



# Contaminación bacteriana por biofilm en un centro de inseminación artificial de porcino

● Ausejo R, Mendoza N, Miguel J, Dahmani Y, Fuentes E.

Magapor SL. Parque Científico Tecnológico Agroalimentario Valdeferrín.

Ejea de los Caballeros, Zaragoza.

## RESUMEN

En los centros de inseminación artificial las bacterias se introducen en la línea de producción de dosis seminales a través de los verracos, el personal, un deficiente protocolo de extracción de semen, el agua destilada, etcétera.

A continuación se relata el caso de un centro de inseminación cuyo sistema de control de calidad interno detecta diferencias en términos de capacidad de conservación entre dosis seminales provenientes de distintos sistemas de envasado, viéndose una drástica disminución de la motilidad espermática en menos de 96 horas.

Tras visitas al centro y el estudio seminal se detecta contaminación por *Serratia marcescens* originada en un biofilm formado en el sistema de envasado de las dosis seminales. Con la utilización de un diluyente especial de recogida se consigue eliminar el problema, y el centro es capaz de seguir trabajando hasta que se localiza la fuente de contaminación y se implantan una serie de efectivas medidas higiénicas.

## PALABRAS CLAVE

Contaminación, biofilm, *serratia marcescens*, centro de inseminación artificial porcino.

## INTRODUCCIÓN DEL CASO

El problema aparece en un centro de inseminación (CIA) comercial de 240 verracos aislado de otros núcleos de animales por varios kilómetros. Mediante el control de calidad interno llevado a cabo por el centro se detectan diferencias en términos de durabilidad de las dosis seminales según el sistema de envasado. En este centro se utilizan tres sistemas diferentes de envasado: Bolsa nº 1, Bolsa nº 2 y Tubo de termosellar. El llenado se realiza de forma automática mediante tres máquinas de envasado adaptadas a cada sistema. El principal síntoma observado es una drástica disminución de la motilidad de las dosis seminales 96 horas después de la producción. La motilidad espermática es un indicativo de calidad seminal y se utiliza como punto de referencia de fertilidad del verraco a utilizar en la inseminación artificial.

## MÉTODO DESARROLLADO

Tras recibir una solicitud de ayuda en el diagnóstico del problema, realizamos una visita a las instalaciones del CIA y tomamos muestras de un eyaculado que es envasado de manera manual en los distintos sistemas: Bolsa nº 1, Bolsa nº 2 y Tubo de termosellar. Estas muestras de semen se hacen por duplicado, y se contrastan la mitad en el laboratorio del CIA y la otra mitad en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos en cuanto a motilidad al cuarto día de conservación por ambos laboratorios no hacen sospechar de ninguna alteración en ninguno de los sistemas de envasado seminal. El CIA controla el problema mediante el uso de material reutilizable y realizando cambios en el sistema de limpieza.

Tras cuatro meses, el problema recidiva, y volvemos a visitar el centro para establecer un nuevo protocolo de estudio de muestras seminales. Recogemos el eyaculado de 13 machos realizando tres réplicas de cada uno envasadas en cada uno de los tres sistemas utilizados (Bolsa nº 1, Bolsa nº 2 y Tubo de termosellar), analizando un total de 118 dosis seminales distintas. En esta ocasión se confirma una gran disminución de la motilidad al 4º día de conservación en el sistema de envasado en las Bolsa nº 1 en todas las dosis analizadas (Figura nº 1).

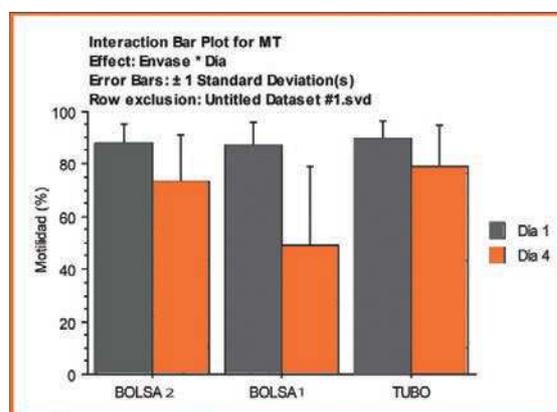
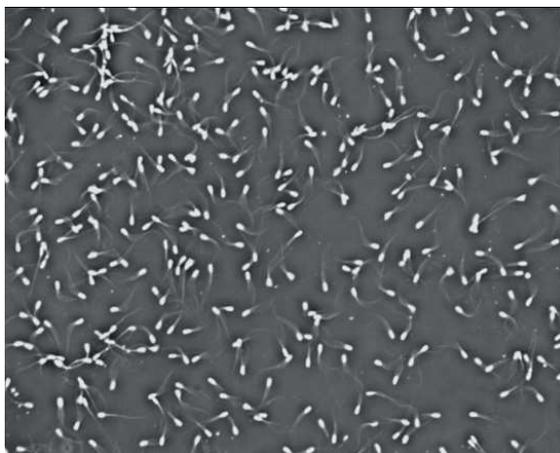


Figura 1. Diferencias de motilidad entre envases a día 1 y 4.



**Figura 2:** muestra de semen sin contaminación.

Al analizar las muestras en nuestro laboratorio mediante un sistema CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) se aprecian signos de contaminación bacteriana (turbidez y aglutinación en el eyaculado) en el grupo de menor motilidad espermática (*Figura 3*). En la *Figura 2* se aprecia una muestra de semen sin contaminación bacteriana.

## DIAGNÓSTICO

Debido a que el mismo eyaculado presenta diferente grado de contaminación según el sistema de envasado, se vuelve a visitar el centro para buscar el origen del problema, observando que las muestras afectadas son aquellas en las que el envasado se realiza de forma automática, pasando el semen diluido a través de la goma de dosificación del sistema de envasado. En las muestras no afectadas el envasado se realiza de forma manual y la dosis seminal no pasa a través del tubo. Este hecho es lo que nos hace sospechar de que el problema pueda estar en la goma usada para el envasa-



**Figura 3:** muestra de semen contaminado.

do, con lo que se decide enviar muestras para su análisis microbiológico; además se analizan los envases (Bolsa nº 1, Bolsa nº 2 y tubo de termosellar) y las dosis seminales, y se realiza un estudio epidemiológico de contaminación en las instalaciones que constó de:

- Toma de muestras mediante hisopos de la superficie de la de máquina de envasado de la Bolsa nº 1, superficie máquina de envasado de la Bolsa nº 2, superficie de la termoselladora, mesa de la termoselladora, mano de los operarios, platina del microscopio, cierre ventana interior/externo del prelaboratorio, saliva de machos, superficie de la zona de preparación del diluyente, superficie de la zona de recepción de los eyaculados, máquina de aire acondicionado, prepucio de los machos, potros de recogida seminal fijos y móviles, rejas, etcétera.
- Placas de ambiente en naves; laboratorio, prelaboratorio, vestuario y moscas.
- Agua del grifo.



Código muestra	Referencia Cliente	Parámetro	Resultado	Unidades	Metodología
1206259	2	Aerobios mesófilos	>300x10 <sup>2</sup>	ufc/ml	PT-MB-DS-01
1206260	4	Aerobios mesófilos	>300x10 <sup>2</sup>	ufc/ml	PT-MB-DS-01
1206261	6	Aerobios mesófilos	>300x10 <sup>2</sup>	ufc/ml	PT-MB-DS-01

Figura 4: Resultados de contaminación en las dosis seminales y la goma de envasado.

El análisis de contaminación en los envases fue negativo y en el resto de las muestras recogidas (hisopos, placas de ambiente y agua) la contaminación fue variable con aislamientos de agentes ubicuitarios que no tienen relevancia. Sin embargo, en las dosis enviadas, así como en la goma de envasado (Figura 4) se confirma la contaminación bacteriana mediante el aislamiento de *Serratia marcescens* multiresistente (Figura 5).

*Serratia marcescens*, es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (junto con *Klebsiella*, *Proteus* o *Escherichia*) ampliamente descrito en la bibliografía y relacionado con importantes infecciones de origen nosocomial en seres humanos. Con respecto al semen porcino, se ha observado su alta capacidad para crear biofilm en las superficies húmedas y deteriorar la célula espermática hasta el punto de causar la muerte de los espermatozoides en pocas horas.

Para la toma de muestras de dosis seminales, y para confirmar que el problema está en la goma de llenado del sistema de envasado que más se usa en centro, se envasan de forma manual dosis de 10 eyaculados de 30 ml con 3 ml de semen puro añadido en cada envase mediante una jeringuilla estéril por duplicado, y posteriormente se contrastan la mitad de las dosis seminales en el CIA y la otra mitad en nuestro laboratorio, donde se analiza la motilidad mediante sistema CASA a las 24 y a las 96 horas, no observándose diferencias de motilidad entre las dosis (Figura 6). En el CIA tampoco se aprecian diferencias.

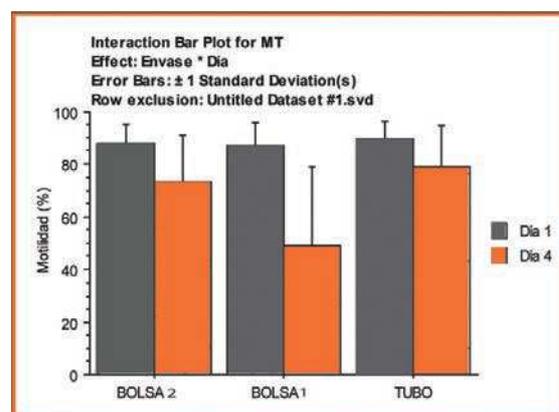


Figura 6. Motilidades a día 1 y 4 por tipo de envase.

Código muestra	Referencia Cliente	Parámetro	Resultado	Metodología	Valores referencia
1206259	2	Aislamiento + identificación	<i>Serratia marcescens</i>	PT-MB-DS-03	
		Antibiograma		PT-MB-DS-04	
		Espectrometría			
		Gentamicina	R		
		Colistina	R		
		Estreptomina	R		
		Neomicina	R		
		Apamcina	R		
		Ciprofloxacina	R		
		Amikacina	R		
		Kanamicina	I		
		Fosfomicina	R		
		Cefotaxim	R		
		Ertapenem	R		
		Penicilina	R		
		Amoxicilina Ac. Clavulánico	R		
1206260	4	Aislamiento + identificación	<i>Serratia marcescens</i>	PT-MB-DS-03	
		Antibiograma		PT-MB-DS-04	
		Espectrometría			
		Gentamicina	R		
		Colistina	R		
		Estreptomina	R		
		Neomicina	R		
		Apamcina	R		
		Ciprofloxacina	R		
		Amikacina	R		
		Kanamicina	I		
		Fosfomicina	R		
		Cefotaxim	R		
		Ertapenem	R		
		Penicilina	R		
		Amoxicilina Ac. Clavulánico	R		
1206261	6	Aislamiento + identificación	<i>Serratia marcescens</i>	PT-MB-DS-03	
		Antibiograma		PT-MB-DS-04	
		Espectrometría			
		Gentamicina	R		
		Colistina	R		
		Estreptomina	R		
		Neomicina	R		
		Apamcina	R		
		Ciprofloxacina	R		
		Amikacina	R		
		Kanamicina	I		
		Fosfomicina	R		
		Cefotaxim	R		
		Ertapenem	R		
		Penicilina	R		
		Amoxicilina Ac. Clavulánico	R		

Figura 5: Resultado de los aislamientos microbiológicos de las dosis seminales y de la goma de envasado.



## SOLUCIÓN APORTADA

Durante la búsqueda de la fuente de infección se procedió a instaurar un tratamiento específico mediante el cual el centro de inseminación fuese capaz de seguir trabajando a un ritmo normal produciendo dosis de calidad. Este tratamiento consistió de la utilización de un diluyente de recogida de semen para higienizar los eyaculados (Dicol®) extraídos, así como el uso de material desechable y el cambio de todas las gomas de los sistemas de envasado.

Dicol® se utiliza durante la fase de extracción (150 ml en el vaso de recogida) para conseguir mediante una mezcla registrada de antibióticos no espermicidas, la higienización del eyaculado y el control de la contaminación bacteriana, actuando sobre un amplio rango de gérmenes, entre las que se incluyen las más resistentes (*serratia spp*, *achromobacter spp*, *burkholderia cepacia*). Este efecto se consigue después 30 minutos en contacto con el producto, tiempo tras el cual ya se puede hacer la dilución final con el diluyente de rutina y la preparación de las dosis seminales.

Una vez descubierto que el problema era derivado de la limpieza inadecuada de las gomas que se usan para envasar, se procedió al diseño de medidas de limpieza y desinfección para combatir la contaminación bacteriana en el CIA, incluyendo protocolos específicos en corrales, potros de recogida seminal, laboratorio y equipos utilizados. Una vez implementadas todas estas medidas, la motilidad durante la conservación de las dosis volvió a valores normales y se pudo eliminar

del protocolo el uso del diluyente de recogida específico que se había estado utilizando mientras existía el problema de contaminación seminal.

## CONCLUSIONES

La goma del sistema de envasado fue el foco de contaminación por *Serratias* en este caso, lo que hizo que posteriormente a su contaminación, se disminuyera la durabilidad de los eyaculados que pasaban a través de ella durante el proceso de envasado.

*Serratia* es un patógeno primario para el semen de porcino que según autores está presente en el 10.3% de los aislamientos en semen porcino (Althouse y Lu, 2005) o en el 12.55% (Luis et al., 2013) y de gran importancia debido a su multiresistencia. La principal fuente de *Serratias* parece ser el verraco a pesar de que no hemos sido capaces de aislarla ni en prepucio ni en semen puro. Además, *Serratia* es un agente que contamina con facilidad los sistemas de conducción y es resistente a los sistemas "habituales" de limpieza y desinfección aplicados de rutina en los centros de inseminación, con lo que crea biofilms en superficies húmedas de difícil acceso pudiendo sobrevivir pese a las medidas de limpieza que estén instauradas en el centro.

Un estricto control de limpieza y desinfección, así como un control de calidad interno capaz de detectar ligeros cambios en el comportamiento de las dosis producidas es determinante para ser capaces de detectar el problema antes de que las dosis seminales sean utilizadas en granja. 📌

## Referencias bibliográficas

- Althouse GC, Lu KG (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63: 573-84.
- Luis J, Ausejo R, Dahmani Y, Falceto MV, Usan A, Malo C, Pérez-

Martínez FC (2013). Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*, 80: 565-70.