

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS DE GRADO

**“EVALUACIÓN DE FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD
MICROBIOLÓGICA DEL SEMEN DE BOVINO (*Bos taurus*) PROCESADO EN LA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL CHOQUENAIRA”**

**Presentado por:
CESAR FRANCO ASPORT PATZI**

La Paz - Bolivia

2022

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EVALUACIÓN DE FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD
MICROBIOLÓGICA DEL SEMEN DE BOVINO (*Bos taurus*) PROCESADO EN LA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL CHOQUENAIRA”

Tesis de Grado presentado como requisito

Parcial para optar por el Título de

Licenciatura en Medicina Veterinaria y

Zootecnia

CESAR FRANCO ASPORT PATZI

ASESORES:

Ing.M.Sc. Rubén Tallacagua Terrazas

MVZ. Rodrigo Juan Aliaga Álvarez

Lic. Marcelina Condori Ticona

TRIBUNAL EXAMINADOR

MVZ. M.Sc. Martha Gutiérrez Vásquez

Ing. Eloy Hernan Huacani Rivera

MVZ. M. Sc Carlos Alejandro Palma Dávila

Aprobado

Presidente Tribunal Examinador:

La Paz – Bolivia

2022

Dedicatoria

A mis padres Mery, Juan a mis abuelos Mercedes, Teodora, Luis, Raúl por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia durante el tiempo que me prepare para presentar el siguiente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios a la vida por esta gran oportunidad de vivir y ayudar a los demás.

A:

Mis padres Juan Carlos Asport Garnica, Lidia Mery Patzi Huaraya, (abuelos) Luis Asport, Raúl Patzi, Mercedes Garnica, Teodora Huaraya por toda la ayuda incondicional, paciencia y amor en mi formación, por forjarme valores y apoyando en mi educación. Estaré eternamente agradecido por todo lo que me brindaron.

Mis hermanos Carlos y Marcelo Asport, por siempre apoyarme, cuidarme y animarme a seguir adelante, por los consejos que me dieron en cada etapa de mi vida.

Mis tíos Osvaldo, María, José y Marcos Asport, Olga, Cristina, Erika, Cristina y Rosario Patzi por brindarme ayuda y consejos, por dejarme poner a prueba lo que aprendí con sus mascotas.

Mis asesores Lic. Marcelina Condori Ticono, M.V.Z. Rodrigo Juan Aliaga Alvarez Ing. M. SC. Ruben Tallacagua, por su ayuda, consejos, quien con sus conocimientos, tiempo y paciencia me apoyaron desde un inicio, me guiaron a través de cada etapa de este trabajo, siendo grandes profesionales en su área correspondiente así también resaltando su calidez y lo maravillosas personas que son.

M.V.Z. M.Sc. Martha Gutiérrez Vásquez, Ing. Eloy Hernan Huacani Rivera M.V.Z. M.Sc. Carlos Alejandro Palma Dávila por las correcciones y colaboraciones realizadas a este trabajo.

A todos los docentes de la facultad de agronomía enfatizando a los de Medicina Veterinaria y Zootecnia por todo el conocimiento que me dieron.

A todos los doctores donde realicé prácticas por sus consejos y comprensión al realizar este trabajo

A mis amigos por lo grato momento que vivimos en cada etapa de nuestra formación por los momentos que compartimos en las aulas y prácticas

Muchas gracias a todos

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes	2
1.2	Justificación	4
1.3	Planteamiento del Problema	5
1.4	Identificación del Problema	6
2	OBJETIVO	7
2.1	Objetivos específicos	7
3	HIPÓTESIS.....	7
3.1	Hipótesis nula	7
3.2	Hipótesis alterna	7
4	REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1	Generalidades de Bovino.....	7
4.1.1	Bovinos sementales	7
4.1.2	Raza Pardo Suizo	8
4.1.3	Raza Holstein	8
4.2	Características Generales del Semen	8
4.2.1	Eyaculado.....	8
4.2.2	Semen Bovino	9
4.2.3	Recolección de Semen Bovino.....	9
4.2.4	Área de Trabajo y Recolección del Semen	10
4.2.5	Semen Congelado.....	10
4.2.6	Evaluación Macroscópica del Semen Bovino.....	11

4.2.6.1	Color	11
4.2.6.2	Volumen	11
4.2.6.3	Olor	11
4.2.7	Evaluación Microscópica del Semen Bovino	11
4.2.7.1	Motilidad.....	11
4.2.7.2	Concentración	12
4.2.7.3	Vigor.....	12
4.2.8	Diluyente	12
4.2.8.1	Lincomicina	12
4.2.8.2	Gentamicina	12
4.2.8.3	Espectinomicina	12
4.2.8.4	Tilosina.....	13
4.3	Control de ambiente.....	13
4.3.1	Microorganismos en la piel.....	13
4.3.1.1	Microorganismo de la piel en manos.....	13
4.3.2	Descripción bacteriana en manos	13
4.3.2.1	Genero <i>Staphylococcus spp</i>	13
4.3.2.2	Genero <i>Streptococcus spp</i>	14
4.3.2.3	Genero <i>Bacillus spp</i>	14
4.3.2.4	Genero <i>Corynebacterium spp</i>	14
4.3.2.5	Genero <i>Clostridium spp</i>	14
4.3.2.6	Lavado de manos.....	14
4.3.3	Descripción bacteriana en la vagina artificial.....	15

4.3.4	Descripción bacteriana en la piel del prepucio de toros	15
4.3.4.1	Desarrollo microbiológico en el prepucio de toro	16
4.3.4.2	Genero <i>Escherichia coli</i>	16
4.3.4.3	Genero <i>Pseudomona spp.</i>	16
4.3.5	Descripción bacteriana en el laboratorio	17
4.3.5.1	Calidad ambiental de laboratorio.....	17
4.3.5.2	Genero <i>Staphylococcus spp</i>	18
4.3.5.3	Genero <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.3.5.4	Genero <i>Streptococcus spp</i>	19
4.3.5.5	Género <i>Escherichia coli</i>	19
4.3.5.6	Genero <i>Pseudomona spp.</i>	19
4.3.6	Antisépticos y desinfectantes	20
4.3.6.1	Clorhexidina	20
4.3.6.2	Hipoclorito de sodio.....	20
5	LOCALIZACIÓN.....	21
5.1	Descripción del lugar	22
5.1.1	Clima	22
5.1.2	Producción pecuaria.....	22
5.1.3	Producción agraria	22
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1	Materiales	23
6.1.1	Materiales de laboratorio	23
6.1.2	Material de colecta	23

6.2	METODOLOGÍA	24
6.2.1	Factores de estudio y valores de respuesta	26
6.2.2	Primera fase diagnostico	27
6.2.2.1	Preparación de material.	27
6.2.3	Preparación de medios de cultivo	27
6.2.4	Toma de muestra	27
6.2.5	Procesado de muestras.....	28
6.2.6	Diagnostico.....	28
6.2.7	Segunda fase aplicación de tratamiento.....	28
6.2.8	Área de colecta de semen bovino	29
6.2.8.1	Enjuague de prepucio	29
6.2.8.2	Enjuague de manos	30
6.2.8.3	Enjuague de vagina artificial	30
6.2.9	Área evaluación morfológica del semen.....	31
6.2.9.1	Medio ambiente.....	31
6.2.9.2	Semen fresco	32
6.2.10	Área de criopreservacion de semen.....	32
6.2.10.1	Semen congelado.....	32
6.2.11	Sembrado de muestra.....	32
6.2.12	Conteo de colonias	33
6.2.13	Modelo estadístico	33
7	RESULTADOS y DISCUSIONES	33
7.1	Área de colecta de semen	33

7.1.1	Prepucio	33
7.1.2	Vagina Artificial.....	41
7.1.3	Lavado de Manos.....	48
7.2	Área de morfología del semen.....	55
7.2.1	Medio Ambiente del Laboratorio.....	55
7.2.2	Semen Fresco	59
7.3	Semen Congelado	63
8	CONCLUSIONES	66
9	RECOMENDACIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Mesofilos Aerobios Totales en el Prepucio del Semental de Toro	33
Tabla 2 Análisis de Varianza Prepucio Mesofilos Aerobios Totales	34
Tabla 3 Prueba de Duncan Variable Prepucio Mesofilos Aerobios Totales	35
Tabla 4 Coliformes Totales en el Prepucio del Semental de Toro	36
Tabla 5 Análisis de Varianza en el Prepucio Coliformes Totales	36
Tabla 6 Prueba de Duncan Variable Prepucio Coliformes Totales	37
Tabla 7 Staphylococcus aureus en el Prepucio del Semental de Toro	38
Tabla 8 Análisis de Varianza Prepucio Staphylococcus aureus	38
Tabla 9 Prueba de Duncan Variable Prepucio Staphylococcus aureus	39
Tabla 10 Mesofilos aerobios totales en la Vagina Artificial.....	41
Tabla 11 Análisis de Varianza Vagina Artificial Mesofilos Aerobios Totales	42
Tabla 12 Prueba de Duncan Variable Vagina Artificial Mesofilos Aerobios Totales	42
Tabla 13 Coliformes Totales en la Vagina Artificial	43
Tabla 14 Análisis de Varianza Vagina Artificial Coliformes Totales	44
Tabla 15 Prueba de Duncan Variable Vagina Artificial Coliformes Totales	44
Tabla 16 Staphylococcus aureus en la Vagina Artificial	45
Tabla 17 Análisis de Varianza Vagina Artificial Staphylococcus aureus	46
Tabla 18 Prueba de Duncan Variable Vagina Artificial Staphylococcus aureus	46
Tabla 19 Mesofilos Aerobios Totales en el Lavado de Manos	48
Tabla 20 Análisis de Varianza Lavado de Manos Mesofilos Aerobios Totales...	49

Tabla 21 Prueba de Duncan Variable Lavado de Manos Mesofilos Aerobios	
Totales.....	49
Tabla 22 Coliformes Totales en el Lavado de Manos	50
Tabla 23 Análisis de Varianza Lavado de Manos Coliformes totales.....	51
Tabla 24 Prueba de Duncan Variable Lavado de Manos Coliformes Totales	51
Tabla 25 Staphylococcus aureus en el Lavado de Manos	52
Tabla 26 Análisis de Varianza Lavado de Manos Staphylococcus aureus.....	53
Tabla 27 Prueba de Duncan Variable Lavado de Manos Staphylococcus aureus	
.....	53
Tabla 28 Mesofilos Aerobios Totales en el Medio Ambiente del Laboratorio	55
Tabla 29 Análisis de Varianza Medio Ambiente del Laboratorio Mesofilos	
Aerobios Totales.....	56
Tabla 30 Prueba de Duncan Variable Medio Ambiente del Laboratorio Mesofilos	
Aerobios Totales.....	56
Tabla 31 Coliformes Totales en el Medio Ambiente del Laboratorio	57
Tabla 32 Staphylococcus aureus en el Medio Ambiente del Laboratorio	57
Tabla 33 Mesofilos Aerobios Totales en el Semen Fresco	59
Tabla 34 Análisis de Varianza Semen Fresco Mesofilos Aerobios Totales.....	59
Tabla 35 Prueba de Duncan Variable Semen Fresco Mesofilos Aerobios Totales	
.....	60
Tabla 36 Coliformes Totales en el Semen Fresco	60
Tabla 37 Staphylococcus aureus en el Semen Fresco	61
Tabla 38 Análisis de Varianza Semen Fresco Staphylococcus aureus.....	61

Tabla 39 Análisis de Varianza Semen Fresco Staphylococcus aureus.....	62
Tabla 40 Mesofilos Aerobios Totales en el Semen Congelado	63
Tabla 41 Coliformes Totales en el Semen Congelado	64
Tabla 42 Staphylococcus aureus en el Semen Congelado	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Ubicación de la Estación experimental de Choquenaira</i>	21
Figura 2 <i>Flujograma de Colecta de Semen Bovino</i>	25
Figura 3 <i>Factores de Estudio y Variables de Respuesta por Área Evaluada</i>	26
Figura 4 <i>Aplicación de Tratamiento</i>	29
Figura 5 <i>Croquis del Laboratorio de Biotecnología en la Estación Experimental de Choquenaria</i>	32

GLOSARIO

UFC: Unidad Formadora de Colonia

ED: Evaluación Diagnostica

T1: Tiempo 1

T2: Tiempo 2

T3: Tiempo 3

P: Prepucio

LM: Lavado de Manos

VA: Vagina Artificial

MA: Medio Ambiente del Laboratorio

SF: Semen Fresco

SC: Semen Congelado

RESUMEN

Con el objeto de evaluar los factores que influyen la calidad microbiológica del semen, elaborado en la Estación Experimental Choquenaira en la gestión 2021, se evaluaron dos áreas de procesamiento de semen.

El tipo de investigación utilizado fue cuantitativa con un diseño experimental, transversal (seis variables y tres indicadores de cada uno). Se realizó un diagnóstico del laboratorio de biotecnología del procesamiento de obtención de semen, de la Estación Experimental de Choquenaira sobre el desarrollo de sus actividades en dos áreas: colecta y morfología del semen. Evaluando factores críticos: lavado de manos (LM), prepucio (P), vagina artificial (VA) y medio ambiente (MA), factores que afectan la calidad microbiológica del semen bovino Aplicando un tratamiento y protocolos de higiene en 3 tiempos (T) con intervalos de 2 meses, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. La evaluación se realizó con el análisis de varianza ($p < 0,05$) y comparación de medias con la prueba de Duncan. Para la interpretación de resultados se utilizó valores de referencia de la OPS y FAO.

Los resultados hallados en la investigación son: en las área de Colecta y Morfología del semen, la evaluación diagnostica de calidad microbiológica de los indicadores Mesofilos Aerobios Totales, Coliformes Totales y *S. aureus*, el 100% no ingresa dentro de los valores de referencia según la OPS (< 100 UFC/ml LM y P; < 10 UFC/ml VA; < 10 UFC/placa MA) y FAO (500 UFC/ml SF y SC). Se aplicó tratamiento (clorhexidina, protocolo de higiene) en tres tiempos, en las dos áreas de investigación: T1, en la evaluación microbiológica de ambas áreas, se logra disminuir la carga microbiológica en todos los Indicadores, pero en el área de colecta aun no ingresa dentro de los valores de referencia; T2 aún se tiene problemas con el prepucio y lavado de manos mostrando un desarrollo microbiológico que supera el rango utilizado; T3 todos los indicadores ingresan dentro de los valor de referencia, a la aplicación del análisis de varianza se observa una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$).

Se concluye que con la aplicación de clorhexidina, protocolos de higiene, capacitación continua se obtiene un semen de calidad, aceptando así la hipótesis alterna.

Palabras clave. Semen Fresco, Semen Congelado, UFC, Microbiológico

SUMMARY

In order to evaluate the factors that influence the microbiological quality of semen, produced at the Choquenaira Experimental Station in 2021, two semen processing areas were evaluated.

The type of research used was quantitative with an experimental, cross-sectional design (six variables and three indicators of each one). A diagnosis was made of the biotechnology laboratory of the Choquenaira Experimental Station on the development of its activities in two areas: semen collection and morphology in the semen collection process, evaluating critical factors that affect the microbiological quality of bovine semen: washing of hands (LM), foreskin (P), artificial vagina (VA) and environment (MA). Applying a treatment and hygiene protocols in 3 times (T) with intervals of 2 months, the samples were processed in the Microbiology Laboratory of the Veterinary Medicine and Zootechnics Program. The evaluation was carried out with the analysis of variance ($p < 0.05$) and comparison of means with Duncan's test. For the interpretation of results, reference values from PAHO and FAO were used.

The results found in the investigation are: in the areas of Collection and Morphology of semen, the diagnostic evaluation of microbiological quality of the indicators Total Aerobic Mesophylls, Total Coliforms and *S. aureus*, 100% do not enter within the reference values according to OPS (< 100 CFU/ml LM and P; < 10 CFU/ml VA; < 10 CFU/plate MA) and FAO (500 CFU/ml SF and SC). Treatment (chlorhexidine, hygiene protocol) was applied in three times, in the two research areas: T1, in the microbiological evaluation of both areas, it is possible to reduce the microbiological load in all the Indicators, but in the collection area not yet enter within the reference values; T2 still has problems with the foreskin and hand washing showing a microbiological development that exceeds the range used; T3 all the indicators enter within the reference values to the application of the analysis of variance, a significant statistical difference is observed ($p < 0.05$).

It is concluded that with the application of chlorhexidine, hygiene protocols, continuous training, quality semen is obtained, thus accepting the alternative hypothesis.

Keywords: Fresh Semen, Frozen Semen, CFU, Microbiological

1 INTRODUCCIÓN

La Estación Experimental de Choquenaira es una referencia de producción de semen criopreservado en la región del altiplano más específicamente en la provincia Ingavi donde se produce pajuelas para la inseminación de bovinos. Dicha producción permite tener el material genético de las razas Holstein y Pardo Suizo para beneficiar a las producciones aledañas.

La criopreservación de semen es la obtención de muestra seminal de un individuo que será evaluada, procesada y almacenada hasta el momento de su uso, es una actividad que busca mejorar y beneficiar la producción de cualquier tipo de ganadería ayudando en la obtención de buenos ejemplares, según la metodología utilizada el procedimiento debe cumplir con las normas de bioseguridad y asepsia. Chipana (2014).

La evaluación e identificación de factores que influyen en la calidad microbiológica del semen nos guio a implementar protocolos de higiene y supervisión del personal al momento de realizar la colecta de semen en busca de tener un producto inocuo. Si bien el trabajo que se desarrolla en el laboratorio ha brindado resultados no tiene una evaluación de factores de contaminación que afecta la calidad del semen bovino

Es por ello que la evaluación de los factores en cada área de la colecta de semen nos permite apreciar el trabajo que se realizó en el lugar, esta labor debe estar supervisados por un personal, que tenga conocimiento de las normas mínimas de higiene y bioseguridad. La metodología repetitiva hace considerar al personal que algunos factores no son de riesgo para la contaminación del semen.

El semen en condiciones normales no presenta microorganismos patógenos, a menos que el individuo tenga alguna patología o la recolecta de semen se realice de forma que no haya las medidas de asepsia correctas, es por eso que se presenta contaminación en la calidad del semen y esto puede generar alteraciones en los espermatozoides, como ser en el plasmida seminal. Morales et al. (2013)

El tipo de investigación utilizado fue cuantitativa con un diseño experimental, transversal. Se realizó un diagnóstico en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental de Choquenaira del desarrollo de sus actividades, evaluando factores críticos que afectan la calidad microbiológica del semen bovino, aplicando un

tratamiento y protocolos de higiene procesando las muestras en el Laboratorio de Microbiología del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Por la aplicación del tratamiento, protocolos y seguimiento se apreció en este trabajo el descenso de microorganismos que ingresan dentro del valor de referencia utilizado. Todo esto se logró por la capacitación que se dio en el momento de la colecta al personal.

1.1 Antecedentes

(Echeverri Echeverry, 2015) determinó que las pajillas de semen congelado con una buena manipulación en la colecta de semen permiten tener una mejor calidad del producto sin tener riesgo de contaminación que afecte a los espermatozoides al momento de la inseminación. (Cuadra Jama, 2012) explica que en la evaluación del semen no se debe apreciar bacterias o cualquier tipo de impureza ya que esto será un indicador de contaminación demostrando así una mala colecta y que el semen no es adecuado para su uso ya que podrá afectar a la fisiología de la hembra.

Moran et al. (2021) en una evaluación realizada a una producción lechera determina que el uso de la inseminación artificial trajo consigo mejoras en la cantidad de preñez alta y el descenso de 90% patologías reproductivas siendo las más comunes causadas por bacterias *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, y hongos *Aspergillus*, para garantizar la calidad seminal se realizan controles trimestrales de las pajillas al azar.

Chipana (2014) realizó una evaluación microbiológica del semen bovino de la Estación Experimental de Choquenaira donde identificó bacterias *Pseudomona spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli* y *Proteus spp*, determinando también la UFC/ml en los sementales: *Pseudomona spp*. 850 UFC/ml, *Staphylococcus spp*. 300 UFC/ml *Streptococcus spp*, 200 UFC/ml *Escherichia coli* 250 UFC/ml llegando a la conclusión de que siempre existirá bacterias pero estas deben estar bajo la norma de calidad.

Para Gómez y Silveira (2005) realizó una evaluación de 206 muestras de semen fresco de bovino donde la identificación de bacterias fue *Escherichia coli* (50,6%), otras *Enterobacterias* (27,7%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (26,2%) y *Staphylococcus*

aureus (17,5%) determinando que los posibles factores de contaminación son la vagina artificial, prepucio y material no desinfectado adecuadamente.

Catena et al. (1998) evaluó 59 pajillas seminales de bovino nacionales e importadas donde en el 80% presentaba bacterias del genero *Mycobacterium* spp. Determinando así la mala metodología de colecta de semen, el factor de contaminación fue en las primeras fases de colecta y evaluación donde no se tomó las medidas adecuadas de bioseguridad obteniendo un producto de pésima calidad.

Morales et al. (2013) en una evaluación de 42 pajillas seminales de semen bovino mediante la evaluación microscópica y por medios de cultivo se vio el desarrollo de bacilos no fermentadores 27,08%, *Pseudomona* spp. 18,75%, *Micrococcus* spp. 16,66% *Bacillus* spp. 14,58% *Staphylococcus* spp. 12,5% y *Pasteurella* spp. 2,08% determinando así que no es posible tener semen estéril.

Hernández et al. (2017) determina que el material de colecta de semen, tubos de recolección y vagina artificial son los principales factores de contaminación al estar en contacto directo con el semen fresco, encontrando así: *Pseudomona* spp. 15,9% y *Staphylococcus* spp. 4,7% aun así estos materiales estaban desinfectados antes de su uso.

R. Muiño et al. (2005) demuestran que la implementacion de nuevas tecnicas al momento de obtener semen y almacenarlo, para ello determinan que mientras mas evaluaciones se pueda realizar al semen como ser motilidad, cantidad bacteriana, viabilidad, sera un producto mas seguro capaz de garantizar una taza de preñez alta de 98% llevando acabo practicas de fecundacion invitro atendiendo diferentes atributos espermaticos.

Los factores para la contaminación del semen son muchos por lo general la contaminación se da en la extracción del mismo por fallas humanas como ser la manipulación de los materiales y el animal. Arauz S et al. (2000). o llevarse a cabo por infecciones en el aparato genito urinario, es por eso que la evaluación constante de un veterinario será vital en la colecta de semen bajando así a taza de contaminación. Serrano M. et al. (1994).

M. Acosta (2009) en un estudio realizado en la evaluación de semen de verraco determinaron que la cantidad bacteriana puede afectar el plasma seminal en un 70% afectando la motilidad de los espermatozoides, así también trayendo consigo consecuencias de futuras infecciones en el útero de la hembra.

Kozdrowski et al. (2005) comprobaron que 10000 ufc/ml pueden llegar a causar infecciones en el aparato genito-urinario de la hembra afectando también la viabilidad espermática.

Yaniz (2010) determinaron el grado de contaminación del semen de carnero donde el principal factor de contaminación será la manipulación humana y ambiental donde se apreciara bacterias *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, siendo sensibles a la Gentamicina y Ceftiofur.

Toniolli et al. (2002) realizaron una evaluación del prepucio donde determinaron la cantidad de bacterias aplicando 3 tipos de tratamientos con agua potable que son A= lavado interno y externo del prepucio, B= sin limpieza del prepucio y C= lavado externo del prepucio, realizando lavados con agua destilada, donde el mejor dato fue del tratamiento C= ($2,5 \times 10^5$ UFC/enjuague), esto debiéndose a que no existió contaminación por parte del glande del pene, sosteniendo la teoría de que siempre existirá microorganismos en la piel. Usándolo como referencia para futuras investigaciones dicho resultado.

Taddei Moran et al. (2019) realizaron pruebas de lavado de manos y piel quirurgico en estudiantes utilizando el dato de referencia de la OPS que es 100 UFC/ml teniendo como resultado en el grupo A 10000 UFC/ml y el grupo B 4400 UFC/ml determinando fallas en el conocimiento de lavado adecuado de manos.

1.2 Justificación

La Estación Experimental de Choquenaira es una referencia de producción de semen criopreservado en la región del altiplano. Dicha producción permite tener el material genético de las razas Holstein y Pardo Suizo para beneficiar a las producciones aledañas.

Para llevar a cabo este proceso, el personal constantemente debe tener en cuenta las normas de bioseguridad, asepsia y desinfección necesarias en cada fase que implica elaborar pajuelas seminales, para evitar una contaminación y posterior pérdida de la materia prima.

Por esta razón, se requiere realizar estos estudios para capacitar con protocolos de normas básicas de bioseguridad, manejo y desinfección de material al usar para la recolección de semen, también a identificar los factores que afectaran la calidad microbiológica del semen.

Es por eso que se implementó el uso del antiséptico clorhexidina 20%, desinfectante hipoclorito de sodio al 0,8%, protocolos y seguimiento evaluando los resultados acerca del desarrollo de microorganismos que afectaran la calidad del semen.

1.3 Planteamiento del Problema

¿Existe contaminación en la obtención de la muestra seminal de toros en la Estación Experimental de Choquenaira?

La contaminación de la muestra seminal puede deberse a muchos factores sea cual fuese este afectara la calidad del mismo, influyendo en la tasa de preñez al momento de su uso es por eso que si no se llega a identificar los factores que afectaran la calidad seminal generara perdidas económicas para la estación, proveedor y productor. Si tomamos en cuenta la metodología de la recolección de semen este posee 3 fases que son: la colecta, evaluación y criopreservación

En la fase de colecta se tomaran como factores: la vagina artificial, prepucio, y lavado de manos que estarán directa o indirectamente relacionados con la muestra fresca de semen, ya que esta fase es la más crítica por estar en un ambiente abierto con movimiento del personal y otros animales. Según Román et al. (2014) el ambiente en el área de colecta debe ser espacioso y limpio el operador debe ser diestro y usar guantes de látex al momento de manipular la base del pene, tener cuidado que el pene rose con la piel de la hembra que se usara para estimular la monta.

En la fase de evaluación se tomara en cuenta como factores: el medio ambiente del laboratorio y semen fresco, al no limpiar los mesones y equipos con soluciones

desinfectantes estos pueden influir en la calidad microbiológica del semen. En esta área el nivel de contaminación es más bajo ya que se encuentra en un ambiente cerrado y desinfectado, el personal constantemente debe estar limpiando los mesones y desinfectándose las manos. Roman et al. (2014).

En la fase de criopreservación se tomara como factor: semen congelado observando si esta muestra desarrollo microbiológico, el desarrollo de microorganismos será por el mal almacenamiento y manejo del semen fresco en la fase anterior. Según Carpio (2015) el semen criopreservado no debe mostrar desarrollo microbiano que supere los 500 UFC/ml según el tipo de diluyente usado cualquier alteración será por un mal almacenamiento.

El no llevar a cabo correcciones en estos puntos críticos afectara la calidad microbiológica del semen, pérdidas económicas, descenso en la tasa de preñez, patologías en el trato genitourinario en los toros.

Al implementarse protocolos de higiene como ser los 11 pasos del lavado de manos, indumentaria limpia, desinfección de ambiente, mesones, equipos, soluciones antisépticas para aplicar en el prepucio del toro ayudaran a evitar cualquier tipo de contaminación del semen.

1.4 Identificación del Problema

No se realizan capacitaciones constantes acerca de la colecta semen, manejando protocolos antiguos que si bien dan ciertos parámetros de resultados, se podrían mejorar la cantidad y calidad de semen producido en la estación.

Desconocimiento acerca de las normas de bioseguridad y desinfección de los laboratorios de procesamiento seminal.

No contar con soluciones antisépticas para el uso en toros.

Las rutinas repetitivas del personal no permiten apreciar los factores de contaminación de los ambientes.

La consideración por parte del personal de que no realizar la higiene de manos es un factor de riesgo bajo para la transmisión de infecciones entre sí.

Contaminación por dar múltiples funciones al personal dentro de la estación por parte de las autoridades.

2 OBJETIVO

Evaluar los factores que influyen en la calidad microbiológica del semen de Bovino (*Bos taurus*) elaboradas en la Estación Experimental Choquenaira Gestión 2021”

2.1 Objetivos específicos

1. Evaluar los factores que influyen en los valores de Mesofilos Aerobios Totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus* del semen en el área de colecta.
2. Evaluar los factores que influyen en los valores de Mesofilos Aerobios Totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus* del semen en el área de evaluación morfológica.
3. Evaluar los valores de Mesofilos Aerobios Totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus* del semen bovino criopreservado.

3 HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis nula

La aplicación de clorhexidina y protocolos de higiene a los factores de contaminación no influyen en la calidad microbiológica del semen de toros en la Estación Experimental de Choquenaira

3.2 Hipótesis alterna

La aplicación de clorhexidina y protocolos de higiene a los factores de contaminación influyen en la calidad microbiológica del semen de toros en la Estación Experimental de Choquenaira.

4 REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Generalidades de Bovino

4.1.1 Bovinos sementales

Un semental de buena calidad genética no necesariamente significa que sea fértil es por eso que se recomienda pruebas de fertilidad para no ver un descenso en la producción. Ruiz et al. (2008).

Para Paez y Corredor (2014) que un toro pueda ser considerado semental se llega a realizar una evaluación donde se aprecia la parte física, libido y evaluación de semen. Considerando que todo toro posee la misma genética se busca preservar las características fenotípicas. Para Alvarez y Medellin, (2005) los bovinos tienen características deseables y comunes entre las diferentes razas que alberga aun que un detalle que los destaca es que no posee glándulas suborbitales e inguinales.

4.1.2 Raza Pardo Suizo

Según Ruiz et al. (2008) la investigación hecha en el cual se evaluaron 146 sementales de la raza pardo suizo obteniendo datos: La condición corporal (CC) promedio fue $2.5 + 0,4$. El promedio de la circunferencia escrotal (CE) fue $36.8 + 2.6$ cm. El volumen promedio del eyaculado fue $3.5 + 1.9$ m entrando dentro de los parámetros de aceptación.

Para Valle et al. (2005) De los 120 toros de la raza Pardo Suizo se determinó que existe una diferencia significativa entre la colecta de semen de la época húmeda y la seca teniendo resultados de volumen (ml) $3,64 \pm 1,18$ y $4,78 \pm 2,14$.

4.1.3 Raza Holstein

Según Caiz, (2012) la técnica de inseminación artificial da muy buenos resultados en los bovinos de la raza Holstein, ya que es una raza muy adaptativa a diferentes entornos.

De los 120 toros Holstein sementales en la evaluación seminal se obtuvo los siguientes resultados volumen de semen $4,25 \pm 2,13$, Concentración (E/mm³) $133,57 \pm 89,17$ $136,83 \pm 69,42$ considerados dentro del promedio a pesar que fueron sometidos a factores ambientales aun si se ve un cambio significativo entre época seca y húmeda. Valle et al. (2005) (pág. 5).

4.2 Características Generales del Semen

4.2.1 Eyaculado

Se demostró que el desarrollo reproductivo de un animal mejora con la edad, en los toros de la raza Holstein se aprecia una correlación entre el tamaño de los testículos y la producción de semen, mientras más joven el animal la viabilidad de los espermatozoides es de 80%. Perez et al. (2014). Para Collado (2016) a producción de

semen no solo está correlacionada al tamaño escrotal sino que también está influenciado por el peso que aproximadamente debería ser de 460 kg.

Para Quintero (2021) No solo está influenciado por la correlación testicular sino también por otros factores como ser edad, raza y alimentación para tener un buen volumen de semen.

Espinoza (2012) Indica que los toros (*Bos taurus*) tienen un promedio de eyaculado de 4 a 10 ml de semen con 800 a 2500 millones de espermatozoides por ml. Generalizando a las distintas razas que entran dentro de este género.

4.2.2 Semen Bovino

Para que los espermatozoides o semen se pueda considerar viable y capaz de fecundar un óvulo debe poseer ciertas cualidades como:

Motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactividad, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. (Hidalgo Ordoñez, Tamargo Miguel, & Diez Monforte, 2005, pág. 3).

La evaluación seminal determinara si este es apto o no para la inseminación artificial y/o comercialización. Además, menciona que el volumen de semen es 3 a 6 ml, mientras que el olor debe ser sui generis, esto es, que sea el aroma característico de esta sustancia. En cuanto al pH, debe estar entre 6,5 y 6,9. (Jimenez Escobar, 2019, pág. 1).

4.2.3 Recolección de Semen Bovino

El método más empleado es el uso de la vagina artificial que consiste en un tubo cilíndrico de 30 a 40 cm de largo y un diámetro de 7 a 8 cm. El cual estará revestido por una goma la cual permitirá depositar agua caliente (35 a 38 ° C), obteniendo así la estimulación adecuada para el toro. Roman et al. (2014). Rangel (2007) en un estudio previo determino que es vital tomar en cuenta 2 aspectos antes de la recolecta la higiene de todo el material que se utilizara, el prepucio del toro y el adecuado estímulo del semental.

4.2.4 Área de Trabajo y Recolección del Semen

Para la obtención de la muestra, el lugar debe contar con un brete donde se pueda colocar una hembra, el piso del terreno debe ser firme, debe ser un ambiente espacioso, sin distracciones. Román et al. (2014) Parte de tener un buen ambiente implica que debe estar cerca un laboratorio para procesar la muestra lo más antes posible.

Ibañez et al. (2016) describen que un toro entrenado a un ambiente de trabajo no se tendrá problemas para obtener la muestra seminal ya sea por el uso de la vagina artificial o el electroeyaculador, el ambiente debe estar limpio así como también el material a usar.

Se destaca que para obtener la muestra del toro lo más importante es la destreza del operador, ya que también se encarga de entrenar al toro:

Para proceder a la recolección del eyaculado con el animal y la vagina artificial, previamente preparados, un operador diestro se coloca del lado derecho del toro, al momento del intento de monta desvía el pene tomando prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho impidiendo todo contacto con la monta". (Morillo et al. 2012) (pág. 2).

4.2.5 Semen Congelado

No importa la cantidad de tiempo que una muestra de semen criopreservado se almacene el desarrollo bacteriano es inminente:

En las muestras de semen congelado se aislaron un total de 7 especies bacterianas como ser *Bacillus* no fermentadores (27,08%) *Pseudomona spp.* (18, 75%), *Micrococcus spp.* (16, 66%), *Bacillus spp.* (14, 58%), *Staphilococcus spp* (12, 5%), levadura (8, 33%), *Pasteurella spp.* (2,08%). Morales et al. (2013) pág. 31.

Según la FAO el desarrollo microbiano en el semen criopreservado es inminente y se puede apreciar distintos géneros de bacterias:" En el semen criopreservado, por normas internacionales solo es aceptable 500 UFC/ ml del genero *Staphylococcus spp.* Y

genero *Streptococo spp.* Al sobre pasar esta concentración la calidad del semen no es recomendable para su uso” (1978).

Se debe conservar el semen en tanques de criopreservacion que permita su uso al momento de la inseminación artificial, se recomienda hacer los cambios de temperatura de forma adecuada para evitar la mortalidad masiva de los espermatozoides, también es sugerida realizar una revisión de las pajuelas completamente al azar para determinar viabilidad y/o contaminación de la muestra seminal. Risopatron et al. (1994).

El semen congelado y bien manipulado no sufre alteraciones no importa el tiempo que lleve almacenado todo está en el buen uso de nitrógeno líquido y los diversos diluyentes usados. Ya que estos proporcionaran carbohidratos a los espermatozoides recién descongelados lo cual ayudara a la motilidad y viabilidad. Silveira Prado & Machado Perez (2005).

4.2.6 Evaluación Macroscópica del Semen Bovino

4.2.6.1 Color

El color del semen estará relacionado con la salud y alimentación del individuo en condiciones normales debería apreciarse un color blanco amarillento, siendo un color patológico verde o rosado.

4.2.6.2 Volumen

El promedio de eyaculado debe ser de 4 a 10 ml siendo un toro joven menor a 2 años el promedio será de 5 ml a mayor edad la cantidad de semen ira descendiendo.

4.2.6.3 Olor

El olor tiende a ser sui generis es aceptable un olor dulzón, siendo patológico un olor agrio o acido dando a conocer un problema en las vías espermáticas, glándulas seminales, también se puede atribuir un problema de próstata.

4.2.7 Evaluación Microscópica del Semen Bovino

4.2.7.1 Motilidad

La motilidad en masa se apreciara el momento de observar el tubo de recolección se podrá observar remolinos que indicaran la motilidad que puede ir en una escala de 1 a 5 u otras autorías lo determinan como positivo o negativo la motilidad.

4.2.7.2 Concentración

La concentración promedio es de 0,5 ml de semen diluido/ 5.000.000 espermatozoides si el semen no es diluido el promedio será de 5 ml/ 5.5 (10⁹), a mayor concentración mejor será la viabilidad del semen y se podrá hacer más diluciones.

4.2.7.3 Vigor

Se toma en cuenta la velocidad el movimiento se clasifica de 0 a 5 donde lo mínimo aceptable es de 2,5 y lo mejor es 5 esto permitirá una buena inseminación al momento de su uso.

4.2.8 Diluyente

El diluyente a utilizar en el laboratorio de la Estación Experimental de Choquenaira es STERIDYL, posee ácido cítrico, glicerina, agua purificada, yema de huevo estéril irradiada lo cual beneficiara a los espermatozoides al momento de la criopreservacion y descongelación ya que por los componentes que posee es rico en carbohidratos dando una buena vitalidad a los espermatozoides. También posee antibióticos como ser Gentamicina, Lincomicina, Espectomicina y Tilosina son antibióticos sensibles de amplio espectro con una conjugación bacteriostática y bactericida para evitar el desarrollo de cualquier microorganismo dentro de la pajueta. (STERIDYL, 2015).

4.2.8.1 Lincomicina

Es un antibiótico bacteriostático actúa de forma efectiva ante bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Clostridium tetani*) y *Mycoplasma*. Teniendo propiedades quimioterapéuticas. (GANADEXIL, LINCOMICINA 150, 1992).

4.2.8.2 Gentamicina

Es un antibiótico de amplio espectro actúan sobre bacterias Gram negativas muy buena contra agentes estafilococos pero deficiente ante agentes estreptococos no tiene potencia sobre bacterias anaerobias pero si sobre las aerobias. (UNAM, 2007)

4.2.8.3 Espectinomicina

Es un antibiótico bacteriostático tiene muy buena acción contra *Mycoplasma spp*. Y algunas bacterias Gram negativas como *E.coli*. (GANADEXIL, ESPECTINOMICINA 300 mg, 2016).

4.2.8.4 Tilosina

Es un antibiótico macrolido bacteriostático a dosis bajas pero bactericidas a dosis altas teniendo buena acción contra *Mycoplasma spp.* *Streptococcus spp.* *Staphylococcus spp.* *Pasteurella spp.* (GANADEXIL, TILOSINA 100, 1992).

4.3 Control de ambiente

4.3.1 Microorganismos en la piel

4.3.1.1 Microorganismo de la piel en manos

Castañeda y Hernández (2016) Determinan que la flora residente en las manos está compuesta por bacterias “Gram positivas, Gram negativas y algunos hongos como ser: *Staphylococcus spp.* *Streptococcus spp.* *Bacillus spp.* *Acinetobacter spp.* *Corynebacterium spp.* *Clostridium spp.* Hongos *Malassezia spp.* *Candida spp.* Y que pueden variar entre bacterias $3,9 \times 10^4$ y 4×10^6 UFC/cm”. (Castañeda Narvaez & Hernandez Orozco, 2016, pág. 1).

Señalan que la existencia de microorganismos en la piel es un desarrollo normal que en condiciones normales no afectaran la dermatología del individuo:

“La superficie cutánea constituye un complejo ecosistema que sustenta diferentes nichos ecológicos (...) a partir de una compleja selección natural de microorganismos residentes que evitan la colonización de otros agentes patógenos mientras trabajan en equipo con el sistema inmunitario de la piel”. (Patiño & Morales, 2013, pág. 4).

4.3.2 Descripción bacteriana en manos

4.3.2.1 Genero *Staphylococcus spp*

Este género se encuentra presente en el ambiente así como también en la piel, de los cuales los que presentan un mayor desarrollo son *S. aureus*, *S. epidermis*, *S saprophyticus* son catalasa positiva, cocos Gram positivos, agrupación en racimo, diamino ácido en peptidoglicano. No son exigentes en cuanto a nutrición, son aerobios facultativos, resistente al medio ambiente la temperatura letal para esta bacteria oscila de 58 a 60 ° C por una hora los medios de cultivo más empleados son: Agar sangre, Mac Conckey. (UEF, 2015).

4.3.2.2 Genero *Streptococcus spp*

Presente en el medio ambiente, humanos y animales ubicados en boca, piel, tracto genitourinarios, intestinos los más representativos son: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* son bacterias Gram positivos, catalasa positivo, anaerobias facultativas, inmóviles agrupados en cadenas capaces de tolerar temperaturas - 20 ° C en productos lácteos y - 70 ° C en pescado, pueden ser alfa, beta y gama hemolíticos, presentan un buen desarrollo en medios de cultivo agar sangre (conejo u ovejas). (DataBio, 2018).

4.3.2.3 Genero *Bacillus spp.*

Ubicados en estructuras inanimadas son bacterias Gram positivas, aerobias y/o anaerobias facultativas, bacilos, movilidad por flagelos requieren un pH neutro, Mesofilos requieren una temperatura de 30 a 45 ° C no son exigentes nutricionales pueden desarrollarse en agar nutritivo permitirá el desarrollo de todo tipo de bacterias. Larrea et al. (2015, pág. 2).

4.3.2.4 Genero *Corynebacterium spp.*

Se registran 80 especies pertenecientes a este género, son bacterias Gram positivos, inmóviles, aerobias o anaerobias facultativas, separadas en forma de V, ubicados en piel, mucosa, suelo y agua causante de dermatitis en animales y personas, al no ser exigente nutricional puede desarrollarse en caldo peptona ,medio loefftler, agar Bayer Parcker, agar sangre. (BIO, 2019, pág. 3).

4.3.2.5 Genero *Clostridium spp.*

Se registran 150 especies pertenecientes a este género, son bacterias que se ubican en el medio ambiente más particularmente en el suelo, tracto gastrointestinal de animales y personas, tienen forma bacilo esporulados, anaerobios, Gram positivos puede desarrollarse en medio de cultivo agar sangre, agar nutritivo, Bayer Parker. (Dolores Rojo & Miranda, 2016).

4.3.2.6 Lavado de manos

Silva (2008) El lavado de manos adecuado causa una significativa reducción de contaminantes sea por desinfectante o aséptico utilizado la finalidad es causar una

morbilidad y mortalidad alta para evitar cualquier infección o contaminación de ciertas áreas.

También se menciona que el uso de guantes no protege de la colonización de nuevas bacterias ya que un estudio realizado por Dobbeling demostró que existen las mismas bacterias en las manos y en los guantes de látex es por eso que el lavado constante de mano ayudara a bajar la carga microbiana, la erradicación de estos microorganismos puede ser parcial pero no definitiva ya que es vital un crecimiento normal en el tegumento de cada individuo. (Silva, 2008, pág. 2).

Según SADI (2008) El mejor producto para la asepsia de las manos que tenga una acción bacteriostática y bactericida, con una baja toxicidad para los tejidos vivos.

4.3.3 Descripción bacteriana en la vagina artificial

La vagina artificial consta de un tubo cilíndrico de 30 a 40 cm de largo, con una camisa de goma en su interior capaz de contener agua caliente a una temperatura de 35 a 40 ° C. Roman et al. (2014).

Aguirre menciona (2012) Cualquier material que es usado a la intemperie puede contaminarse con diferentes microorganismos la vagina artificial será uno de ellos es por eso que la colecta de semen debe ser realizada lo más rápido posible para evitar estresar al animal y una posible contaminación.

4.3.4 Descripción bacteriana en la piel del prepucio de toros

Francesca Clarisa et al. (2017) desarrollo un ensayo usando a 12 estudiantes de cirujías implementando 2 técnicas de lavado de manos y piel quirúrgico. Donde la técnica A de una fase, mostro un desarrollo bacteriano de 10000 UFC/ml y la técnica B de tres fases mostro 4400 UFC/ml. En ambas fases se utilizó cepillo y jabón, superando por mucho la norma establecida por la OPS que es <100 UFC/ml, usando este valor de referencia para el lavado prepucial.

Silveira y Alba (2006) mencionan en condiciones normales la presencia de la microbiota en la piel de los animales está representada por bacterias, parásitos y hongos teniendo un equilibrio, por razones o factores de estrés se altera esta homeostasis causando un desequilibrio produciendo problemas dérmicos. Para Virginia (2004) Cerca de cualquier

orificio natural como ser la vulva, ano y prepucio existirá la secreción de mucosa que se encarga de proteger estos orificios naturales lo cual puede traer el desarrollo más elevado de cierto microorganismo.

Se menciona que no importa el tipo de desinfectante que se utilice se apreciara el desarrollo de microorganismos:

“Después del uso de algunas soluciones desinfectantes aplicadas sobre el pene, prepucio y piel de los toros con el objeto de disminuir la cantidad de microorganismos presentes en el semen y refuerza la sospecha de que algunas de estas bacterias pueden ser residentes permanentes del tracto reproductivo interno de los toros”. (Prado & Machado, 2005).

Según Vallejos (2014) los factores intrínsecos del animal como la flora microbiana propia del glande, uretra y conductos deferentes puede afectar la calidad espermática:” El aparato urinario del macho por su humedad y mucosa puede albergar varios microorganismos que pueden o no ser patógenos.”

4.3.4.1 Desarrollo microbiológico en el prepucio de toro

Puerta et al. (2014) describen que las bacterias presentes en las fases reproductivas influyen tanto en la fisiología del aparato reproductor así como también la sanidad seminal, entre las bacterias encontradas están: *Mycoplasma spp*, *Escherichia coli spp*, *Staphylococcus spp*. coagulasa negativos.

4.3.4.2 Genero *Escherichia coli*

Alfaro et al. (2019) determinaron en una explotación de verracos en Venezuela demostró la presencia de *E. coli* en el prepucio de los verracos en un 100% de los individuos y como esta es una condición de riesgo para la reproducción causando muerte espermática, mortandad en camadas.

4.3.4.3 Genero *Pseudomona spp.*

Para Bush y Vásquez (2020) Este género se alberga de presencia en zonas húmedas muy común en región ano genital, (axilas de algunas especies de animales domésticos) se acuerdo a la cantidad de estos pueden llegar a causar irritación e inflamación es más

común en el prepucio causando balanitis asociados a otras bacterias como ser *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*.

4.3.5 Descripción bacteriana en el laboratorio

Un estudio realizado en un laboratorio de enseñanza se vio el desarrollo bacteriano en los distintos equipos y superficies del laboratorio como ser:

“*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Salmonella spp*, *klebsiella spp*, *Pseudomona spp*. de las 72 muestras procesadas se vio un crecimiento del 66% de distintas bacterias”. (MSc. Gonzales Herrera, Lic. Lozada Mendez , & MSc. Santiago Roque, 2014, pág. 1).

4.3.5.1 Calidad ambiental de laboratorio

Todos los laboratorios deben tener acabo señalizaciones de todo tipo como ser riesgo, indumentaria, peligro, circulación para evitar problemas y preservar la bioseguridad, según el tipo de laboratorio que sea debe tener ciertos requerimientos para procesar muestras, dentro de un laboratorio sencillo deberá tener una adecuada ventilación sistema de deshechos (desagüe) con los filtros necesarios para evitar una contaminación al medio ambiente, las bolsas de eliminación de residuos deben ser de color rojo y/o negro, el recojo de desechos debe estar a cargo de una entidad certificada para el recojo de desechos. (Araya, 2003).

Un estudio hecho por Valencia (2017) demuestra que gran parte del personal no conocen el proceso de desinfección en distintos laboratorios ya que “el 77% desconoce del manual de limpieza y el 66% no sabe que producto es un desinfectante”.

La OMS (2013) determinó que la calidad de estructura y materiales en un laboratorio de 2do. Nivel en adelante no debe superar las 10 UFC/ml. Describiendo una buena señalización y ventilación dentro del laboratorio.

La contaminación ambiental de un laboratorio estará sujeta a las buenas prácticas de limpieza y organización ya que se encontró:

“El 43% de incumplimiento, considerado como “Por debajo del promedio”; obteniéndose en esta instancia la CMA distribuida entre hongos a 25 UFC/placa

(50%), bacterias 16 UFC/placa (33%), levaduras a 8 UFC/placa (17%), superando las 10 UFC/ml que establece la OMS". (Rosales Lopez, 2018, pág. 5)

Patiño señala que la microbiota en la piel es la armonía entre bacterias, hongos y parásitos, llevando acabo una simbiosis:

"En condiciones normales la cantidad bacterias residentes de varía entre 100 a 300 UFC/cm² aumentando 3 a 5 veces más por la humedad y exposición al medio ambiente". (Patiño & Morales, 2013, pág. 3)

Según Hernández et al. (2017) los materiales que se usan en la recolecta de semen son de vital importancia ya que son fuentes de contaminación:

"La contaminación microbiana del semen es un parámetro de calidad que se utiliza para asegurar el éxito de la inseminación artificial. En condiciones normales, el semen no tiene microorganismos pero se contamina en los procesos de recogida y estos microorganismos pueden ser responsables de alteraciones en los espermatozoides". (Hernandez, Bueso, & Fernandez, 2017, pág. 3).

La aplicación de normas de asepsia es fundamental: "Una correcta descontaminación de las manos (higiene epidérmica de las manos) es el método más simple y efectivo para reducir las infecciones cruzadas o IAAS." (Cortizas Rey & Rumbo Prieto, 2019, pág. 9)

4.3.5.2 Genero *Staphylococcus spp*

Son células redondas Gram positivas en agrupación de racimos irregulares, su crecimiento se da en casi cualquier medio se caracterizan por fermentar los carbohidratos algunos de estos tipos son parte de la micro biota de la piel y mucosas en animales, por otra parte otras pueden causar lesiones, irritaciones en el peor de los casos una septicemia dependiendo la cantidad y tipo que sea. Este género llega a tener 40 especies donde las más comunes serán *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, la especies patógenas llegan a formar hemolisis y coagular plasma generando varias enzimas toxica. (Silverchari, 2005).

El ecosistema natural de este género es la piel y mucosa, también se la puede hallar en el tracto intestinal en ciertas especies, cabe señalar que la propagación de ciertas especies es muy limitada entre diversos animales. (Machota & Piriz, 2003)

4.3.5.3 Género *Staphylococcus aureus*

Esta especie es la más común en la flora microbiana de humanos y ciertos animales donde lo presenta un 25 a 50 % de la población sana, la forma más común de adquirirla es por el medio ambiente, al estar en gran parte de las personas y animales es causante de dermatitis ya que es resistente a varios antimicrobianos y fármacos.

4.3.5.4 Género *Streptococcus spp*

Son bacterias Gram positivas anaerobias facultativas inmóviles de forma esféricas la forma de agrupación es en cadenas de dos o más bacterias, según la capacidad hemolítica existen tres tipos: Alfa (α), llegan a formar una hemólisis incompleta; Beta (β), que producen una lisis o ruptura total de los glóbulos rojos; Gamma (γ) no llegan a realizar una hemólisis. (DataBio, 2018).

Son bacterias de catalasa positiva, obtienen energía de la oxidación de compuestos orgánicos (químico-orgánicos), no forma gas para su crecimiento requieren medios enriquecidos con sangre e microaerofilia una atmósfera con 5% de CO₂, requiriendo temperaturas de hasta 40 °C para su desarrollo. (Machota & Piriz, 2003)

4.3.5.5 Género *Escherichia coli*

Este género se caracteriza por ser bacilos Gram negativos, no utilizan citrato como fuente de energía, fermentan glucosa y lactosa con producción de gas. Es una bacteria mesofila se desarrolla muy bien a temperaturas de 35 a 43 °C, anaerobias facultativas, el movimiento es gracias a los flagelos se lo encuentra en casi todo el medio ambiente, también el tracto intestinal mejor posicionado en la posición del yeyuno e intestino grueso. (Machota & Piriz, 2003)

4.3.5.6 Género *Pseudomona spp.*

Son bacilos aerobios Gram negativos de catalasa positiva, no fermentadores de glucosa con flagelos que le permiten desplazarse, no forma esporas causante de infecciones en animales y personas entre las más patógenas tenemos *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*

en medio de cultivo se puede apreciar un color verdoso por la característica de oxidación. (Medicus, 2019).

La *Pseudomona aeruginosa*, puede asociarse a otras bacterias causante de infecciones en la vulva, prepucio, el problema más recurrente es en los bovinos de producción lechera causando mastitis y enteritis. (Machota & Piriz, 2003).

4.3.6 Antisépticos y desinfectantes

4.3.6.1 Clorhexidina

El nombre comercial a usar es (Tritohehidin plus), es una solución antiséptica, antialérgica y antiinflamatoria de uso local, utilizada para el prevención y tratamiento de contaminación bacteriana que son agentes Gram positivos, Gramnegativos y agentes fúngicos, su composición de acetato de triamcinolona 0,10 g. Permite actuar como antialérgico; digluconato de clorhexidina al 20 % inhibe el desarrollo de microorganismos. (FarcoVet, 2015)

Para Torres et al. (2009) la composición de la clorhexidina permite adherirse a la membrana bacteriana inhibiendo su desarrollo esto sucede por la baja concentración del antiséptico pero al aumentar la concentración este se vuelve un bactericida que puede llegar a durar de 8 a 12 horas. Se une a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático), en concentraciones produce un efecto bactericida.

Un estudio realizado por Bimonte en el (2014) con la aplicación de clorhexidina en una solución alcohólica al 2% en la aplicación de manos del cirujano como en el paciente demostró el descenso de UFC significativo ($p < 0,05$) tras la aplicación del antiséptico descendiendo de 5,875 a 4673. (Bimonte, 2014).

4.3.6.2 Hipoclorito de sodio

Un estudio realizado por Echeverri et al. (2007) en la aplicación de distintos desinfectantes entre ellos hipoclorito de sodio al 0,8% en la inhibición de bacterias como ser: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillusniger*, *Bacillus subtilis*, esta aplicación tendrá 3 repeticiones donde en diferentes tiempos se apreciara la acción

biosida de los mismos y como tiene una efectividad del 99,9% en cuanto a mortandad bacteriana. Echeverri et al. (2007).

Gonzales et al. (2019) Realizaron un protocolo de desinfección de mesas en laboratorios usando hipoclorito de sodio al 1% determino la efectividad bactericida y bacteriostática de 98,1% proponiendo como uso estándar en la desinfección de mesas y ambientes antes y después de usar un laboratorio de nivel 1 y 2.

Butler et al. (2011) En el hospital Escuela de la FOUNLP realizo la desinfección de pisos, paredes y mesones con el uso de hipoclorito de sodio al 1% realizando muestreo antes y después de la desinfección, con hisopos estériles se tomó muestras y determinar la UFC, realizando un análisis estadístico con el modelo ANOVA demostrando una efectividad de 98,5% con la eliminación de bacterias y hongos.

5 LOCALIZACIÓN

Figura 1

Ubicación de la Estación Experimental de Choquenaira



Nota. Google Maps, 2022.

El siguiente trabajo fue realizado en la Estación Experimental de Choquenaira dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor De San Andrés, dicha instalación se encuentra ubicada en el departamento de La Paz, Provincia Ingavi al sur de la ciudad de Viacha, región del altiplano central.

La ubicación de las instalaciones están a 32 km al suroeste de la ciudad de La Paz con las siguientes directrices 16°42'5" de latitud sur y 68°15'15" de longitud oeste y con una altitud de 3870 m.s.n.m.

5.1 Descripción del lugar

5.1.1 Clima

La estación como tal presenta un clima frío y húmedo. Según Quispe (2018) menciona que la Estación Experimental de Choquenaira tiene una precipitación promedio anual de 580 mm, valor que se encuentra en el rango del estudio para la Estación Meteorológica de Viacha. Este valor afirma el comportamiento muy similar de la precipitación entre ambas estaciones. Con los datos completos de la Estación Meteorológica de Viacha, se obtuvieron los siguientes estadígrafos de 42 años de registro topografía

Un estudio realizado por RMLP (2012) describe que Viacha y sus alrededores presenta una topografía con relieves ondulados y serranías donde según el tipo de suelo se puede apreciar la siembra de ciertas plantas para el beneficio de las personas y comercialización.

5.1.2 Producción pecuaria

En la Estación Experimental de Choquenaira se aprecia la producción de ovinos (*Ovis orientalis aries*) de la raza Corriedale, bovinos (*Bos taurus taurus*) de la raza Holstein que posee un hato lechero para la comercialización de leche y producción de queso, los sementales usados para la reproducción son Holstein, Pardo Suizo y también posee la producción de llamas (*Lama glama*).

5.1.3 Producción agraria

La producción de la estación tiene como fin la comercialización, investigación de diferentes especies cultivables que ayudan al sustento de la estación y posterior comercialización en la facultad de agronomía.

Las especies cultivadas que se encuentran son cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium spp*), Papa (*Solanum spp*).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 *Materiales de laboratorio*

- Autoclave
- Microscopio
- Estufa de incubación
- Baño maria
- Refrigerador
- Mechero bulzen
- Hornilla eléctrica
- Termo criogénico
- Tubos de ensayo
- Micropipetas
- Estufa de secado
- Frascos de 500 y 200 ml.
- Cajas Petri
- Gradillas
- Asa de siembra
- Espátula Drigalski
- tips
- Porta y cubre objetos

6.1.2 *Material de colecta*

- Vagina artificial
- Tubos colectores
- Secadores
- Brete de sujeción
- Jeringa de 3 ml
- Transportadora

6.2 METODOLOGÍA

Se realizó una investigación cuantitativa con un diseño experimental, transversal (seis variables y tres indicadores de cada uno), donde se hizo un diagnóstico del trabajo en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental de Choquenaira, acerca de los factores que influyen en la calidad microbiológica del semen en las áreas de colecta, evaluación del semen y semen criopreservado de bovino.

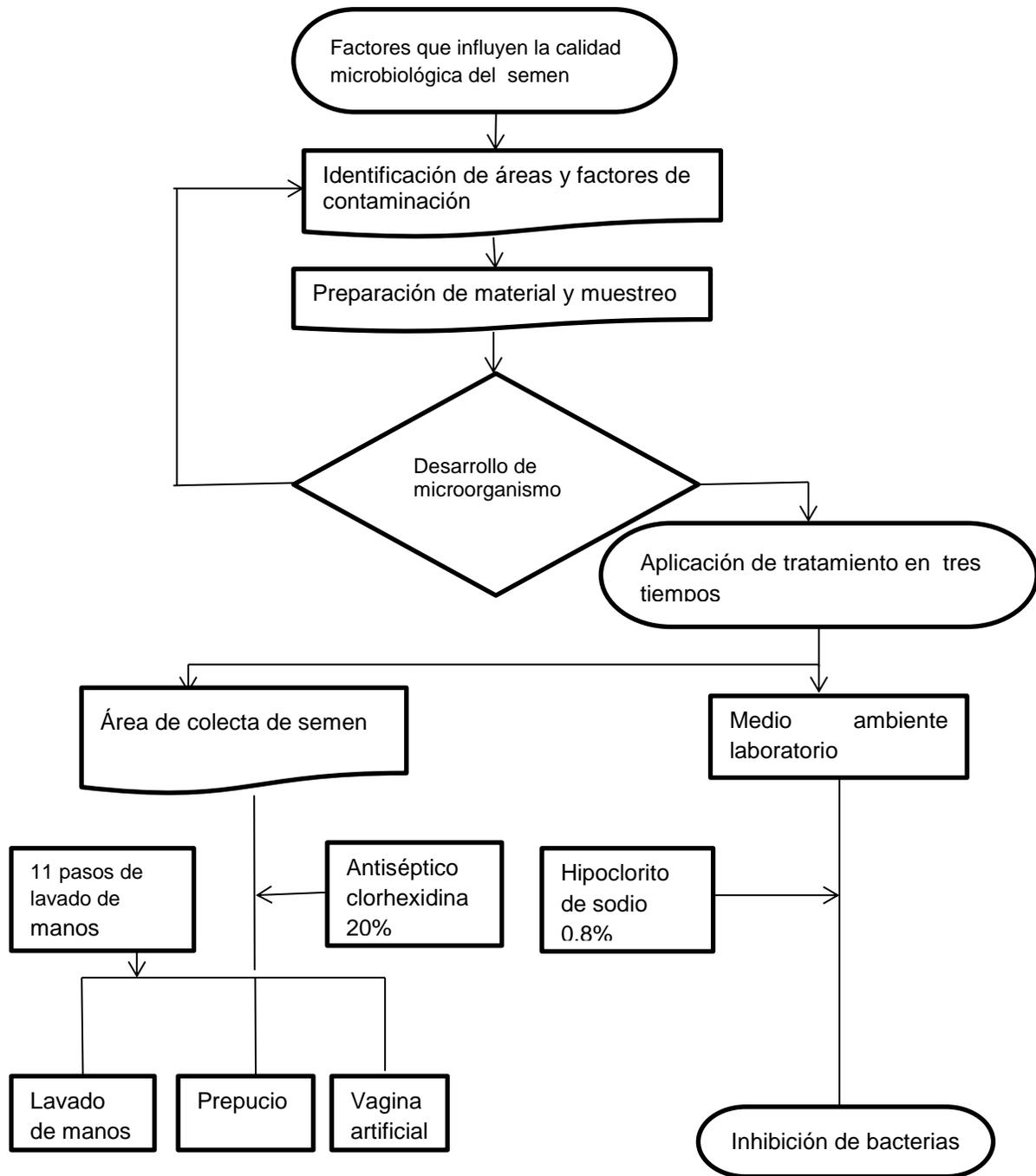
Se evaluaron los puntos críticos que afectaran la calidad microbiológica del semen bovino (*Bos taurus*), después del periodo de diagnóstico y determinar las factores que afectan la microbiota del semen, se aplicaron en tres tiempos las evaluaciones del tratamiento, con cuatro repeticiones de cada variable para corregir las variantes analizadas.

En la fase de evaluación se verifico si el tratamiento y protocolos de higiene aplicados corrigieron las observaciones hechas.

El estudio tendrá una duración de seis meses realizando un muestreo cada dos meses debido al cronograma de colecta de semen, que consiste en la obtención de muestras con las variantes que serán semen fresco, semen congelado, vagina artificial, lavado de manos, prepucio y medio ambiente del laboratorio, todas las muestras se las obtuvo de la Estación Experimental de Choquenaira siendo procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Agronomía.

Figura 2

Flujograma de Colecta de Semen Bovino.



Nota. Descripción del Modo de Obtención de Muestras de Cada Área en la Colecta de Semen.

Será un estudio experimental donde se hará un diagnóstico del trabajo en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental de Choquenaira, realizándolo cada dos meses.

6.2.1 Factores de estudio y valores de respuesta

Figura 3

Factores de Estudio y Variables de Respuesta por Área Evaluada

FACTORES DE ESTUDIO	VARIABLES DE RESPUESTA	
Area de Colecta		
Lavado de Manos	Antes del Tratamiento	Despues del Tratamiento
Vagina Artificial	Antes del Tratamiento	Despues del Tratamiento
Prepucio	Antes del Tratamiento	Despues del Tratamiento
Area de Evaluacion		
Medio Ambiente de Laboratorio	Antes del Tratamiento	Despues del Tratamiento
Semen Fresco	Sin Tratamiento	
Area de Criopreservacion		
Semen Congelado	Sin Tratamiento	

Nota. Factores Identificados por Área con la Evaluación del Antes y Después del Tratamiento.

A cada factor identificado se hará un muestreo del antes (evaluación diagnóstica) determinando la cantidad de UFC/ml, aplicando un tratamiento correctivo para reducir la carga microbiológica realizando en tres tiempos usando sustancias antisépticas, desinfectantes y aplicando protocolos de higiene.

6.2.2 Primera fase diagnóstico

- Para dar inicio al trabajo de investigación se coordinó con los responsables del laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental de Choquenaira.
- Observación del trabajo rutinario de recolecta de semen y conservación del material criopreservado.
- Muestreo de los factores que influyen en la calidad del semen.
- Con material estéril se realizó el muestreo de los puntos identificados con factores que influyen en la calidad de semen.
- Transporte de las muestras identificadas en una conservadora a 4 °C al laboratorio de microbiología del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Desinfección del laboratorio de microbiología antes de realizar el sembrado de las muestras en los medios de cultivo

6.2.2.1 Preparación de material.

Un día antes de la recolección de muestra para la fase de diagnóstico y aplicación de tratamiento se llevara a cabo la preparación de los materiales a usar asegurándose de que estén limpios y estériles.

Todo material será lavado con detergente e hipoclorito de sodio al 0,8 % una vez limpios se colocara dentro de la estufa de secado. Se usó la cajas Petri, pipetas, tips, asas de siembra, espátula Debridaski frascos de 250 y 500 ml, guantes de látex, compresas de gazas, bolsas, hisopos, tubos de ensayo serán en vueltas en papel madera colocados dentro de bolsas nuevas para luego esterilizarlo en el autoclave usando agua destilada.

6.2.3 Preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se preparan de acuerdo a la cantidad necesaria para ello se utilizara agua destilada, después se esterilizara (autoclave) para luego distribuir en las cajas Petri según la norma ISO 11133:2014.

6.2.4 Toma de muestra

Se realizara enjuagues utilizando caldo peptona y bolsas estériles en los siguientes factores: lavado de manos, prepucio, vagina artificial; en los otros factores como ser semen fresco, semen congelado se sembraran en los medios de cultivo diluyendo en (-

1) en 10 y (-2) en 100; el medio ambiente del laboratorio se llevaran medios de cultivo para determinar la calidad ambiental del lugar.

6.2.5 *Procesado de muestras*

Todas las muestras serán procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Agronomía, las muestras obtenidas serán colocadas en los medios de cultivos ya preparados con diluciones (-1) y (-2), el recuento de colonias se hará 48 horas después.

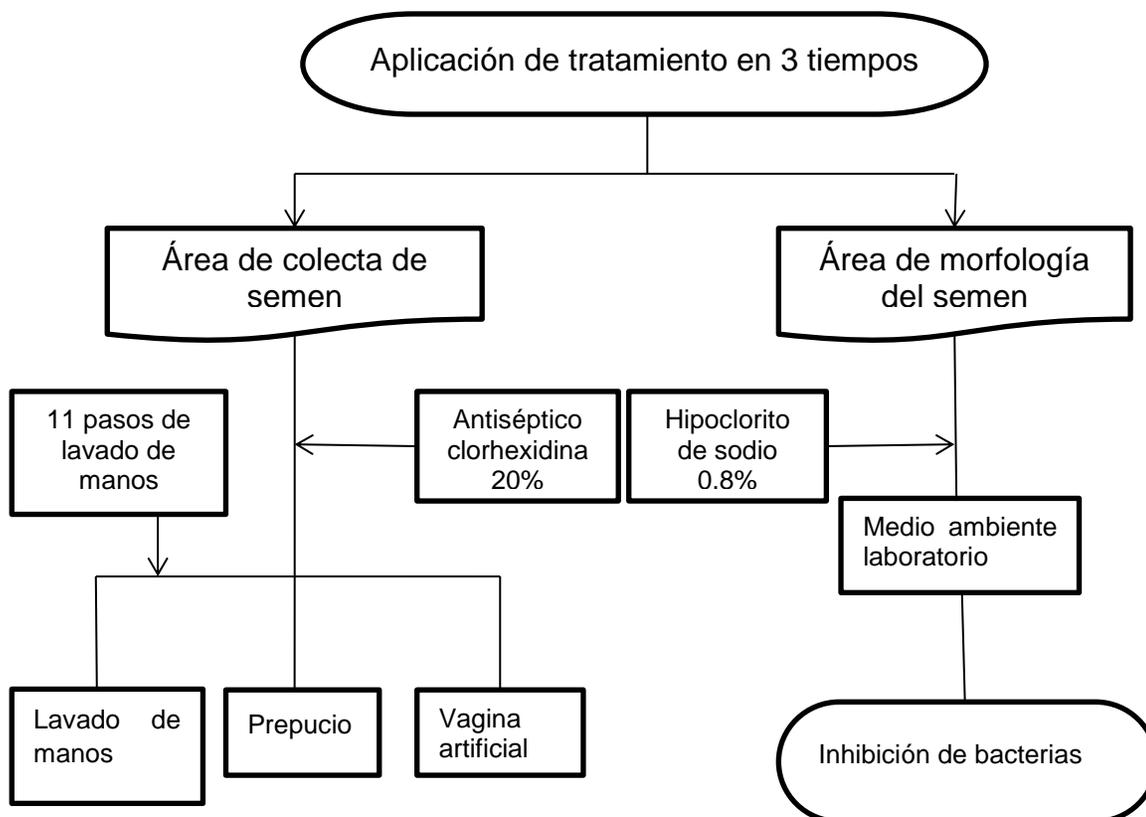
6.2.6 *Diagnostico*

Después de las 48 horas de incubación, se realizara el conteo de colonias desarrolladas en los medios de cultivo..

6.2.7 *Segunda fase aplicación de tratamiento*

Figura 4

Aplicación de Tratamiento



Nota. Describe el Tratamiento que se Aplicó a Cada Factor Identificado

La clorhexidina es un antiséptico para la precaución y/o tratamiento de contaminación, con una acción bactericida, fungicida, virucida, (según norma ISO 9001 e ISO 14160 UNE-EN 1499:2013) Gram positivas, Gram negativas y agentes fúngicos por su concentración de 20% de dicoglunato de clorhexidina causa la destrucción de la pared celular de las bacterias, provocando la precipitación de proteínas y ácidos nucleicos. Siendo de una rápida acción germicida teniendo un efecto de 6 a 48 horas, también posee triamcinolona que evita cualquier reacción alérgica o inflamatoria, la aplicación de este producto se hará en la superficie de la piel más específicamente en el prepucio del toro, manos del operario y vagina artificial esparciendo el antiséptico con un atomizador generosamente en toda el área que se desea limpiar, quitando cualquier excedente con gazas estériles; realizando un descenso del desarrollo microbiológico de estas zonas.

También se implementó la norma de los 11 pasos de lavado de manos por parte de la OMS al factor de estudio lavado de manos.

El hipoclorito de sodio Según norma ISO 9001 e ISO 14160 UNE-EN 1499:2013 Este compuesto tiene muchos usos según el tipo de concentración que se utilice para realizar la limpieza de superficies inanimadas, para este trabajo se usó una concentración de 0.8% no siendo toxica y degenerativa al contacto con la piel aun así no se recomienda al contacto constante con la piel, pero si causando una oxidación en cualquier superficie aplicada destruyendo la pared celular de las bacterias este producto es letal para varios microorganismo virus bacterias vegetativas pero no así con agentes fúngicos o protozoarios, su uso es sencillo y es económico encontrado fácilmente en tiendas de mercado. Se hizo la aplicación de este desinfectante en pisos y mesas del laboratorio. Para luego realizar la limpieza con campos limpios.

En ambas fases se repetirán los mismos procedimientos para la fase de diagnóstico y fase de tratamiento. La aplicación del tratamiento consistirá en realizar la asepsia y desinfección del personal, toro, material y ambiente en el cual se trabajó.

6.2.8 Área de colecta de semen bovino

6.2.8.1 Enjuague de prepucio

Para el muestreo del prepucio se realizó un enjuague con caldo peptona antes del lavado correspondiente del prepucio para determinar la carga bacteriana que presenta

dicha región, posterior al lavado con agua potable fría que acostumbra a realizar el personal encargado.

Posterior a esto se implementó el tratamiento que consiste en limpiar la región del prepucio usando clorhexidina al 20% ya que es un antiséptico antialérgico, con este producto se redujo la carga microbiológica, posterior a esto se realizara otro enjuague con caldo peptona. Para tener datos confiables, se llevara a cabo este procedimiento cada vez que se realice la colecta de semen.

6.2.8.2 Enjuague de manos

Para esta parte se realizó un enjuague de las manos del operario con caldo peptona dentro de una bolsa estéril para evitar contaminación y perdida de la muestra, este enjuague se lo realizo antes del lavado respectivo de las manos, para así determinar la carga microbiana de las manos del operario, posterior al lavado de manos correspondiente aplicando los 11 pasos del lavado de manos se aplicó en las manos del operario el tratamiento que es clorhexidina al 20%, después del secado de manos se realizara otro enjuague con caldo peptona este enjuague se lo realizo dentro de una bolsa estéril para evitar cualquier tipo de contaminación. Para tener datos confiables, este tratamiento se repetirá cada vez que se realice la colecta de semen.

6.2.8.3 Enjuague de vagina artificial

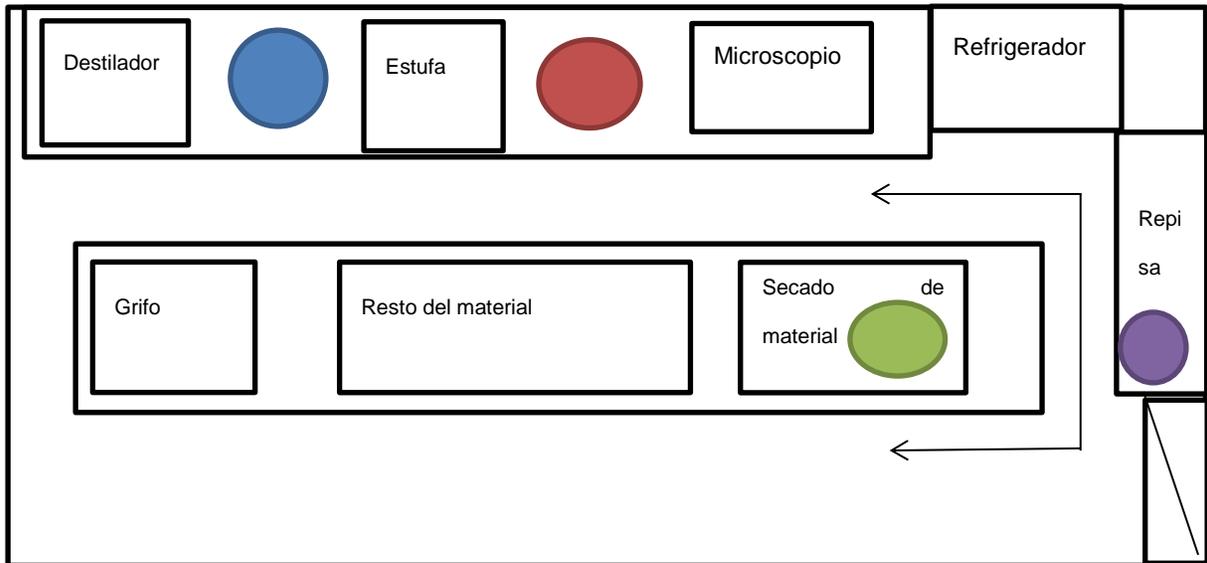
Se realizó el muestreo del enjuague de la vagina artificial antes del lavado y desinfectado correspondiente, se derramara el caldo peptona por la camisa de goma que recubre la parte interna del tubo cilíndrico la misma que está en contacto con el pene al momento de la recolección seminal, del otro lado del tubo cilíndrico se esperara con una bolsa estéril para recepcionar el caldo peptona que será almacenado para ser evaluado.

Posterior al muestreo se desinfectara el material como suele hacerlo el personal, una vez seco se aplicara el tratamiento que es desinfectar la vagina artificial con clorhexidina al 20%. Nuevamente se hará un enjuague repitiendo la metodología usando caldo peptona, se recepciono en una bolsa estéril para ser evaluada.

6.2.9 Área evaluación morfológica del semen

Figura 5

Croquis del Laboratorio de Biotecnología en la Estación Experimental de Choquenaira



Nota. Movimiento Frecuente Dentro el Laboratorio de Biotecnología

● Área 1 ● Área 2 ● Área 3 ● Área 4

6.2.9.1 Medio ambiente

Al realizar el muestreo del Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental de Choquenaira. Se marcó los puntos donde el personal realiza más actividades, se determinó cuatro puntos críticos dentro del laboratorio que son el área de:

- 1-. Repisa de material.
- 2-. Microscopios.
- 3-. Autoclave.
- 4-. Material de secado.

Se llevó a cabo la limpieza y desinfección del laboratorio usando detergente e hipoclorito de sodio al 0,8% (lavandina). Después de la limpieza se colocó medio de cultivo de los lugares señalados (Medio PCA / Medio MacConkey) por 15 minutos.

6.2.9.2 Semen fresco

La recolección de la muestra se la realizo después de realizar la limpieza del semental tomando en cuenta el lavado prepucio, lavado de manos y desinfección de la vagina artificial recordando que no se aplicó un tratamiento de forma directa al semen fresco. Para estimular al toro se colocara una hembra en celo, al momento de la monta el operador hará un movimiento rápido para introducir el pene en la vagina artificial.

El promedio de eyaculación de los sementales registrado es de 5 ml, para el análisis utilizamos 0,5 ml. De semen en un frasco estéril para transportar al laboratorio.

6.2.10 Área de criopreservacion de semen

6.2.10.1 Semen congelado

Cada pajuela contiene 0,5 ml de semen diluido para ser usado. Cabe mencionar que cada una de estas pajuelas cumple los requisitos para su comercialización dentro del mercado.

Se llevara al laboratorio las pajuelas congeladas para realizar los exámenes correspondientes.

6.2.11 Sembrado de muestra

Para realizar el sembrado se desinfecto la mesa con alcohol al 70%, también se esterilizo el medio ambiente con el uso de mechero Bunsen, ayudando a evitar la contaminación de los medios de cultivo.

En el medio de cultivo Bayer Parker con telurito de potasio la siembra fue por extensión con el uso de la asa debridaski. En este medio se hizo una dilución (-1) y (-2).

En los medios de cultivo PCA y RBN se colocaron 100 ul. De la muestra diluida junto con los medios frescos (liquido) ya auto clavados el sembrado fue por inundación, se mezclaran la muestra y el medio moviendo las cajas Petri en forma de ocho evitando que la muestra salpique a las paredes de la caja Petri. En estos medios se usó la dilucion (-1) y (-2).

En el medio PCA y MacConkey que se utilizó en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en Choquenaira se colocara directamente a la estufa una vez llegado al laboratorio de la Facultad de Agronomía

De acuerdo al crecimiento que se pueda apreciar en cada medio de cultivo para identificar la colonia se hará un repique realizando un sembrado por agotamiento en otro medio en este caso se utilizó medio MacConkey.

Después de realizar los sembrados correspondientes se guardaran las cajas petri en la estufa de incubación a una temperatura de 35.5 °C los medios son enriquecidos según el requerimiento de cada bacteria y la temperatura proporcionada por 48 horas, para luego realizar el conteo de UFC

6.2.12 Conteo de colonias

Pasadas las 48 horas se sacaron las cajas Petri de la estufa de incubación, el conteo se hará con el uso de una lupa con un fondo negro para contabilizar todas las colonias según el medio de cultivo, se apreciará forma, color y cambios de los medios.

6.2.13 Modelo estadístico

Para el estudio experimental se utilizó el análisis de varianza y prueba de Duncan en cual se tabularan los datos de cada factor analizado como ser prepucio, lavado de manos, vagina artificial, medio ambiente de laboratorio, semen fresco y semen congelado utilizando las medias de cada uno, con una significancia de 0,05%.

7 RESULTADOS y DISCUSIONES

7.1 Área de colecta de semen

7.1.1 Prepucio

Tabla 1

Mesofilos Aerobios Totales en el Prepucio del Semental de Toro

Indicador bacteriológico	Resultado UFC/ml				Valores de referencia UFC/ml Enjuague
	ED	1T	2T	3T	
Mesofilos Aerobios Totales	1,38x10 ⁵	4,1x10 ⁴	1,24x10 ³	<10	<100 UFC/ml

Nota. (ED) evaluación diagnóstico.

(T) tiempo

Referencia obtenida Taddei Moran et al. (2019) OPS lavado de manos y piel quirúrgico.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Mesofilos Aerobios Totales en el Prepuccio del Semental de Toro, es superior al valor de referencia (<100 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 1 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primer y segundo tiempo de evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la tercer tiempo evaluado se realizó el seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo de higiene obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 2

Análisis de Varianza Prepuccio Mesofilos Aerobios Totales.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	39	3	13,26	12,9	0,005459	3,49
Dentro de los grupos	12	12	10,28			
Total	52	15				

Nota. Dato obtenido de Microsoft Excel análisis de varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,005459) por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Al ser un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 3*Prueba de Duncan Variable Prepucio Mesofilos Aerobios Totales*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	138000,00	4	17046,51	A
2	41000,00	4	17046,51	B
3	1240,00	4	17046,51	B
4	10,00	4	17046,51	C

Nota. (A) Evaluación Diagnostico.

(B) 1er. Y 2do. Tiempo

(C) 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 3 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T) así también entre A y C (3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C

Al realizar el muestreo de diagnóstico se determinó la media de Mesofilos aerobios totales identificando que supera el dato de referencia $1,38 \times 10^5$ UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en los 3 tiempos de evaluación realizados se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se enseñó protocolos de asepsia en el lavado prepucial, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia $4,1 \times 10^4$ UFC/ml. Para la segunda evaluación se dio un seguimiento del lavado prepucial implementado el secado de los residuos con gazas estériles, mostrando un descenso en la carga bacteriana que aún no era aceptado por el dato de referencia $1,24 \times 10^3$ UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó el corte de pelo del prepucio con excedentes de contaminación mostrando un descenso en la carga bacteriana < 10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OPS < 100 UFC/ml.

Tabla 4*Coliformes Totales en el Prepuccio del Semental de Toro.*

Indicador bacteriológico	Resultado UFC/ml				Valores de referencia UFC/ml Enjuague
	ED	1T	2T	3T	
Coliformes Totales	1,195x10 ³	5,3x10 ²	1,6x10 ²	<10	<100 UFC/ ml

Nota. (ED) Evaluación diagnóstico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida Taddei Moran et al. (2019) OPS lavado de manos y piel quirúrgico.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Coliformes Totales en el prepuccio del semental de toro, es superior al valor de referencia (<100 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 4 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primera y segunda evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la tercera evaluación se realiza al seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 5*Análisis de Varianza en el Prepuccio Coliformes Totales.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	33	3	11	26,9	0,00511	3,4902
Dentro de los grupos	49	12	41			
Total	82	15				

Nota. Dato obtenido de Microsoft Excel análisis de varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,00511), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 6

Prueba de Duncan Variable Prepucio Coliformes Totales.

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	1195,00	4	101,83	A
2	530,00	4	101,83	B
3	160,00	4	101,83	C
4	10,00	4	101,83	C

Nota. (A) Evaluación Diagnostico.

(B) 1er. Y 2do. Tiempo

(C) 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 6 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T) así también entre A y C (2T-3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C.

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de Coliformes Totales identificando que supera el dato de referencia $2,15 \times 10^3$ UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en los 3 tiempos de evaluación realizados se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se enseñó protocolos de asepsia en el lavado prepucial, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia $1,6 \times 10^2$ UFC/ml. Para la segunda evaluación se dio un seguimiento del lavado prepucial implementado el secado de los residuos con gazas estériles, mostrando un descenso en la carga bacteriana que aún no era aceptado por el dato de referencia $1,25 \times 10^2$ UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó el corte de pelo del prepucio con excedentes de contaminación mostrando un descenso en la carga bacteriana < 10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OPS < 100 UFC/ml.

Tabla 7*Staphylococcus aureus en el Prepucio del Semental de Toro*

Indicador bacteriológico	Resultado UFC/ml				Valores de referencia UFC/ml Enjuague
	ED	1T	2T	3T	
<i>Staphylococcus aureus.</i>	2,15x10 ³	1,6x10 ²	1,25x10 ²	<10	<100 UFC/ ml

Nota. (ED) Evaluación diagnóstico.

(T) Tiempo.

Referencia obtenida Taddei Moran et al. (2019) OPS lavado de manos y piel quirúrgico.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, *Staphylococcus aureus* en el Prepucio del Semental de Toro, es superior al valor de referencia (<100 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 7 se aplica el protocolo correspondiente, se evalúa cada dos meses, observando que en la primera y segunda evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la tercera evaluación se realiza al seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 8*Análisis de Varianza Prepucio Staphylococcus aureus*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	97	3	32	19.318	0.00516	3,49
Dentro de los grupos	3	12	16,75			
Total	100	15				

Nota. Dato obtenido de Microsoft Excel análisis de varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,00516), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 9*Prueba de Duncan Variable Prepucio Staphylococcus aureus.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	2150,00	4	17046,51	A
2	160,00	4	17046,51	B
3	125,00	4	17046,51	B
4	10,00	4	17046,51	C

Nota. (A) Evaluación diagnóstico

(B) 1er. Y 2do. Tiempo

(C) 3er. tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 9 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación diagnóstico) y B (1T – 2T) así también entre A y C (3T) debido a un seguimiento en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de *Staphylococcus aureus* identificando que supera el dato de referencia $1,195 \times 10^3$ UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en los 3 evaluaciones realizados se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se enseñó protocolos de asepsia en el lavado prepucial, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia $5,3 \times 10^2$ UFC/ml. Para la segunda evaluación se dio un seguimiento del lavado prepucial implementado el secado de los residuos con gazas estériles, mostrando un descenso en la carga bacteriana que aún no era aceptado por el dato de referencia $1,6 \times 10^2$ UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó el corte de pelo del prepucio con excedentes de contaminación mostrando un descenso en la carga bacteriana < 10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OPS < 100 UFC/ml.

En los resultados del trabajo se pudo apreciar que es posible reducir la carga microbiológica en la colecta de semen aplicando protocolos de asepsia y desinfección, más allá de usar la metodología convencional para la colecta de semen.

El descenso de microorganismos en el prepucio se logró por la aplicación del antiséptico que es la clorhexidina al 20% siendo un producto bactericida y fungicida, muestra un marco de acción aceptable para realizar la colecta de semen, destruyendo la pared bacteriana provocando una precipitación de proteínas y ácidos nucleicos, así también la implementación del protocolo de lavado de manos al momento de manipular el prepucio, influyendo de forma directa en el descenso de microorganismos en el prepucio.

Este trabajo coincide con la investigación de Toniolli et al. (2002) que indica que el uso de agua destilada y un desinfectante generará una reducción del desarrollo de bacterias, por un lapso de tiempo suficiente hasta el momento de la colecta; evidentemente la aplicación de sustancias antisépticas nos darán mayor seguridad de evitar una contaminación de la muestra principal, según el tipo de antiséptico a utilizar se busca que tenga una acción bactericida que no afecte microflora cutánea de la región en la que se aplique, este producto también debe garantizar un tiempo de acción suficiente para realizar la colecta de semen. Hidalgo et al. (2005) y (Jimenez Escobar, 2019) mencionan que la calidad del semen estará muy relacionado con la limpieza y estado fisiológico del toro, si uno de estas variables llega a sufrir una alteración lo más probable es que el semen también sufra alteraciones por contaminación de otros microorganismos; el prepucio será uno de los factores predisponentes a la contaminación del semen es por eso que la limpieza con antisépticos será de vital importancia para mantener un desarrollo microbiológico dentro de los estándares de referencia al momento de la colecta. Por otra parte no concuerda con los trabajos de Prado y machado (2005) que recalca que aun con el lavado prepucio y uso de desinfectante solo se reducirá un poco el desarrollo de bacterias, ya que las presentes en el semen son parte de la flora microbiana del pene, reafirmando este concepto Virginia (2004) afirma que es parte de la fisiología animal mostrar más desarrollo microbiano en orificios naturales ya que en el glande secreta una sustancia conocida como esmegma que contiene células muertas y cebo natural aumentan el desarrollo de microorganismo oportunistas capaz de generar futuras infecciones, Evidentemente este trabajo busca reducir la carga microbiológica por el uso de antisépticos para que pueda ser aceptada por los valores de referencia evitando una contaminación del semen

fresco y congelado; Silveira y alba (2016), Puerta et al. (2014) determinan que siempre existirá un desarrollo bacteriano en la piel y será imposible crear áreas estériles ya que existe un factor de contaminación por el ambiente. Yaniz (2010) determinó que pese a un buen lavado de prepucio y materiales un factor a tomar en cuenta será el ambiente siendo algo que no se puede controlar. Es por eso que al momento de la colecta de semen el operario debe ser dinámico, teniendo todo listo para la manipulación evitando contaminaciones cruzadas, así mismo es mejor realizar un secado del prepucio con material estéril en vez de esperar que seque por si solo después del lavado lo cual por factores ambientales la probabilidad de contaminación es más alta.

7.1.2 Vagina Artificial

Tabla 10

Mesofilos aerobios totales en la Vagina Artificial.

Indicador Bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Mesofilos aerobios totales	$6,24 \times 10^4$	$6,25 \times 10^3$	$1,35 \times 10^2$	< 10	<10 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación diagnóstico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida de Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Mesofilos Aerobios Totales en la Vagina Artificial, es superior al valor de referencia (<10 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 10 se aplica el protocolo correspondiente, se evalúa cada dos meses, observando que en la primera y segunda evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la tercera evaluación se realiza al seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 11*Análisis de Varianza Vagina Artificial Mesofilos Aerobios Totales.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	12	3	41,37	24,15	0,00508	3,4902
Dentro de los grupos	59	12	49,166			
Total	71	15				

Nota. Dato obtenido Microsoft Excel análisis de varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,00508), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 12*Prueba de Duncan Variable Vagina Artificial Mesofilos Aerobios Totales.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	62400,00	4	3060,83	A
2	6250,00	4	3060,83	B
3	135,00	4	3060,83	B
4	10,00	4	3060,83	C

Nota. (A) Evaluación diagnóstico

(B) 1er. Y 2do. Tiempo

(C) 3er Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 12 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación diagnóstico) y B (1T – 2T) así también entre A y C (3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C.

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de Mesofilos aerobios totales identificando que supera el dato de referencia $6,24 \times 10^4$ UFC/ml, con la

aplicación de clorhexidina en las 3 evaluaciones realizadas se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se aplicó el tratamiento a la vagina artificial, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia $6,25 \times 10^3$ UFC/ml. Para la segunda evaluación se implementó el protocolo de higiene, por factores de manipulación y control de ambiente ya que el personal tiene una rutina para esterilizar la vagina artificial que consiste en lavar el material con agua destilada 3 veces y posterior esterilizarla en el autoclave, el problema es al armar las piezas de la vagina artificial se lo realiza sin lavar las manos generando una contaminación de este material que es uno de los predisponentes a la contaminación del semen teniendo resultados de $1,35 \times 10^2$ UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó el seguimiento para evitar contaminación del material mostrando un descenso en la carga bacteriana <10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OMS <10 UFC/ml.

Tabla 13

Coliformes Totales en la Vagina Artificial.

Indicador Bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Coliformes Totales	90	< 10	< 10	< 10	<10 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida de Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica (2013).

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Coliformes Totales en la Vagina Artificial, es superior al valor de referencia (<10 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 13 se aplica el protocolo correspondiente, se evalúa cada dos meses, observando que en la primera, segunda y tercera evaluación el dato obtenido ingresa dentro del valor de referencia, al realizar un seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 14*Análisis de Varianza Vagina Artificial Coliformes Totales.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	44	3	14,84	12,51	0,0512	3,490
Dentro de los grupos	50	12	42			
Total	95	15				

Nota. Dato obtenido Microsoft Excel análisis de varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,0512), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 15*Prueba De Duncan Variable Vagina Artificial Coliformes Totales.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	90,00	4	3,23	A
2	10,00	4	3,23	B
3	10,00	4	3,23	B
4	10,00	4	3,23	B

Nota. (A) Evaluación Diagnostico

(B) 1er. - 2do. y 3er tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostad.

En la tabla 15 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T – 3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente.

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de Coliformes Totales identificando que supera por mucho el dato de referencia 90 UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en las 3 evaluaciones realizadas se observa el descenso de microorganismos. En la primera segunda y tercera evaluación se implementó el

tratamiento, protocolos de asepsia en la manipulación de la vagina artificial y seguimiento, mostrando el descenso en la carga bacteriana que entraba en el rango de referencia <10 UFC/ml. Por factores de manipulación y control de ambiente ya que el personal tiene una rutina para esterilizar la vagina artificial que consiste en lavar el material con agua destilada 3 veces y posterior esterilizarla en el autoclave, el problema es al armar las piezas de la vagina artificial se lo realiza sin lavar las manos generando una contaminación de este material que es uno de los predisponentes a la contaminación del semen; referencia obtenido de la OMS <10 UFC/ml.

Tabla 16

Staphylococcus aureus en la Vagina Artificial

Indicador Bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Staphylococcus aureus.	1,24 x10 ⁴	2,95 x10 ²	< 10	< 10	<10 UFC/ml

Nota. ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida de Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica (2013).

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, *Staphylococcus aureus* en la Vagina Artificial, es superior al valor de referencia (<10 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 16 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primera evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la segunda y tercera evaluación se realiza un seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 17*Análisis de Varianza Vagina Artificial Staphylococcus aureus.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	40,81	3	13,6	24,544	0,00523	3,49
Dentro de los grupos	29	12	24,9			
Total	69,81	15				

Nota. Dato obtenido Microsoft Excel análisis de varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,00523), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 18*Prueba de Duncan Variable Vagina Artificial Staphylococcus aureus.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	12400,00	4	750,96	A
2	295,00	4	750,96	B
3	10,00	4	750,96	B
4	10,00	4	750,96	C

Nota. (A) Evaluación Diagnostico.

(B) 1er. Y 2do. Tiempo

(C) 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 18 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T) así también entre A y C (3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de *Staphylococcus aureus* identificando que supera por mucho el dato de referencia

1,24x10⁴ UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en las 3 evaluaciones realizadas se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se aplicó el tratamiento a la vagina artificial, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entra en el rango de referencia 2,95x10² UFC/ml. Para la segunda evaluación se implementó el protocolo de higiene, por factores de manipulación y control de ambiente ya que el personal tiene una rutina para esterilizar la vagina artificial que consiste en lavar el material con agua destilada 3 veces y posterior esterilizarla en el autoclave, el problema es al armar las piezas de la vagina artificial se lo realiza sin lavar las manos generando una contaminación de este material que es uno de los predisponentes a la contaminación del semen teniendo resultados de <10 UFC/ml. En la tercera evaluación se realizó un seguimiento mostrando un descenso en la carga bacteriana <10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OMS <10 UFC/ml.

La metodología de colecta de semen por el uso de la vagina artificial trae muchos beneficios consigo como ser la obtención facilitada de material genético para ser usado en un futuro, dicho material debe ser bien cuidado y almacenado para evitar cualquier daño, por sus características desmontables es de fácil lavado y esterilizado, por factores de mala manipulación y control de ambiente es un material que se puede contaminar fácilmente es por eso que la aplicación de un antiséptico realizara un descenso en el desarrollo microbiológico para su uso, sin afectar la integridad del material.

Roman et al. (2014) detalla los componentes y características de la vagina artificial dentro de los cuales uno de los más importantes será la camisa de goma y el tubo de colecta que están en contacto con el semen fresco es por esa razón que resalta la limpieza de estos componentes ya que son los principales factores que pueden contaminar el semen fresco, evidentemente es cierto para la manipulación de la vagina artificial el personal debe lavarse las manos antes de manipularla y no exponerla al medio ambiente antes de su uso para evitar contaminarla. Por otra parte Arauz S. et al. (2000) y Yaniz (2010) determinan que la contaminación del semen fresco se debe a la mala manipulación de los materiales y la exposición al medio ambiente encontrando así microorganismos como *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* estas bacterias son causantes de diferentes patologías que pueden afectar la funcionalidad

espermática si la concentración es mayor a la establecida. Es así que las rutinas repetitivas del personal no permiten apreciar los factores de contaminación de los ambientes y materiales. Hernández et al. (2017) recalca que todo material dispuesto a usar para la colecta de semen debe estar listo y almacenado de forma que no llegue a contaminarse o dañarse. Es por eso que en este trabajo se dio un seguimiento al operador recalcando el manejo adecuado de la vagina artificial dando énfasis al armado del material en un lugar limpio, lavado de manos y aplicación de antiséptico. Aguirre (2012) recalca la manipulación rápida y observación de la vagina artificial, evitando rajaduras en la camisa de goma que puede ser un factor de contaminación o lesiones en el pene del toro. Es por eso que se debe verificar el estado de cualquier material antes de usarlo, en este trabajo se buscó desarrollar protocolos de manipulación y desinfección de la vagina artificial teniendo como resultado el descenso de la carga microbiológica.

7.1.3 Lavado de Manos

Tabla 19

Mesofilos Aerobios Totales en el Lavado de Manos.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Mesofilos Aerobios Totales	2,85x10 ⁴	3,2x10 ³	9,5x10 ²	<10	<100 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida Taddei Moran et al. (2019) OPS lavado de manos y piel quirúrgico.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Mesofilos Aerobios Totales en el Lavado de Manos, es superior al valor de referencia (<100 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 19 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primera y segunda evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la tercera evaluación se realiza un seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 20*Análisis de Varianza Lavado de Manos Mesofilos Aerobios Totales*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	22,22	3	74,03	12,865	0,0054	3,490
Dentro de los grupos	22,85	12	19,04			
Total	45,06	15				

Nota. Dato obtenido de Microsoft Excel Análisis de Varianza

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,0054) por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 21*Prueba de Duncan Variable Lavado de Manos Mesofilos Aerobios Totales.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	28500,00	4	6900,68	A
2	3200,00	4	6900,68	B
3	950,00	4	6900,68	B
4	10,00	4	6900,68	C

Nota. (A) Evaluación Diagnostico.

(B) 1er. Y 2do. Tiempo

(C) 3er. Evaluación

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 21 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T) así también entre A y C (3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C.

Al realizar el muestreo de diagnóstico se determinó la media de Mesofilos aerobios totales identificando que supera el dato de referencia $2,85 \times 10^4$ UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en las 3 evaluaciones, implementación de los 11 pasos de

lavado de manos según la OMS se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se aplicó el tratamiento de asepsia y lavado de manos, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia $3,2 \times 10^3$ UFC/ml. Para la segunda evaluación se implementó el protocolo de higiene recalcando que parte del lavado de manos sea al utilizar jabón líquido o en barra este debe generar espuma la cual generara un descenso en la carga microbiológica, por factores control de ambiente el personal no genera la espuma suficiente así también un adecuado enjuague de las manos generando una contaminación que es uno de los predisponentes a la contaminación del semen teniendo resultados de $9,5 \times 10^2$ UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó el seguimiento al momento del lavado de manos también el secado de las manos se realizó con gasas estériles mostrando un descenso en la carga bacteriana <10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OPS <100 UFC/ml.

Tabla 22

Coliformes Totales en el Lavado de Manos.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/enjuague
	ED	1T	2T	3T	
Coliformes Totales	9×10^2	$4,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	<10	<100 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida Taddei Moran et al. (2019) OPS lavado de manos y piel quirúrgico.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstica, Coliformes Totales en el Lavado de Manos, es superior al valor de referencia (<100 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 22 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primera y segunda evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la tercera evaluación se realiza un seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 23*Análisis de Varianza Lavado de Manos Coliformes totales.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	18,24	3	60,80	18,744	0,00547	3,490
Dentro de los grupos	38,93	12	3,244			
Total	57,17	15				

Nota. Dato obtenido de Microsoft Excel Análisis de Varianza

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,00547), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 24*Prueba de Duncan Variable Lavado de Manos Coliformes Totales.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	900,00	4	109,16	A
2	470,00	4	109,16	B
3	110,00	4	109,16	C
4	10,00	4	109,16	C

Nota. (A) Evaluación Diagnostico.

(B) 1er. Tiempo

(C) 2do y 3er. Evaluación

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 24 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T) así también entre A y C (2T – 3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C

Al realizar el muestreo de diagnóstico se determinó la media de Coliformes Totales identificando que supera por mucho el dato de referencia 9×10^2 UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en las 3 evaluaciones, implementación de los 11 pasos de

lavado de manos según la OMS se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se aplicó el tratamiento de asepsia y lavado de manos, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia 4.7×10^2 UFC/ml. Para la segunda evaluación se implementó el protocolo de higiene recalcando que parte del lavado de manos sea utilizado jabón líquido o en barra este debe generar espuma la cual generara un descenso en la carga microbiológica, por factores control de ambiente el personal no genera la espuma suficiente así también un adecuado enjuague de las manos generando una contaminación que es uno de los predisponentes a la contaminación del semen teniendo resultados de $1,1 \times 10^2$ UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó un seguimiento al momento del lavado de manos también el secado de las manos se realizó con gasas estériles mostrando un descenso en la carga bacteriana <10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OPS <100 UFC/ml.

Tabla 25

Staphylococcus aureus en el Lavado de Manos.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml enjuague
	ED	1T	2T	3T	
Staphylococcus aureus.	$2,6 \times 10^3$	$3,45 \times 10^2$	<10	<10	<100 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Referencia obtenida Taddei Moran et al. (2019) OPS lavado de manos y piel quirúrgico.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Mesofilos Aerobios Totales en el Lavado de Manos, es superior al valor de referencia (<100 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 25 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primera evaluación el dato obtenido aún no ingresa dentro del valor de referencia; para la segunda y tercera evaluación se realiza un seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/ml, que ingresa dentro del valor de referencia debido.

Tabla 26*Análisis de Varianza Lavado de Manos Staphylococcus aureus.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	17,80	3	59,35	18,345	0,00548	3,490
Dentro de los grupos	30	12	25,41			
Total	47,80	15				

Nota. Dato obtenido de Microsoft Excel Análisis de Varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,00548), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 27*Prueba de Duncan Variable Lavado de Manos Staphylococcus aureus.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	2600,00	4	58,38	A
2	345,00	4	58,38	B
3	10,00	4	58,38	C
4	10,00	4	58,38	C

Nota. (A) Evaluación Diagnostico.

(B) 1er. Tiempo

(C) 2do. Y 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 27 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T) así también entre A y C (2T – 3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente, de igual forma se observa una diferencia estadística entre B y C

Al realizar el muestreo de diagnóstico se determinó la media de Mesofilos aerobios totales identificando que supera por mucho el dato de referencia $2,6 \times 10^3$ UFC/ml, con la aplicación de clorhexidina en las 3 evaluaciones, implementación de los 11 pasos de

lavado de manos según la OMS se observa el descenso de microorganismos. En la primera evaluación se aplicó el tratamiento de asepsia, mostrando el descenso en la carga bacteriana que aún no entraba en el rango de referencia $3,45 \times 10^2$ UFC/ml. Para la segunda evaluación se implementó el protocolo de higiene en manos utilizando jabón líquido o en barra este debe generar espuma la cual generara un descenso en la carga microbiológica, por factores control de ambiente el personal no genera la espuma suficiente así también un adecuado enjuague de las manos generando una contaminación que es uno de los predisponentes a la contaminación del semen teniendo resultados de 10 UFC/ml. En la tercera evaluación se implementó el seguimiento al momento del lavado de manos también el secado de las manos se realizó con gasas estériles mostrando un descenso en la carga bacteriana <10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la OPS <100 UFC/ml.

La consideración por parte del personal de que no realizar la higiene de manos es un factor de riesgo bajo para la transmisión de infecciones o contaminación de los materiales es constante debido a la rutina monótona y automática de la colecta de semen. Obviando así el lavado adecuado de las manos, este trabajo orienta con normas ya establecida por la OMS acerca del correcto lavado de manos

Arauz S. et al. (2000) describe que la contaminación del semen es por fallas humanas al momento de manipular al toro y los materiales. Evidentemente esto es cierto ya que toda acción por parte del operario será con las manos y si esta no está debidamente desinfectada se llegara a contaminar varios materiales. Patiño, Morales (2013) y Castañeda, Hernández (2016) constituyen que la piel es un complejo ecosistema que se sustenta con una variedad de microorganismos capaces de mantener un equilibrio que al ser alterado puede causar problemas dérmicos, dichas alteraciones son causadas más por un proceso inmunodepresor que puede ser estrés u otra patología. Con el trabajo realizado no se busca una erradicación o alteración en dicho ecosistema si no un descenso en la carga microbiológica que ingrese dentro del rango de aceptación, evitando así una contaminación cruzada. Silva (2008) reafirma esta aclaración indicando que es imposible una erradicación de la microbiota, pero si es posible generar un descenso o desarrollo de bacterias. Dobbeling (2012) determinó que el uso de guantes no protege de la colonización de nuevas bacterias después del

lavado de manos demostrando que las mismas bacterias que se encuentran en las manos también están en los guantes de látex. Afirmando esta declaración, es por eso que el constante lavado de manos ayudara a bajar la carga microbiológica para desarrollar distintas labores de manipulación. SADI (2008) determina que el mejor producto para la asepsia de las manos es aquel que tenga una acción bactericida, con baja toxicidad. La clorhexidina posee estos atributos aplicando inmediata mente después del lavado de manos causando una ruptura de la pared bacteriana; la OMS describió una norma de 11 pasos de lavado de manos, corte de uñas, uso de artículos personales, recalando que la espuma producida es donde recién se está desarrollando una acción bactericida; el Desconocimiento acerca de las normas de bioseguridad y desinfección causara el mal hábito al momento de lavar las manos y no darle la importancia necesaria.

7.2 Área de morfología del semen

7.2.1 Medio Ambiente del Laboratorio

Tabla 28

Mesofilos Aerobios Totales en el Medio Ambiente del Laboratorio.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC / Placa
	ED	1T	2T	3T	
Mesofilos Aerobios Totales	11	< 10	< 10	< 10	< 10 UFC / Placa

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Rosales Lopez, Impacto de las 5s en la Calidad Microbiológica del Aire del Laboratorio de Calidad de Productos Agrobiologicos 2018.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Mesofilos Aerobios Totales en el Medio Ambiente del Laboratorio, es superior al valor de referencia (<10 UFC/placa). Como se observa en la Tabla 28 se aplica el protocolo correspondiente, evaluando cada dos meses, observando que en la primera, segunda y tercera evaluación el dato obtenido ingresa dentro del valor de referencia al realizar un seguimiento minucioso al momento de la colecta asegurándonos el cumplimiento del protocolo obteniendo un valor de <10 UFC/placa, que ingresa dentro del valor de referencia debido

Tabla 29*Análisis de Varianza Medio Ambiente del Laboratorio Mesofilos Aerobios Totales.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	21	3	72	14,01	0,05143	3,490
Dentro de los grupos	38	8	4			
Total	59	11				

Nota. Dato Obtenido de Microsoft Excel Análisis de Varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,05143), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 30*Prueba de Duncan Variable Medio Ambiente del Laboratorio Mesofilos Aerobios Totales.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	11,50	4	0,83	A
2	1,00	4	0,83	B
3	1,00	4	0,83	B
4	1,00	4	0,83	B

Nota. (A) Evaluación Diagnostico

(B) 1er. - 2do. y 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 30 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T – 3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente.

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de Mesofilos aerobios totales identificando que supera el dato de referencia 11 UFC/placa, con la aplicación de hipoclorito de sodio al 0,8% en las 3 evaluaciones, limpiando los mesones, pisos con campos limpios dando énfasis a las zonas donde existe mayor movimiento por parte del personal así también son zonas donde se manipula con más frecuencia el semen fresco, teniendo un descenso en la carga microbiológica de <10 UFC/placa que está dentro del valor de referencia.

Tabla 31

Coliformes Totales en el Medio Ambiente del Laboratorio.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC / Placa
	ED	1T	2T	3T	
Coliformes Totales	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10 UFC / Placa

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Rosales Lopez, Impacto de las 5s en la Calidad Microbiológica del Aire del Laboratorio de Calidad de Productos Agrobiologicos 2018.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Coliformes Totales en el Medio Ambiente del Laboratorio ingresa dentro del valor de referencia (<10 UFC/placa); como se observa en la tabla 31 En la primera, segunda y tercera evaluación el dato obtenido <10 UFC/ml ingresa dentro del valor de referencia debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Tabla 32

Staphylococcus aureus en el Medio Ambiente del Laboratorio.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC / Placa
	ED	1T	2T	3T	
Staphylococcus aureus	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10 UFC/ Placa

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Rosales Lopez, Impacto de las 5s en la Calidad Microbiológica del Aire del Laboratorio de Calidad de Productos Agrobiologicos 2018.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, *Staphylococcus aureus* en el Medio Ambiente del Laboratorio ingresa dentro del valor de referencia (<10 UFC/placa); como se observa en la tabla 32. En la primera, segunda y tercera evaluación el dato obtenido <10 UFC/ml ingresa dentro del valor de referencia debido al seguimiento al momento de la colecta.

El Desconocimiento acerca de las normas de bioseguridad y desinfección de laboratorio trae consigo la contaminación cruzada, siendo deber del personal saber distribuir correctamente los materiales evitando así el movimiento constante innecesario dentro del laboratorio, así mismo la limpieza antes y después de su uso con sustancias desinfectantes como el uso del hipoclorito de sodio al 0,8% teniendo una acción oxidativa en diferentes microorganismos.

Este trabajo tiene relación con lo que describe Araya (2003) que todo laboratorio que procese muestras biológicas debe tener una correcta señalización, ventilación, sistema de desechos con filtros necesarios para evitar una contaminación del medio ambiente equipos de desinfección en los ingresos. Evidentemente la señalización de indumentaria, recorrido orientara al operario que hacer para evitar contaminar el laboratorio. Rosales (2019) y Yaniz (2010) describe que la desinfección de mesones y equipos debe ser constante para evitar contaminación de microorganismos siendo los más comunes hallar dentro de laboratorios son Mesofilos aerobios totales y estos son capaces de contaminar muestras estériles. Afirmando esta declaración muchas de las muestras a procesar serán propensas a contaminarse haciendo creer que el semen en este caso está contaminado con un desarrollo microbiológico. Valencia (2017) y Gonzales et al. (2014) realizaron estudios donde la mayor parte del personal no conoce de procesos de desinfección de laboratorios, debido a la poca capacitación, control y seguimiento por parte de autoridades haciendo pensar al personal que no influirá sus acciones con la contaminación del lugar. Aunque gran parte del personal conoce normas básicas de limpieza quedándose con su conocimiento no busca nuevas normas o actualizaciones para mejorar la bioseguridad dentro del laboratorio. Todo proceso de desinfección dentro de los laboratorios busca bajar el desarrollo de microorganismos.

7.2.2 Semen Fresco

Tabla 33

Mesofilos Aerobios Totales en el Semen Fresco.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Mesofilos Aerobios Totales	1,725x10 ⁴	< 10	< 10	< 10	500 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 1978.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, Mesofilos Aerobios Totales en el Lavado de Manos, es superior al valor de referencia (500 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 33 ya que supera dicho valor; no se aplicó ningún tratamiento directo sobre este factor, pero la evaluación y aplicación de tratamientos en los otros factores influyo en el descenso en la carga microbiológica ya que en la en la primera, segunda y tercera evaluación el dato obtenido <10 UFC/ml ingresa dentro del valor de referencia debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Tabla 34

Análisis de Varianza Semen Fresco Mesofilos Aerobios Totales.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	19,594	3	65	15,353	0,005438	3,490
Dentro de los grupos	25,02	12	20,33			
Total	44,594	15				

Nota. Dato Obtenido de Microsoft Excel Análisis de Varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,005438), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 35*Prueba de Duncan Variable Semen Fresco Mesofilos Aerobios Totales.*

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	17250,00	4	3103,26	A
2	1,00	4	3103,26	B
3	1,00	4	3103,26	B
4	1,00	4	3103,26	B

Nota. (A) Evaluación Diagnostico

(B) 1er. - 2do. y 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 35 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T – 3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente.

Al realizar el muestreo de diagnóstico se determinó la media de Mesofilos aerobios totales identificando que supera por mucho el dato de referencia $1,725 \times 10^4$ UFC/ml, con la aplicación de antisépticos, desinfectantes normas de lavado de manos y un seguimiento minucioso se ve un descenso en la carga microbiológica que está dentro del valor de referencia. No se aplicó ningún tratamiento directo sobre el semen fresco, pero el seguimiento a los distintos factores en las diferentes áreas de trabajo mostro un descenso aceptable para el uso y comercialización del semen, ya que se obtuvo datos < 10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la FAO 500 UFC/ml.

Tabla 36*Coliformes Totales en el Semen Fresco.*

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Coliformes Totales	< 10	< 10	< 10	< 10	500 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 1978.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, *Coliformes Totales en el Semen Fresco*, ingresa dentro del valor de referencia (500 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 36 no se aplicó ningún tratamiento directo sobre este factor, pero la evaluación y aplicación de tratamientos en los otros factores influyo en el descenso en la carga microbiológica debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Tabla 37

Staphylococcus aureus en el Semen Fresco.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Staphylococcus aureus	2930	< 10	< 10	< 10	500 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.
(T) Tiempo

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 1978.

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico, *Staphylococcus aureus* en el Semen Fresco, es superior al valor de referencia (500 UFC/ml). Como se observa en la Tabla 37 ya que supera dicho valor; no se aplicó ningún tratamiento directo sobre este factor, pero la evaluación y aplicación de tratamientos en los otros factores influyo en el descenso en la carga microbiológica ya que en la en la primera, segunda y tercera evaluación el dato obtenido <10 UFC/ml que ingresa dentro del valor de referencia debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Tabla 38

Análisis de Varianza Semen Fresco Staphylococcus aureus.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F cal.	Probabilidad	F tab.
Entre grupos	45	3	15	11,29	0,005428	3,490
Dentro de los grupos	25,6	12	21,33			
Total	70,6	15				

Nota. Dato Obtenido de Microsoft Excel Análisis de Varianza.

El valor asociado para esta prueba estadística es ($p < 0.05$) observando una diferencia significativa (0,005428), por lo tanto aceptamos la hipótesis alterna. Como es un valor significativo se realiza comparación de medias por la prueba Duncan.

Tabla 39

Prueba de Duncan Variable Semen Fresco Staphylococcus aureus.

Evaluación	Medias	n	E.E.	
1	2930,00	4	539,82	A
2	1,00	4	539,82	B
3	1,00	4	539,82	B
4	1,00	4	539,82	B

Nota. (A) Evaluación Diagnostico

(B) 1er. - 2do. y 3er. Tiempo

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) obtenida de Infostat.

En la tabla 39 se aprecia una diferencia significativa de medias entre A (Evaluación Diagnostico) y B (1T – 2T – 3T) debido a un seguimiento minucioso en la aplicación del protocolo correspondiente.

Al realizar el muestreo de evaluación diagnóstico se determinó la media de *Staphylococcus aureus* identificando que supera por mucho el dato de referencia $2,93 \times 10^3$ UFC/ml, con la aplicación de antisépticos, desinfectantes normas de lavado de manos y un seguimiento minucioso se ve un descenso en la carga microbiológica que está dentro del valor de referencia. No se aplicó ningún tratamiento directo sobre el semen fresco, pero el seguimiento a los distintos factores en las diferentes áreas de trabajo mostro un descenso aceptable para el uso y comercialización del semen, ya que se obtuvo datos < 10 UFC/ml que está dentro del Valor de referencia obtenido de la FAO 500 UFC/ml.

Aunque no se aplicó un tratamiento de forma directa sobre el semen fresco se evidencio que el descenso de bacterias está sujeto a las fases de colecta y evaluación del semen que son donde el semen se contamina, de acuerdo al grado de contaminación tendrá un efecto negativo en la calidad seminal.

Este trabajo tiene relación con lo que menciona Chipana (2014) realizando una evaluación del semen fresco de la Estación Experimental de Choquenaira donde describió el desarrollo de *Pseudomona spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* y *Proteus spp.* llegando a la conclusión de que siempre existirá contaminación del semen pero estas deben estar por debajo de la norma de referencia. Indudablemente nuestro trabajo demostró esta afirmación el desarrollo de bacterias debe estar por debajo de la norma que se está implementando dando garantías de que no afectara en la calidad del semen.

Cuadra (2012), Gómez y Silveira (2005) demostraron el desarrollo de microorganismos llegando a una conclusión de que existió una mala manipulación, manejo en todas las fases anteriores hasta la evaluación del semen determinando así que la presencia de cualquier impureza afectara la calidad y funcionalidad espermática. Claro, estas impurezas afectarían el plasma seminal y el acrosoma del espermatozoides generando una pérdida en la cantidad y calidad del semen reafirmando este concepto que menciona Acosta (2009) de acuerdo a la cantidad de bacterias este afectara en un 70% la calidad del plasma seminal. Kozdrowski et al. (2005) comprobó que 10000 UFC/ml son capaces de causar severas infecciones en el aparato genito-urinario de la hembra. Evidentemente es por eso que la FAO determino que solo es aceptable 500 UFC/ml, es por eso que este trabajo determina saber si existe contaminación en el semen fresco, evidenciando de que si lo hay cuando no existe un control en las diferentes fases de colecta se e un desarrollo microbiológico por encima de los parámetros de aceptación al corregir estos se ve como en el semen baja el desarrollo bacteriano.

7.3 Semen Congelado

Tabla 40

Mesofilos Aerobios Totales en el Semen Congelado.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Mesofilos Aerobios Totales	<10	<10	<10	<10	500 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 1978

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico y evaluaciones, Mesofilos Aerobios Totales en el Semen Congelado no se apreció un desarrollo microbiológico dentro del valor de referencia (500 UFC/ml) como se observa en la tabla 40 debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Tabla 41

Coliformes Totales en el Semen Congelado.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Coliformes Totales	<10	<10	<10	<10	500 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 1978

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico y evaluaciones, *Coliformes Totales en el Semen Congelado* no se apreció un desarrollo microbiológico dentro del valor de referencia (500 UFC/ml) como se observa en la tabla 41 debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Tabla 42

Staphylococcus aureus en el Semen Congelado.

Indicador bacteriológico	Resultado UFC				Valore de referencia UFC/ml
	ED	1T	2T	3T	
Staphylococcus aureus	<10	<10	<10	<10	500 UFC/ml

Nota. (ED) Evaluación Diagnostico.

(T) Tiempo

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 1978

El valor obtenido en la fase de evaluación diagnóstico y evaluaciones, *Staphylococcus aureus* en el Semen Congelado no se apreció un desarrollo microbiológico dentro del valor de referencia (500 UFC/ml) como se observa en la tabla 42 debido al seguimiento minucioso al momento de la colecta.

Aunque no se aplicó un tratamiento de forma directa al semen congelado en este no se evidencio el desarrollo de microorganismos debido al diluyente Steridyl que posee una acción de 4 antibióticos 3 de ellos una acción bacteriostática y 1 bactericida.

Echeverry (2015) afirma que una buena manipulación hasta el momento de la criopreservacion permite tener una mejor calidad del producto sin tener riesgos de contaminación. Y esto se evidencio incluso con el semen fresco al tener una mejor manipulación, asepsia, desinfección no se evidencia una contaminación del material genético. Moran et al (2021), Morales et al. (2013), Catena et al. (1998) en distintas evaluaciones al azar con pajillas congeladas evidenciaron el desarrollo de *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomona* spp. *Bacillus* spp, *Pasteurella* spp, llegando a la conclusión de que no hubo un buen manejo en la colecta de semen, alteración en los tanques de criopreservacion que afectaron en el desarrollo de microorganismos. Es por eso que es de vital importancia dar seguimiento a todo el proceso de colecta de semen. Risopatron et al. (1994), Silveira Prado & Machado Perez (2005). Recomiendan que antes del uso de las pajillas congeladas se debe realizar un preuba al azar donde se aprecie la calidad, viabilidad y/o contaminación de la muestra. Indudablemente estas pruebas antes de su uso nos permitira saber si el producto se puede utilizar.

8 CONCLUSIONES

En la investigación se evaluó los factores que influyen en la calidad microbiológica del semen de Bovino elaboradas en la Estación Experimental Choquenaira en la gestión 2021. La aplicación del tratamiento, protocolo de higiene y seguimiento, en las evaluaciones realizadas se logró obtener un descenso en la carga microbiológica de cada factor ingresando dentro del rango de referencia utilizado por lo mencionado, en comparación con los resultados de evaluación diagnóstico, por los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alterna donde a la aplicación de la clorhexidina y protocolos de higiene a los factores de contaminación si influye en la calidad microbiológica del semen, mostrando un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$), con un 95% de confiabilidad y 5% de error.

En el área de colecta de semen por los resultados obtenidos dan a conocer que esta es el área donde el riesgo de contaminación es alto, la aplicación del tratamiento y protocolos de higiene dan como resultado un producto más inocuo y útil.

En la evaluación de los factores que influyen en el área de evaluación morfológica del semen, el manejo por parte del personal es más aceptable siendo más conscientes de la limpieza y orden que debe existir en el laboratorio y verificando que la calidad del semen bovino sea más aceptable para su uso.

En la Evaluación del semen bovino criopreservado no se apreció un desarrollo microbiológico debido a la composición del diluyente utilizado.

9 RECOMENDACIONES

Por los resultados obtenidos se recomienda a la Estación Experimental de Choquenaira realizar capacitaciones, actualizaciones acerca de normas de bioseguridad y colecta de semen. En la colecta de semen y procesado de la muestra debe estar supervisado por un médico veterinario controlando el bienestar de los toros sementales, así también del manejo al momento de la colecta, evaluación y almacenaje del semen. Realizar un control, evaluando trimestralmente el semen congelado. Los sementales seleccionados para la colecta de semen deben contar con un registro sanitario (vacunas y desparasitaciones).

Control de la indumentaria correspondiente al ingresar a cada área del laboratorio de biotecnología siguiendo el protocolo establecido.

BIBLIOGRAFÍA

- MSc. Gonzales Herrera, S., Lic. Lozada Mendez , M., & MSc. Santiago Roque, I. (2014). Análisis bacteriológico de superficies inertes. *SciELO*, 1 - 3.
- Aguirre, M. (2012). Recomendaciones para el éxito de la inseminación artificial en ganado bovino. *AGROSAVIA*, 1 - 12.
- Alfaro, M., Rivas, M., Silva, R., & Gómez, E. (2019). Presencia de Escherichia Coli en el Contenido Prepuccial de Verracos en una Unidad de Produccion y su Influencia a Problemas de Fertilidad y Prolificidad. *Universidad estatal de milagro*, 1 - 125.
- Alvarez Romero, & Medellin. (2005). Bos taurus Linnaeus, 1758. *vestrebardos exóticos en Mexico*, 1-7.
- Arauz S., Stomelli A., & Williams S. (2000). Estudio Bacteriologico del Semen Porcino. *Congreso Mercosur de Produccion Porcina*, 1- 4.
- Araya, J. (2003). Bioseguridad y Medio Ambiente. *Etica y valores*, 1 -15.
- Avendaño Cortes, Toro, E., & Valeska, C. (2015). Apreciación del cumplimiento de la normativa de bioseguridad en los laboratorios docentes de la Escuela de Tecnología Médica. *DSpace*, 1 - 52.
- Bimonte, D. (2014). Comparación del efecto de tres antisepticos aplicados al lavado quirúrgico de manos medidos a través del. *REDVET*, 1 - 12.
- BIO, D. (2019). Corynebacterium spp. *insst*, 1 - 4.
- bosch, c. t. (2011). *medicina de urgencia en pequeños animales*. zaragosa - españa: servet.
- Brltania. (2018). Baird Parker Agar Base. *Brltania*, 1 - 2.
- Brltanla. (2018). violeta rojo y bilis glucosa agar. *Brltanla*, 1 - 2.

- Bush, L., & Vazquez, M. (2020). Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados. *Manual MSD*, 1 - 20.
- Butler, C., Serrano, V., & Cattaneo, M. (2011). Efectividad del hipoclorito y detergentes enzimáticos en la desinfección de superficies hospitalarias. *Repositorio institucional de la UNLP*, 1.
- Caiz, G. (2012). *Camara de Agricultura*. Obtenido de <https://agroecuador.org/index.php/blog-noticias/item/194-caracteristicas-de-la-raza-holstein#:~:text=Cuerpo%20anguloso%2C%20amplio%2C%20descarnado%3B,y%20medianamente%20ancho%2C%20cinchera%20grande>.
- Carpio Chuchuca, S. (2015). Evaluacion de dos Diluyentes Para la Crioconcervacion de Semen Bovino: Yema de Huevo vs Leche Descreamada . 1 -83.
- Castañeda Narvaez, J., & Hernandez Orozco, H. (2016). Higiene de manos con soluciones alcoholadas. *SciEIO*, 1 - 3.
- Catena, J., Jorge, M., & Soto, P. (1998). Micobacterias en Semen Bovino Criopreservado . *vet. agro vol XV*, 1 - 4.
- Chipana Chambi, G. (2014). Analisis de la Flora Microbiana del Semen Bovino (*Bos taurus*) Antes y Despues del Congelamiento en la Estacion Experimental de Choquenaira. *agro*, 1 - 88.
- Colado, L. P. (2010). *enfermedades infecciosas felinas*. españa: servet.
- Collado Soza, C. (2016). Interpretación de la circunferencia escrotal y análisis de semen. *UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA*, 1 - 36.
- Condalab. (2019). Agar para Métodos Estándar (PCA) ISO/APHA. *Condalab*, 1 - 2.

- Consensos, G. R. (2008). Recomendaciones Intersociedades para el Manejo de higiene de manos (SADI-SATI-ADECI-AAC). *SADI*, 1 - 34.
- Cortizas Rey, J., & Rumbo Prieto, J. (2019). Las Manos Limpias son Cuidados Seguros. *EDITORIAL CIENTIFICA*, 7-10.
- Cuadra Jama, M. (2012). Evaluación de semen congelado de caninos de dos a cinco años de edad con triladyl canine con yema de huevo al 10%, 20%, y 30% en el consultorio veterinario la quinta pata del gato. *facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales*, 1 -78.
- DataBio. (2018). Streptococcus spp. *INSST*, 1 -6 .
- Dolores Rojo, M., & Miranda, C. (2016). Clostridium perfringens: INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS. *SEIMIC*, 1 - 10.
- Echeverri Echeverry, J. (2015). Uso de Semen Sexado en Bovinos. *Universidad Tecnológica de Pereira Facultad Ciencias de la Salud*, 1 - 20.
- Echeverri Prieo, L., Cifuentes Orjuela, G., Granados Ramirez, J., Arias Palacios, J., & Fernandez Lopez, C. (2007). Cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en industria farmacéutica. *SciELO*, 1 - 5.
- Espinoza Vargas, W. (2012). Efecto de la Adición de un Surfactante natural ALOE. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI*, 1 - 155.
- FAO. (02 de mayo de 1978). *FAO*. Obtenido de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/cos78055.pdf>
- FarcoVet. (2015). tritohexidin plus. *FarcoVet*, 1.
- GANADEXIL. (1992). LINCOMICINA 150. *GANADEXIL* , 1 - 4.
- GANADEXIL. (1992). TILOSINA 100. *GANADEXIL*, 1 - 4.

GANADEXIL. (2016). ESPECTINOMICINA 300 mg. *GANADEXIL*, 1 - 5.

GDA. (30 de 06 de 2017). *EL TIEMPO*. Obtenido de <https://www.eltiempo.com/salud/cuantas-bacterias-cotienen-las-manos-y-como-evitarlo-104284>

Gomez, A., & Silveira, E. (2005). Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilinaestreptomicina en la reducción de la carga bacteriana del semen de. *REDVET*, 1 - 8.

Gonzales Herrera, S., Lozada Mendez, M., & Hernandez Garcia, N. (2019). Protocolo de limpieza y desinfección de mesas de trabajo en los laboratorios de enseñanza de Ciencias de la Salud-Xalapa. *UVSERVA*, 1 - 7.

hector quiroz, j. f. (2011). *epidemiologia de enfermedades parasitarias en animales domesticos*. ciudad de mexico.

Hernandez, M., Bueso, J. P., & Fernandez, A. (2017). Evaluación de la contaminación bacteriana del semen de moruecos recogidos mediante vagina artificial. *REDVET*, 1-9.

Hernandez, V., Fran , B., & Fernandez , A. (2017). Evaluación de la contaminación bacteriana del semen de moruecos recogido mediante vagina artificial. *redvet*, 1 - 9.

Hidalgo Ordoñez, C., Tamargo Miguel, C., & Diez Monforte, C. (2005). Análisis del Semen Bovino. *SERIDA*, 1-5. Obtenido de <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=1495>

- Ibañez, F., Lisarrague, C., Callejas, S., & Cabodevila, J. (2016). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo: ¿Conviene utilizar semen. *Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA*, 1 - 30.
- Jimenez Escobar, C. (08 de marzo de 2019). *CONtextoganadero*. Obtenido de <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/conozca-los-parametros-para-evaluar-el-semen-bovino>
- Kozdrowski R., Staroniewicz Z., & Dubiel A. (2005). Bacterial Flora of Semen of Wild Boar and their hybrids with domestic pig. *EJPAU*, 2.
- Lara Abad, G. (2019). *UAEH*. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=YRsKVAB9QoY>
- Larrea Izurieta, I., Falconi Borja, C., & Arcos Andrade, A. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus spp. 1 - 9.
- Lopez Betancourt, A., & Flores Ocampo, F. (2015). Memorias del III Encuentro de Matemáticas. Estado de Durando: L.M.A. Brenda Iveth Hernández Martínez.
- Lopez, J. (2021). Media. *Economipedia*, 1 - 3.
- M. Acosta., M. Ruedas, T. Arias, R. Paez, I. Espinosa, V. Martinez, & R. Perdigon. (2009). Evaluacion de la Contaminacion Bacteriana de Semen Porcino Puro y Diluido. *Sitio Argentino de Produccion Animal*, 1- 6.
- Machota, S., & Piriz, E. (2003). Manual de Microbiología Veterinaria. *Edit. McGraw-Hill Interamericana*, 1 - 837.
- maria del mar blacno gutierrez, p. t. (2011). *manual grafico inmunologia y enfermedades infecciosas del perro y el gato*. madrid : servet.
- Medicus, L. (2019). Pseudomonas. *Scielo*, 1 - 3.

- Mogollon Waltero, E. M. (2014). Manual de Procedimientos para la Colecta y Criopreservacion de Semen Bovino para la Empresa Santa Clara Genética estado Parama-Brasil. *Repositorio Institucional UCC*, 16.
- Morales , S., Cabrera, P., Pantoja, C., Garcia, D., & Solis, N. (2013). EVALUACION DE LA CARGA BACTERIANA EN PAJILLAS DE SEMEN CONGELADO DE TOROS DEL BANCO NACIONAL DE SEMENEVALUATION. *ResearchGate*, 28-38.
- Morales, S., Cabrera, P., Pantoja, C., & Garcia, D. (2013). EVALUACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN PAJILLAS DE SEMEN. *untitled*, 1 - 9.
- Moran, M., Etchecopaz, A., Cuestas , M., Feneti, S., Puca, G., Chiapparrone, M., & Catena, M. (2021). Aislamiento de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus alabamensis* en pajuelas de semen bovino criopreservado. *Repositorio institucional de la UNLP*, 1 - 3.
- OMS. (2013). Buenas practicas de la OMS para laboratoios de microbiologica farmaceutica . *Red PARF*, 1 - 38.
- Paez Baron, E., & Corredor Camargo, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, 1 - 12.
- pascalempibot, v. b. (2009). *enciclopedia de la nutricion clinica canina*.
- Patiño, L. A., & Morales, C. A. (2013). Microbiota de la piel: el ecosistema cutaneo. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 147-158.
- Perez Osorio, J., Chacon Jaramillo , L., Otero Arroyo, R., Cardona Alvarez, J., & Andrade Souza, F. (2014). Relación entr Relación entre la cir e la circunferencia escr encia escrotal, el cr otal, el crecimient ecimiento testicular o testicular. *Revista de Medicina Veterianria* , 73 - 87.

- Prado, E., & Machado, R. (2005). Flora Bacteriana del Semen de Toro Antes y Despues de la Congelacion. *REDVET*, 5-9.
- Puerta Suarez, J., Giraldo, M., Cavidad, A., & Cardona, W. (2014). Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *SciELO*, 1- 4.
- Quintero Arengas, A. (2021). Evaluacion General y Anatomica del Toro. *Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña*, 1 - 7.
- Quispe Mamani, J. C. (2018). menciona que la Estación Experimental Choquenaria tiene una precipitación promedio anual de 580 mm, valor que se encuentra en el rango del estudio para la Estación Meteorológica de Viacha. Este valor reafirma el comportamiento muy similar de la precipita. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 1.
- R. Muiño, M. Fernandez, H. Arean, L. Viana, M. lopez, A. Fernandez, & A. Peña. (2005). Nuevas Tecnologias Aplicadas al Proceso y Evaluacion del Semen Bovino en Centros de Inseminacion Artificial. *ITEA*, 1 - 9.
- Rangel. (2007). Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción. *REDVET*, 1- 5.
- Risopatron, J., Sanchez, R., Sepulveda, N., Villagran, E., & Peña, P. (1994). seleccion de espermatozoides de bovino desde semen congelado -descongelado: comparacion de dos metodos. *Arch MED. vET. XXVI*, 33 -37.
- RMLP. (2012). *Aspectos Político Institucionales*. Obtenido de <http://sitservicios.lapaz.bo/sit/atlasmetropolitano/institucionales.html>

- Roman, A., de Jesus, R., Figueroa, F., Jose, A., & Peña, J. (2014). Métodos de Extracción de Semen Bovino . *REDVET*, 1 - 8.
- Rosales Lopez, P. P. (2018). Impacto de las 5s en la calidad Microbiologica del Aire del Laboratorio de Calidad de Productos Agrobiologicos. *Industria Data*, 4-6.
- Ruiz Sesma, B., Ruiz Hernandez, H., Mendoza Nazar, P., Aguilar Tipacamu, G., Leon Velasco, H., & Ruiz Moreno, A. (2008). Comportamiento reproductivo de sementales bovinos de la raza pardo suizo (*Bos taurus*) activos, en un sistema. *Que hacer científico*, 1- 6.
- Serrano M., Perez M., Miguel J., & Milan J. (1994). Estudio de las Anormalidades Espermaticas de los Verraco en Relacion a Raza, Tipo y Epoca. *Anapore*, 40 - 57.
- Silva, C. (2008). Técnica de Lavado de Manos. *Revista de Enfermería* , 1 - 3.
- Silveira Prado, E., & Alba Gomez, L. (2006). La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. *REDVET*, 1 - 31.
- Silveira Prado, E., & Machado Perez, R. (2005). Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. *REDVET*, 1 - 9.
- Silverchari. (2005). Estafilococos. En Myaccess.
- STERIDYL. (2015). STERIDYL Medio completo para la congelación de semen bovino. *STERIDYL*, 1 -2 .
- Taddei Moran, F., Vergiu, C., Vadillo, R., & Ramos, D. (2019). Flora bacteriana despues del lavado de manos quirurgico. estudio piloto. *Scielo*, 1 - 6.

TodoAgro. (18 de 03 de 2011). *TodoAgro.com.ar*. Obtenido de <https://www.todoagro.com.ar/importancia-funcional-del-tamano-del-prepucio-en-toros-braford/>

Toniolli, R., Ferreira Fiuza, R., Capibaribe Jatahy, P., Queiroz Barros, D., & Sampaio Santos, B. (2002). Diferentes tipos de Higienizacion del veraco y su influencia sobre la calidad bacteriologica del eyaculado. *Universidad de Camaguey*, 1-4.

Torres Lopez, M., Diaz Alvarez, M., & Acosta Morales, A. (2009). La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana*, 1 - 8.

tort, p. (s.f.). *veterinaria practica*. el veterinario plus.

UEF. (2015). Etiopatogenia. 1- 18.

UNAM. (2007). Gentamicina. *UNAM*, 1.

Valencia Villarreal, P. (2017). *Evaluacion de la Eficacia de los Procesos de Limpieza y Desifecion en la Gestion de Saneamiento de los Laboratorios del Programa de Bacteriologiay Laboratorio Clinico de la UDES Campus Cucuta*.

Valle, A., Fuentes, A., & Puerta, M. (2005). Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo. *ACADEMIA*, 1 - 11.

Vallejos, D. (2014). *Evaluacion de la viabilidad de la creación de una empresa mediante la construcción de un plan*. Antioquia: Corporacion Universitaria Lasallista.

VALTEK. (2015). Agar MacConkey. *VALTEK S.A.*, 1 -2.

Virginia. (2004). *Principales Patologias del Tracto Reproductivo Bovino*. Obtenido de https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/691/1/1997_D45-49.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Yaniz, J., Marco- Aguado, M., Mateos, J., & Santolaria, P. (2010). Contaminación bacteriana del semen de carnero, sensibilidades a los antibióticos y efectos sobre la calidad del esperma durante el almacenamiento a 15 °C. *IUCA*, 142 - 149.

ANEXOS

Protocolo de higiene, asepsia en el área de colecta de semen

- 1.- Ingresar al área de colecta de semen con indumentaria adecuada (overol, botas de goma, guantes de trabajo) dejando objetos personales en el lugar designado.
- 2.- Lavarse las manos con agua y jabón según normas de la OMS/OPS (11 pasos de lavado de manos) antes y después de manipular objetos y animales.
- 3.- Conocer el procedimiento de colecta de semen antes de manipular el material y el animal.
- 4.- Realizar el lavado preucial del toro semental con agua y antiséptico correspondiente, secando excipientes con gazas estériles.
- 5.- Desinfectar la vagina artificial con el antiséptico correspondiente antes de usarlo en la colecta de semen.
- 6.- Una vez finalizada la actividad de colecta de semen, limpiar pisos y mesones con desinfectante correspondiente.

Nota. Protocolo de asepsia usado en el área de colecta de semen, durante la investigación.

Protocolo de higiene de desinfección en el área de evaluación morfológica del semen

- 1.- Ingresar con la indumentaria adecuada (guardapolvo, cofia, guantes de látex, calzados apropiados, cabello recogido) dejando objetos personales en el lugar designado.
- 2.- Lavarse las manos con agua y jabón según normas de la OMS/OPS (11 pasos de lavado de manos) antes y después de manipular material dentro del laboratorio.
- 3.- Ordenar y limpiar con el desinfectante correspondiente el área de trabajo antes y al finalizar de forma ordenada.
- 4.- Conocer el procedimiento de análisis de semen antes de manipular el material, usando solo el equipo y material necesario.
- 5.- Evitar el movimiento innecesario dentro del laboratorio.

Nota. Protocolo de desinfección usado en el área de evaluación morfológica del semen durante la investigación.

Norma de lavado de manos según normas OMS/OPS

- 1-. Mójese con las manos con agua.
- 2-. Deposite en la palma de la mano una cantidad de jabón suficiente para cubrir todas las superficies de la mano.
- 3-. Frótese las palmas de las manos entre sí.
- 4-. Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos y viceversa.
- 5-. Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados.
- 6-. Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos.
- 7-.Frótese con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo, atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa.
- 8-.Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación y viceversa.
- 9-.Enjuáguese las manos con agua.
- 10-.Séquense con una toalla desechable.
- 11-. Sívase de la toalla para cerrar el grifo.

Nota. Norma aplicada en cada área de la investigación



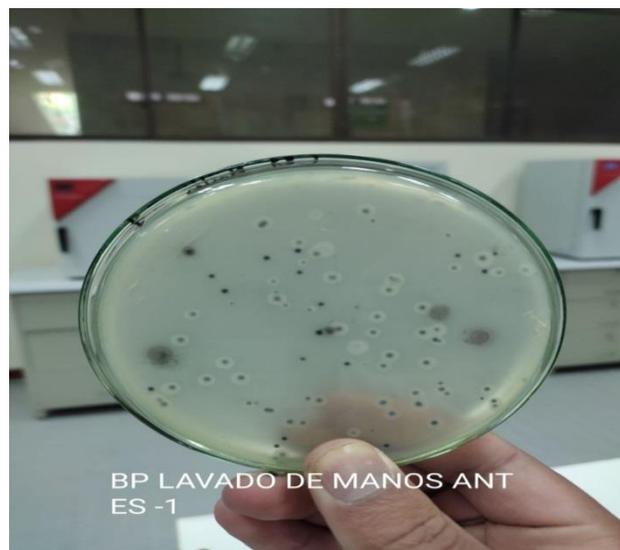
Nota. Ringer, 5 años, raza Holstein, toro semental a quien se dio seguimiento en la colecta de semen.



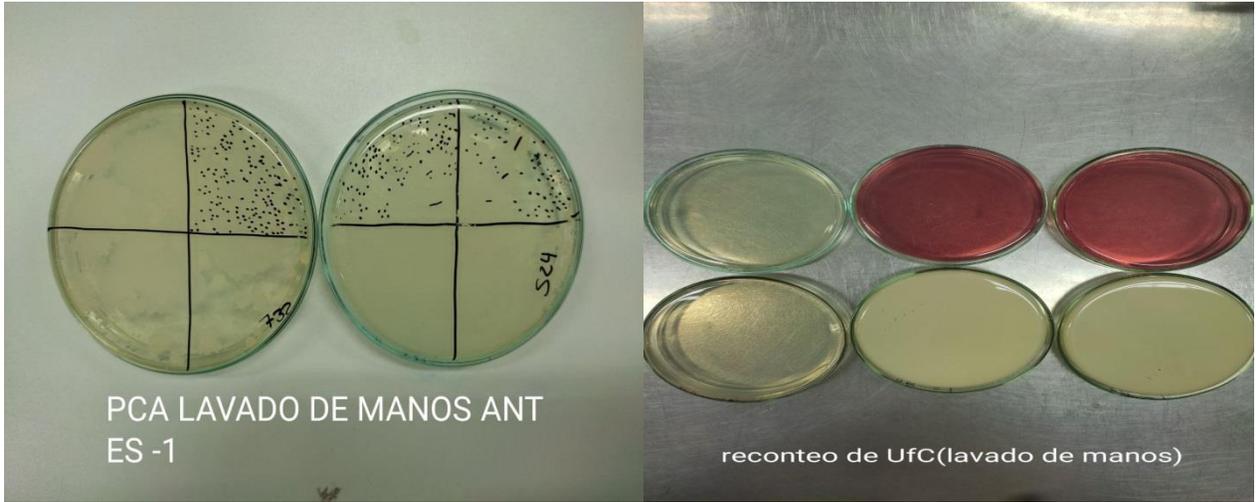
Nota. Toma de muestra en el laboratorio de biotecnología, izquierda aplicación de clorhexidina a vagina artificial. Derecha colocación de cajas Petri en ambiente de laboratorio de biotecnología.



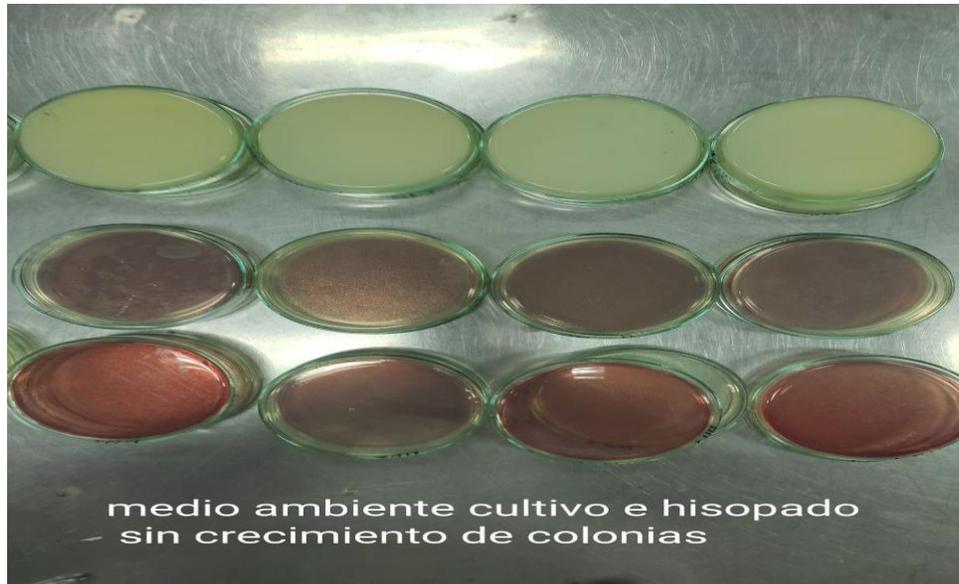
Nota. Izquierda vagina artificial, derecha tanques de almacenamiento de pajuelas seminales



Nota. Agar Bayer Parker con telurito de potasio, desarrollo bacteriano lavado de manos antes -1



Nota. Izquierda agar PCA, desarrollo bacteriano, lavado de manos antes -1, derecha agar PCA, RBN, Bayer Parker 3ra. Evaluación, sin desarrollo bacteriano.



Nota. Agar PCA, RBN y Bayer Parker, medio ambiente del laboratorio de biotecnología sin desarrollo bacteriano, 3ra. Evaluación.