido el semen y se admiten valores de pH de $7,4 \pm 0,2$

2.5.2. CONTROL MICROSCÓPICO

2.5.2.1. MOTILIDAD

Debe determinarse colocando una gota pequeña 1-2 micras en un portaobjeto pre-calentado (38° C), tapando la gota con un cubreobjetos de tamaño adecuado (10x10 mm) y mirando la gota a 200-400 aumentos en un microscopio equipado con óptica de contraste de fase. La movilidad se estima generalmente en forma subjetiva, o sea que un operador estima en porcentaje de espermatozoides que muestran motilidad progresiva y linear (Rodríguez, 2013).

Si hay movimiento espermático anormal (movimientos en círculo, adhesión al vidrio, aglutinación) esto debe siempre anotarse, y repetir la observación con otras gotas. En un eyaculado considerado "normal" la movilidad espermática es usualmente de al menos un 70% (Rodríguez, 2013).

2.5.2.2. AGLUTINACIÓN

La aglutinación es el acúmulo de espermatozoides (muertos o vivos), que pueden estar adheridos a células epiteliales o bien, unidos cabeza con cabeza. Este fenómeno puede ser observado tanto en el eyaculado fresco, como en el semen diluido (Córdova *et al.*, 2015).

Entre las posibles causas de aglutinación pueden consignarse: Mala calidad espermática (espermatozoides muertos o con baja vitalidad), contaminación bacteriana del eyaculado, presencia de gran cantidad de células epiteliales o

descamaciones y cambios en el pH del plasma seminal, generalmente asociados a procesos inflamatorios o disfunciones que afectan a las glándulas accesorias del verraco (Córdova *et al.*, 2015).

2.6. DILUCIÓN DEL SEMEN

La dilución y conservación del semen porcino en refrigeración es una práctica que brinda a la industria porcina la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco, para ello los diluyentes en donde se conserva el material seminal, deben proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y los antibióticos para la inhibición del desarrollo microbiano (Rugeles *et al.*, 2013).

Para el proceso de dilución el diluyente debe mezclarse continuamente con el agua purificada durante 1 hora sin dejar restos del mismo en el fondo de la cubeta y permitir que los componentes se estabilicen antes de agregarlo al semen, además es importante asegurarse de pesar con precisión el agua purificada (destilada o bidestilada) y el diluyente ya que las variaciones pueden alterar la osmolaridad de la mezcla (PIC, 2015).

El mismo manual indica que la temperatura del diluyente se debe mantener a 35°C (95°F) ya que en el momento de la recolección, el semen tiene una temperatura de 37-38°C (98-100°F) y se produce una caída de 2-3 grados de temperatura del eyaculado durante el proceso de evaluación. En consecuencia, el diluyente se debe mantener a 35°C (95°F) hasta el momento de la mezcla con el semen, proceso que se puede realizar en una bolsa de dilución plástica.

2.7. DILUYENTES DE SEMEN PORCINO

Un diluyente se considera aquella solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de fertilidad adecuado (Valencia, 2006).

A nivel práctico en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación

a corto plazo (menos de 1-3 días), o aquellos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de 4 días). Los primeros se utilizan principalmente en estructuras de distribución de las dosis seminales a corta distancia, mientras que los de largo plazo son propios de estructuras donde la distancia entre el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado es grande (Gadea, 2003)

2.8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SEMEN

Para el análisis cuantitativo de las muestras Conza *et al.* (2004) realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril, se determinó el conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables, anaerobios y microaerófilos en Agar nutriente, Agar sangre y Agar Mc Conkey respectivamente.

El método más común de tipificación de bacterias se realiza a través de la observación de la morfología de las colonias y la confirmación mediante pruebas bioquímicas (OIE, 2007).

2.9. ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL SEMEN

Los testículos y las glándulas sexuales accesorias de los verracos sanos son libres de bacterias. Sin embargo, la contaminación bacteriana ocurre antes de la deposición del semen en el cuello uterino, los genitales externos transportan diferentes microorganismos y aunque la mayoría de ellos son parte de la microflora normal también existen patógenos potencialmente capaces de producir infecciones genitales en hembras susceptibles y disminuir la sobrevivencia y capacidad fecundante de las células espermáticas (Sone *et al.*, citados por Pineda y Santander, 2007).

En los centros de inseminación artificial las bacterias se introducen en la línea de producción de dosis seminales a través de diferentes fuentes: los verracos (piel, heces fecales), el personal que colecta y procesa el semen, un deficiente protocolo de extracción de semen, el equipo de colección, el agua destilada y el diluyente entre otros (Ausejo *et al.*, 2016).

2.10. EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN EN EL SEMEN

Se considera anormal cuando el conteo de bacterias excede las 10 000/mL ó cuando una bacteria específica logra sobrevivir en el semen (Althouse y Lu 2005 citados por Acosta, 2013).

Le Coz (2006), ha informado que a partir de 10 000 colonias/mL se producen modificaciones del medio, metabolitos ácidos, aglutinación, disminución del número de espermatozoides vivos, disminución de la motilidad así como, otras patologías asociadas a la reproducción como la metritis en las cerdas y la disminución de la fertilidad.

En estudios realizados en Perú por Conza *et al.* (2004) se encontró que el 60% de los eyaculados contenían una carga bacteriana que sobrepasó las 5013 ufc/mL, límite permitido por la OIE (2007) y debido a esto se obtuvieron resultados de fertilidad bajos, en las granjas objetos de estudio.

La proliferación de gérmenes (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas sp.* y otros) es favorecida por la presencia de glucosa y por la temperatura de mantenimiento del semen (15-16°C). La contaminación bacteriana genera alteraciones como disminución de la motilidad, aglutinación espermática, alteraciones del acrosoma y alteraciones en el pH seminal, que conducen a una reducción del tiempo de conservación de las dosis seminales (Córdova *et al.*, 2015).

PIC (2008) citado por Acosta (2013) indican que bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas*, *Eschericia Coli* y *Enterobacter* provocan lesiones en el tracto reproductor del macho, disminución del pH seminal, aglutinaciones, baja motilidad y muerte de los espermatozoides, efectos asociados con infertilidad de los reproductores, afecciones en la fecundación, patologías como metritis en cerdas, y significativa disminución en el tamaño de las camadas.

A continuación se muestran los resultados de estudios realizados en México en los que se evidenció la presencia de diferentes géneros de bacterias frecuentes (cuadro 2.1) y bacterias no frecuentes (cuadro 2.2).

Cuadro 2.1 Bacterias frecuentes en el semen

Género:	Ubicación:	Consecuencia
Staphylococcus aureus	Tracto reproductor del macho; infección	Lesiones en el tracto; sangre en el eyaculado; infertilidad del semental
Leptospiras	Ambiente	No causa infertilidad a menos que el número de bacterias sea excesivo
Eschericia coli	Ambiente. Habita normalmente en el intestino de los animales. Resistente a la gentamicina.	Se ha observado un efecto directo espermicida (posiblemente por la producción de toxinas). Causa aglutinación
Eubacterium suis	Prepucio	Se ha aislado de descargas vulvares. Causa problemas de infertilidad. Problemas asociados con esta son más comunes cuando se usa monta natural

Fuente: (PIC, 2008)

Cuadro 2.2 Bacterias no frecuentes en el semen

Género:	Ubicación:	Consecuencia
Streptococcus spp	Tracto reproductor, localizado en testículos; se ha aislado de próstata	Problemas de fertilidad asociados a su efecto en la producción de espermias y / o a la infección del tracto reproductor femenino.
Proteus vulgaris	Ambiente	No causa infertilidad a menos que el número de bacterias sea excesivo
Brucellosis	Infección del semental; localizado en los testículos.	Orquitis; semen contaminado; infertilidad del semental por degeneración testicular.
Erysipelothrix rhusiopathiae	Tracto reproductor	Puede causar inflamación y degeneración testicular
Mycoplasma hyosynoviae	Tracto reproductor	Afecta la calidad seminal
Serratia spp	Serratia marcescens - contaminación ambiental. Patogénica en animales, causa mastitis en bovinos. En un estudio se encontró contaminando diluyente en polvo. Es resistente a la gentamicina.	pH ácido, aglutinación de células espermáticas, baja motilidad masal, daño acrosomal.
Corynebacterium spp	Tracto reproductor; se ha aislado de glándulas vesiculares	
Enterobacter spp	Enterobacter cloacae - contaminación ambiental. En un estudio se encontró contaminando el equipo desechable (re-utilizado) de dosificación. Es patógeno oportunista. Resistente a la gentamicina	pH ácido, aglutinación de células espermáticas, baja motilidad masal, daño acrosomal ¹¹ .
Acinetobacter spp.	Se encuentra en animales y en el ambiente. Resistente a la gentamicina	Agglutinación de eyaculados
Alcaligeners spp	Tracto intestinal de vertebrados. Es oportunista. Resistente a gentamicina Alcaligenes faecalis – aislado de prepucio	Agglutinación de eyaculados

Fuente: (PIC, 2008)

2.11. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

El semen destinado a la inseminación artificial debe someterse a estrictos controles de calidad de manera rutinaria, dentro de estos controles están los análisis bacteriológicos que deben realizarse siempre que exista un aumento de la aglutinación (<25 % de los eyaculados), haya una disminución anormal de la motilidad en masas (>65%), cuando se haga visible al microscopio la contaminación, cuando exista disminución del tiempo de conservación o cuando esté aumentado el retorno al celo, y existan descargas vaginales post inseminación (Acosta, 2013).

2.11.1. CONTROL HIGIÉNICO Y SANITARIO

Identificar los puntos críticos de contaminación es el punto de partida para establecer el control higiénico sanitario (Pineda y Santander, 2007).

La vigilancia diaria del estado de salud de los verracos es un aspecto de vital importancia por lo que debe evitarse el uso de sementales que tengan signos aparentes de enfermedades infecciosas. La extracción de los machos problemáticos debe realizarse al final para evitar contaminaciones cruzadas.

Si el conteo de ufc/mL es mayor de 10 000, deben tratarse los sementales, es decir, medicar el pienso con antibióticos de amplio espectro). El diluyente debe ser protegido con un antibiótico no espermicida de amplio espectro, preferiblemente que sea efectivo a las bacterias encontradas en los análisis microbiológicos. El registro de los resultados de los análisis bacteriológicos debe ser mantenido, a fin de evaluar la eficacia de las medidas de higiene establecidas.

El área de extracción, incluyendo al maniquí, debe de ser limpiada después de cada colección, y desinfectada una vez por semana así, como el área donde se alojan los sementales que debe ser limpiada diariamente y desinfectada una vez al mes. Debe mantenerse un estricto control de las moscas, roedores y otros vectores.

La desinfección del laboratorio debe realizarse una vez por semana y de todos sus locales una vez al mes. El material reutilizable del laboratorio debe lavarse

con un detergente neutro que no deje residuos, después aclararlo con agua destilada y en caso de que el material lo permita, esterilizarlo por calor en la estufa, 120°C durante dos horas. Las mesetas y suelos del laboratorio deben ser lavadas diariamente con detergentes que no dejen residuos y posteriormente limpiar las mesetas con alcohol isopropílico al 70%. La calidad del agua utilizada en el laboratorio debe monitorearse. El agua ha de ser fresca y por lo menos bidestilada en filtros de cristal o haber pasado por ósmosis inversa, desionizada y expuesta a luz ultravioleta. La manera en que el agua se almacena afecta la calidad, por lo que se recomienda, cuando sea posible, guardarla a temperatura de refrigeración, 4 °C, en recipientes de cristal (Acosta, 2013).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN Y MANEJO DE LOS REPRODUCTORES.

El desarrollo de la investigación se realizó en la Unidad de Investigación, Docencia y Vinculación Hato Porcino perteneciente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí ESPAM "MFL" ubicada en el sitio el Limón en la ciudad de Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, Situado a una altitud de 15 m.s.n.m., en la que se registraron temperaturas medias de 28°C durante el período de investigación que fue de Diciembre del 2017 a Enero del 2018. **FUENTE:** ESTACIÓN METEOROLÓGICA ESPAM MFL, 2016.

Se seleccionaron dos cerdos reproductores ubicados en el hato porcino de la ESPAM MFL, que cumplían con todos los planes de vacunación y desparasitación que se realizan dentro de esta unidad porcina. Un reproductor fue un cruce comercial Landrace x Pietrain de 24 meses de edad (Genotipo 1), y el otro fue un cerdo de raza Duroc de 15 meses de edad (Genotipo 2), ambos se encontraban en corrales individuales donde recibían 3 kg de alimento balanceado al día, repartidos en dos raciones al día con un contenido proteico de 12% y además agua a voluntad.

3.2. COLECTA DE LOS REPRODUCTORES

Se recolectaron un total de 20 muestras, 10 de semen fresco y 10 de semen diluido. Las recolecciones se realizaron una vez por semana a cada cerdo durante cinco semanas, mediante el uso de la técnica manual de mano enguantada. El semen se colectó en una bolsa de colección con un filtro de papel que se encontraba dentro de un vaso de colecta marca 1l Minitube, se colectó solo la fracción espermática o rica y se desecharon las fracciones pre y post espermáticas. Se llegó siempre al final de la eyaculación, que duró entre 15 a 20 minutos.

3.3. EVALUACIÓN DEL SEMEN

Posterior a la recolección se realizó el proceso de dilución del semen con agua bidestilada esteril y diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS) obtenido

comercialmente y las evaluaciones correspondientes a: Aglutinación, motilidad y pH

Aglutinación: Se estableció a través de un microscopio de contraste de fases MBL 2000 calefaccionado Minitube; luego de haber colocado una gota de semen diluido sobre un portaobjetos temperado a 37°C. Se observó a 100-200 si existía presencia de aglutinaciones dentro del semen.

Motilidad: Se colocó una gota de semen diluido sobre un portaobjetos temperado a 37°C y se observó a 100-200 aumentos en un microscopio de contraste de fases MBL 2000 calefaccionado; para así precisar los movimientos de los espermatozoides que permitieron aproximar la valorización a nivel de porcentaje (%).

pH: Para determinar el nivel de acides del semen (fresco y diluido) se usó una tira medidora de pH Macherey-Nagel con una gota de los diferentes tipos de semen.

3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SEMEN

Durante cada colecta se tomaron muestras de 3 ml de semen (fresco y diluido) empacadas en jeringas estériles descartables de 5ml que se envolvieron en papel aluminio que sirvió para mantener la temperatura y proteger el semen de los rayos del sol, para ser trasladadas hasta los laboratorios de microbiología de la carrera de Pecuaria perteneciente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM “MFL”) ubicada en el sitio el Limón en la ciudad de Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí donde se realizaron los análisis correspondientes a: Presencia, conteo e identificación de colonias bacterianas.

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la presente investigación se utilizó Diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con un arreglo de tratamiento bifactorial (2 × 2), utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Observación K-esima del i-esimo nivel del factor raza y j-esimo del factor semen.

μ = Media general.

α_i = Efecto del i-esimo nivel del factor A genotipo (Duroc, Landrace x Pietrain).

β_j = Efecto del j-esimo nivel del factor B tipo de semen (Fresco, diluido).

δ_k = Efecto del k-esimo bloque (semanas $k=1,2\dots 5$).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la ij-esima interacción A x B

ε_{ijk} = Error experimental

ADEVA:	
Fuentes de variación	Grados de libertad
A (Raza)	1
B (Semen)	1
A x B	1
Bloque	4
Error	12
Total	19

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza para conocer el efecto de los factores en estudio y su interacción en las variables dependientes a medir. Se encontraron diferencias estadísticas en el factor tipo de semen por lo que se procedió a realizar la comparación de medias a través de la técnica de Tukey al 5%, igualmente se procedió para conocer por medio de la prueba de T las comparaciones entre los grupos para las variables motilidad y aglutinación, debido a que no tienen una distribución normal. Todo por medio de un software estadístico (SAS, 2002. Versión 9).

Además se realizó la estadística descriptiva para las variables dependientes por medio de medidas de tendencia central (media) y dispersión (Desviación

estándar y coeficiente de variación). La determinación del grado de asociación de las variables dependientes se realizó a través de correlaciones estadísticas utilizando la técnica de Pearson.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SEMEN

A continuación, se presentaran los resultados del análisis de las distintas variables bajo estudio.

4.1.1. AGLUTINACIÓN

La aglutinación (Cuadro 4.1) en el genotipo Landrace x Pietrain es de 0,60 menor que en el genotipo Duroc que es 0,80 en promedio dando un 25% de diferencia estos se encuentran dentro de los parámetros normales ya que como lo explica Córdova *et al.* (2015) en algunas ocasiones, la presencia de aglutinación leve (de 0 a 2), desaparece al realizar la mezcla del eyaculado con el diluyente, merced a la estabilización química que proporciona este último.

Cuadro 4.1. Estadística descriptiva de la variable aglutinación con respecto al genotipo

Descriptores	Aglutinación	
	Landrace x Pietrain	Duroc
N	5	5
Promedio	0,60	0,80
Mínimo	0,00	0,00
Máximo	1	2
Error estándar	0,2449	0,3742

En el Cuadro 4.2 se detalla la prueba T para la variable aglutinación donde se observa que la variable posee una distribución de datos casi homogéneos y los valores entre genotipo y aglutinación se relacionan de manera directa positiva con $P=0,6666$, sin embargo, no existen diferencias estadísticas.

Cuadro 4.1 Prueba T para la variable aglutinación

GENOTIPOS	AGLUTINACIÓN			
	Media	Error	Prueba T	Valor P
LANDRACE X PIETRAIN	0,60	0,2449	0,45	0,6666
DUROC	0,80	0,3742		

4.1.2. MOTILIDAD

La motilidad (Cuadro 4.3) en los dos genotipos en promedio es prácticamente igual (85-86%) y se encuentran dentro de los parámetros normales, con

diferencia en el error estándar en el grupo genético Duroc. Estos resultados son superiores a los que presenta Carpio *et al.* (2008) en los que evaluó eyaculados de cerdos de las razas Hampshire, Duroc y Landrace y obtuvo valores de motilidad de $80 \pm 2\%$. Sin embargo, difieren de los reportados por Henao *et al.* (2004) en los que analizando el efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical usando reproductores de línea comercial PIC estableció valores de motilidad de 94,1%.

Cuadro 4.2 Estadística descriptiva de la variable motilidad con respecto al genotipo

Descriptores	Motilidad	
	Landrace x Pietrain	Duroc
N	5	5
Promedio	86%	85%
Mínimo	80%	80%
Máximo	90%	90%
Error estándar	1,8708	2,2361

Al realizar la prueba de T para la motilidad (Cuadro 4.4) se puede observar que los valores entre genotipo y motilidad se relacionan de manera directa positiva $P=0,7404$. Aunque no existen diferencias significativas entre los genotipos y esta variable.

Cuadro 4.3 Prueba T para la variable motilidad

GENOTIPOS	MOTILIDAD			
	Media	Error	Prueba T	Valor P
LANDRACE X PIETRAIN	86	1,8708	0,34	0,7404
DUROC	85	2,2361		

4.1.3. PH

En el cuadro 4.5 se observa la estadística descriptiva de la variable pH en la que se evidencia un promedio de 8,7 para el genotipo (Landrace x Pietrain), y 8,87 en el genotipo (Duroc). Con respecto al semen fresco la media de pH fue de 9 mientras que para el semen diluido fue de 8,55. Estos niveles de pH no coinciden con los valores normales ($7,4 \pm 0,2$) reportados por (Gadea, 2003). Esta elevación del pH se puede atribuir a una afección de tipo inflamatoria en las glándulas

sexuales accesorias del verraco (Ortiz, 2010). La alcalinidad del semen también se puede asociar al tipo de alimento que consumen los reproductores.

Cuadro 4.4 Estadística descriptiva de la variable pH con respecto a los factores en estudio

Descriptores	pH			
	Landrace x Pietrain	Duroc	Semen Fresco	Semen Diluido
N	5	5	5	5
Promedio	8,7	8,87	9	8,55
Mínimo	8	8,5	9	8
Máximo	9	9	9	9
Error estándar	0,1106	0,0764	0,0000	0,0898

La variabilidad observada en los factores principales e interacción se presenta en el análisis de varianza (Cuadro 4.6). En este se aprecia que el factor genotipo y su interacción (genotipo x tipo de semen) no fueron significativas estadísticamente; mientras que el factor tipo de semen arrojó un efecto altamente significativo ($P < 0,01$). Esta variación de pH con resultados estadísticamente diferentes, se puede atribuir al metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide que hace que el pH intracelular disminuya (Rigau *et al.* 1996). Además del efecto tampón que poseen los diluyentes (Gadea, 2003).

Cuadro 4.5 Análisis de varianza de la variable pH para los factores bajo estudio

Fuente	pH
	Pr > F
Genotipo	0,0760 MD
Tipo de semen	0,0000 **
Genotipo * Tipo de semen	0,0760 MD

MD: No significativo

** : Altamente significativo ($P < 0,01$)

4.1.4. UFC (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS)

Se encontró contaminación en 11 (55%) de las 20 muestras estudiadas. Se puede notar en el cuadro 4.7 que la magnitud de las unidades formadoras de colonias fueron superiores en el semen diluido ($11,2 \times 10^5$ ufc/ml) en contraste con el semen fresco ($9,61 \times 10^5$ ufc/ml) Esta superioridad en la contaminación del semen diluido se puede dar debido al acercamiento del semen con el aire,

procedimientos de colección, y la evaluación y procesamiento del semen (PIC, 2008). Estos valores sobrepasan los límites permitidos OIE (2007) para semen fresco.

La única bacteria aislada fue *Escherichia coli*, que se encontraron en todas las muestras positivas, tanto frescas o diluidas, esto corrobora lo reportado por Conza (2004) y Del Valle (2017) donde indican que las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* son aisladas en la mayor cantidad de los eyaculados de reproductores, independientemente del sistema de crianza que posean. Sin embargo, difieren de lo reportado por Acosta *et al.* (2011) en el que expone que bacterias como el *Streptococcus suis II*, la *E. coli*, y *Citrobacter frurundii* se presentan en menor grado en los aislados microbianos del semen porcino.

Esta contaminación de carácter bacteriológico en el semen, se puede dar por una inadecuada limpieza y desinfección de los sitios y materiales que se utilizan en el proceso de recolección y procesamiento del semen. Así mismo, la calidad del agua que se utiliza para realizar la dilución del semen está ligada fuertemente la contaminación en el semen diluido.

Cuadro 4.6 Estadística descriptiva de la variable UFC con respecto a los factores en estudio

Descriptores	UFC/ml			
	Landrace x Pietrain	Duroc	Semen fresco	Semen diluido
N	5	5	5	5
Promedio	7,000X10 ⁶	1,381X10 ⁷	9,610X10 ⁶	1,120X10 ⁷
Mínimo	0,000	0,000	0,000	0,000
Máximo	2,900X10 ⁷	4,080X10 ⁷	3,000X10 ⁷	4,080X10 ⁷
Error estándar	3,478X10 ⁶	5,442X10 ⁶	4,387X10 ⁷	4,990X10 ⁶

Se puede identificar un bajo valor de error estándar. Igualmente se observa que no se encontraron diferencias significativas entre los factores en estudio ni en su interacción (Cuadro 4.8).

Cuadro 4.7 Análisis de varianza de la variable UFC con respecto a los factores bajo estudio

Fuente	UFC/ml Pr > F
Genotipo	0,2261
Tipo de semen	0,1346
Genotipo * Tipo de semen	0,6294

4.2. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES

4.2.1. CORRELACIÓN ENTRE PH Y UFC

En el Cuadro 4.9 se puede observar que la correlación obtenida a pesar de ser negativa no es significativa al 5%. El valor de -0.43096 indica una relación de datos que podría ser más fuerte en caso de aumentar la cantidad de datos o robusticidad de la muestra. En cuanto a la significancia se observa que no es menor que el valor alfa designado, por lo que las dos variables en estudio no son significativas entre sí, por lo tanto, correlacionadas, pero no son causales una de la otra. Córdova *et al.* (2015) explica que bacterias resistentes a la gentamicina pueden provocar entre otros problemas, cambios en el pH del plasma seminal, generalmente asociados a procesos inflamatorios o disfunciones que afectan a las glándulas accesorias del verraco.

Cuadro 4.8 Correlación entre variables pH y unidades formadoras de colonias (UFC)

UFC	pH
SIGNIFICANCIA	-0,43096
	0,0578

4.2.2. CORRELACIÓN ENTRE MOTILIDAD Y AGLUTINACIÓN

En el Cuadro 4.10 se puede observar la correlación negativa que existe entre las variables. El valor de -0.88365 indica una relación de datos. En cuanto a la significancia se observa que es menor que el valor alfa, por lo que las dos variables en estudio son significativas entre sí. Esta correlación es significativa ya que cuando se eleva la aglutinación, disminuye la motilidad ya que los espermatozoides se encuentran adheridos entre si.

Cuadro 4.9 Correlación entre variables motilidad y aglutinación

AGLUTINACIÓN	MOTILIDAD
SIGNIFICANCIA	-0,88365
	0,0007

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La calidad microbiológica del semen de los reproductores del hato porcino no arrojó diferencias significativas para el tipo de semen o genotipos bajo estudio. Sin embargo, sus resultados sobrepasaron los límites permitidos de UFC/ml tanto en el semen fresco como el diluido, aislándose la bacteria *E. Coli* que es potencialmente patógena.

La calidad seminal de los reproductores se ve afectada por un pH elevado tanto en el semen fresco como diluido.

Se determinó una correlación negativa significativa entre la motilidad seminal y los niveles de aglutinación, ya que a mayores niveles de aglutinación disminuye el porcentaje de motilidad espermática.

5.2. RECOMENDACIONES

Elevar el nivel de bioseguridad de los sitios de colecta y procesamiento del semen.

Realizar procesos de limpieza y desinfección antes y después de realizar las colectas de semen.

Efectuar análisis microbiológicos del semen por lo menos una vez cada 3 meses.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M; Ruedas, M; Arias, T; Páez, R; Espinosa, I; Martínez, V. y Perdigón R. 2011. Evaluación de la contaminación bacteriana de semen porcino puro y diluido. CU. Livestock Research for Rural Development. Vol. 23. (4) p:80
- Acosta, M. 2013. Una reseña corta sobre la contaminación microbiológica del semen porcino y sus consecuencias. CU. Revista Computadorizada de Producción Porcina. Vol. 20. (3) p: 127-129.
- Althouse, G. 1999. Orígenes y efectos de la contaminación microbiológica en el semen porcino conservado. ES. Revista ANAPORC, Vol. (19)2 p: 83-94
- Ausejo, R; Mendoza, N; Miguel, J; Dahmani, Y; Fuentes, E. 2016. Contaminación bacteriana por biofilm en un centro de inseminación artificial de porcino. ES. Revista ANAPORC. Vol. 20 (1) p: 26-29
- Benítez, R; Navarrete, C; Lemus, Rueda, M; Arias, T; Orozco, M; y Hernández, J. 2009. Cambios de la motilidad en la prueba de termoresistencia empleando diferentes diluyentes para la criopreservación de semen porcino. (En línea). MX. Consultado, 25 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/78GGh1>
- Bravo, O. 2015. Manejo del semen para la producción de dosis. (En línea). AR. Consultado, 25 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/UQrcWr>
- Caiza, D. 2009. Manejo de verracos para la obtención y procesamiento de semen porcino e inseminación artificial. Tesis ing. Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Quito-Pichincha. EC. p 17-21.
- Carpio C., Mateo, Cadillo C., José, & Mellisho S., Edwin. 2008. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. PE. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Vol.19 (1) p: 15-19.
- Conza, L; Calle, S; Echevarría, L; Falcón, N; y Cerón, M. 2004. Evaluación bacteriológica de semen de verracos usados como reproductores en granjas porcinas de la zona de Lurín, Lima. PE. Revista Investigaciones Veterinarias Perú. Vol. 15 (2) p: 163-165.
- Cordova, A; Perez, J; Mendez, W; Villa, A; Huerta, R. 2015. Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. MX. Revista Zootecnia Tropical. Vol. 26 (1) p: 69-74.
- Cuesta, G; Reyes, I; Dominguez, J; Da Silva, S. 2011. Ablación del divertículo prepucial en el cerdo como profilaxis. ES. Revista electronica veterinaria, Vol. 12 (2) p: 1-7.

- Del Valle, R. 2017. Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos utilizados en monta natural. CU. Revista electronica de veterinaria. Vol. 18 (10) p:1-17.
- Estación Meteorológica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López". ESPAM MFL. (2016).
- Franco, J. 2010. Inseminación artificial en porcinos. (en línea). CO. Consultado 25 oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/0HZtCA>
- Gadea, J. 2003. Los diluyentes de la inseminación artificial porcina. (En línea). MX. Consultado, 18 de feb. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3394/articulos-porcino-archivo/los-diluyentes-de-inseminacion-artificial-porcina.html>
- Henao, G; Trujillo, L; Henao, M; Sierra, C; Correa, G; González, Ó. 2004. Efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical. CO. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Vol. 57 (2) p: 235-237.
- Kubus. 2010. Manual práctico para profesionales de inseminación artificial porcina. (En línea). ES. Consultado, 25 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/Ggt0AO>
- Le Coz, Ph. 2006a. La recolección del semen. (En línea). Consultado, 25 de oct. 2017. Disponible en: <https://goo.gl/xyKcKG>
- Le Coz, Ph. 2006. Las enfermedades y el semen (En línea). Consultado, 18 de feb. 2018. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/las-enfermedades-y-el-semen_4030/
- Maroto, L.O. 2006. Escherichia coli as contaminant of boar semen: role of F1 fimbrial lectins in the sperm agglutination phenomena. Tesis DrSci. Institute of Molecular Biology and Biotechnology. Bruselas. pp 150
- OIE (Organización internacional de epizootias). 2007. Código Sanitario para los Animales Terrestres. (En línea). FR. Consultado, 26 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/HfsM2F>
- Ortiz, A. 2010. Manejo del semen porcino. (En línea). AR. Consultado, 25 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/E62B8P>
- Pérez Llano B., Sánchez Sánchez R., Yenes García P., García Casado P. 2001. Control de la contaminación en semen de verraco. ES. EDIPORC. Vol. 38. p: 74-79.
- PIC (Pig Improvement Company). 1996. Manual de procedimientos de inseminación artificial. Equipo Técnico de PICPORGEN, Colina, Chile.

- PIC (Pig Improvement Company). 2008. La contaminación del semen porcino. (En línea). MX. Consultado, 25 de oct. 2018. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/EBYkTw>
- PIC (Pig Improvement Company). 2015. Manual de manejo del centro de sementales de PIC. (En línea). ES. Consultado, 19 de febr. 2018. Formato PDF. Disponible en: http://na.picgenus.com/sites/genuspic_com/Uploads/RS1198_SPN_Boar%20Manual_2015_FINAL2.pdf
- Pineida, Y. y Santander, J. 2007. Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. VE. Revista Zootecnia Tropical. Vol 25(3). P 173-177.
- Rigau, T; Piedrafita, J; Reverter A; Canal, M; Rodríguez; J. 1996. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. US.Anim. Reprod. Sci. Vol. 43 (43) p: 161-172.
- Rivera, R. 1997. Evaluación de tres Diluyentes en Semen Porcino para uso a 96 y 129 horas Posteriores a la Colecta. Tesis. Med. Vet. Universidad Central del Ecuador. Quito. EC. p 18.
- Rocha, G. 2005. Desarrollo de técnicas para mejorar la calidad de dosis de semen para la inseminación artificial porcina. Tesis. Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima. Colima, MX. p 12. (En línea). Consultado 25 oct. 2017. Disponible en: <https://goo.gl/b0zrJ5>
- Rodríguez, H. 2013. Evaluación de la calidad seminal en el verraco. (En línea). SE. Consultado, 25 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/OOdOyi>
- Rugeles, C; Caicedo, R; Almentero, C; Linares J; Vergara, O. 2013. Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA® nota técnica. CO. Revista Científica FCV-LUZ. Vol.23 (3) p: 206-210
- Sánchez, M. 2008. El verraco: producción y manejo. (En línea). MX. Consultado, 25 de oct. 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://goo.gl/Oj39HT>
- Valencia, C. 2006. Elaboración de diluyente de semen porcino. Tesis ing. Agroindustrial. Escuela Politecnica Nacional. Quito-Pichincha. EC. p 26-28

ANEXOS

Anexo 1. Reproductor sobre el maniquí de colección



Anexo 2. Recolección del semen



Anexo 3. Dilución del semen porcino



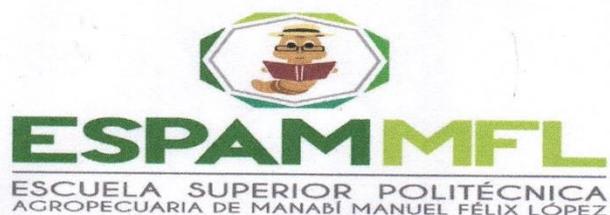
Anexo 4. Análisis de motilidad y aglutinación del semen porcino



Anexo 5. Empaque de las muestras de semen porcino



Anexo 6. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, primera semana

**REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

Ciente:	Yeisson Bladimir Vera Cifuentes	RUC:	1724417017
Dirección:	Calceta	N° de análisis	034
Teléfono:	0968592331	Fecha de recibido	06/12/2017
Nombre de la Muestra:	S1R1SF S1R2SF S1R1SD S1R2SD	Fecha de análisis	06/12/2017
Cantidad Recibida:	3 ml	Fecha de muestreo	06/12/2017
Objetivo del muestreo:	Control de calidad	Fecha de reporte	08/12/2017

RESULTADOS

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S1R1SF	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	290X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	6X10 ⁵	Positivo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S1R2SF	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	300X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	53X10 ⁵	Positivo	UFC/ml

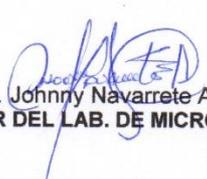
Anexo 7. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, primera semana



MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S1R1SD	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	208X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	35X10 ⁵	Positivo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S1R2SD	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	408X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	-----	Negativo	UFC/ml




 Blgo. Johnny Navarrete A.
COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 8. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, segunda semana



ESPAM MFL
 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LOPEZ

REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS			
Cliente:	Yeisson Bladimir Vera Cifuentes	RUC:	1724417017
Dirección:	Calceta	N° de análisis	036
Teléfono:	0968592331	Fecha de recibido	13/12/2017
Nombre de la Muestra:	S2R1SF S2R2SF S2R1SD S2R2SD	Fecha de análisis	13/12/2017
Cantidad Recibida:	3 ml	Fecha de muestreo	14/12/2017
Objetivo del muestreo:	Control de calidad	Fecha de reporte	15/12/2017

RESULTADOS			
MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD
S2R1SF	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo
	Determinación de E. Coli	---	Negativo
S2R2SF	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	300X10 ⁵	Positivo
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	532X10 ⁵	Positivo

COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 9. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, segunda semana



ESPAM MFL
 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S2R1SD	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	172X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	264X10 ⁵	Positivo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S2R2SD	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	332X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	687X10 ⁵	Positivo	UFC/ml



Blgo. Johnny Navarrete A.
COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 10. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, tercera semana

**REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

Cliente:	Yeisson Bladimir Vera Cifuentes	RUC:	1724417017
Dirección:	Calceta	Nº de análisis	037
Teléfono:	0968592331	Fecha de recibido	20/12/2017
Nombre de la Muestra:	S3R1SF S3R2SF S3R1SD S3R2SD	Fecha de análisis	20/12/2017
Cantidad Recibida:	3 ml	Fecha de muestreo	21/12/2017
Objetivo del muestreo:	Control de calidad	Fecha de reporte	22/12/2017

RESULTADOS

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S3R1SF	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	---	Negativo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S3R2SF	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	14X10 ⁵	Positivo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	75X10 ⁵	Positivo	UFC/ml

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

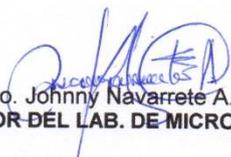
Anexo 11. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, tercera semana



MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S3R1SD	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	---	Negativo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS		UNIDAD
S3R2SD	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	---	Negativo	UFC/ml




 Blgo. Johnny Navarrete A.
COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 12. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, cuarta semana



ESPAMMFL
 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ

REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS			
Cliente:	Yeisson Bladimir Vera Cifuentes	RUC:	1724417017
Dirección:	Calceta	N° de análisis	038
Teléfono:	0968592331	Fecha de recibido	27/12/2017
Nombre de la Muestra:	S4R1SF S4R2SF S4R1SD S4R2SD	Fecha de análisis	13/12/2017
Cantidad Recibida:	3 ml	Fecha de muestreo	14/12/2017
Objetivo del muestreo:	Control de calidad	Fecha de reporte	15/12/2017

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD
S4R1SF	Determinación de Aerobios Mesófilos	30X10 ⁵	Positivo
	Determinación de E. Coli	110X10 ⁵	Positivo

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD
S4R2SF	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	10X10 ⁵	Positivo
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	23X10 ⁵	Positivo

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 13. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, cuarta semana



ESPAM MFL
 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LOPEZ

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD	
S4R1SD	Determinación de Aerobios Mesófilos Presencia: <i>Escherichia coli</i>	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli Grupo Aislado: <i>Escherichia coli</i>	---	Negativo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD	
S4R2SD	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	---	Negativo	UFC/ml



Blgo. Johnny Navarrete A.
COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 14. Análisis microbiológico del semen porcino fresco, quinta semana



ESPAMMFL
 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LOPEZ

REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS			
Cliente:	Yeisson Bladimir Vera Cifuentes	RUC:	1724417017
Dirección:	Calceta	N° de análisis	039
Teléfono:	0968592331	Fecha de recibido	3/01/2018
Nombre de la Muestra:	S5R1SF S5R2SF S5R1SD S5R2SD	Fecha de análisis	3/01/2018
Cantidad Recibida:	3 ml	Fecha de muestreo	3/01/2018
Objetivo del muestreo:	Control de calidad	Fecha de reporte	5/01/2018

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD
S5R1SF	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo
	Determinación de E. Coli	---	Negativo

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD
S5R2SF	Determinación de Bacterias Presencia: <i>Escherichia coli</i>	17X10 ⁵	Positivo
	Determinación de <i>Escherichia coli</i>	35X10 ⁵	Positivo

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com

Anexo 15. Análisis microbiológico del semen porcino diluido, quinta semana



ESPAM MFL

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LOPEZ

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD	
S5R1SD	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	---	Negativo	UFC/ml

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	UNIDAD	
S5R2SD	Determinación de Aerobios Mesófilos	---	Negativo	UFC/ml
	Determinación de E. Coli	---	Negativo	UFC/ml



Blgo. Johnny Navarrete A.
COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
Correo: lab_microbiologiapecuaria@hotmail.com