Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 53-56 (2019)

ANÀLISI DELS PUNTS CRÍTICS DE CONTAMINACIÓ BACTERIANA DURANT EL PROCÉS DE CRIOPRESERVACIÓ I DESCONGELACIÓ DEL SEMEN DE PORCÍ

Eva Bussalleu[1*], M. Dolors Briz[1], Marta Ribera[1], Isabel Casas[1], Sergi Bonet[1]

[1]Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Departament de Biologia, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, 17003 Girona, Catalunya.

eva.bussalleu@udg.edu; mailo.briz@udg.edu; martaribera9@gmail.com; isabel.casas@udg.edu; sergi.bonet@udg.edu

Resum

En la indústria porcina, la creació de bancs de germoplasma és molt important mantenir línies genètiques d'interès. El procés de criopreservació no és estèril i, tot i que podria semblar que les baixes temperatures representen una barrera per a la supervivència bacteriana, hi ha microorganismes que aconsegueixen sobreviure. En aquest estudi es va avaluar la presència de bacteris en el semen abans i després dels processos de congelació i descongelació i es van identificar els principals punts de contaminació. Es van prendre mostres de medis, diluents, aparells, superfícies i del personal i es van identificar els gèneres i espècies bacterians presents a cada lloc. Els resultats mostraren que el principal focus de contaminació durant el procés de criopreservacio/descongelació és el personal que manipula les mostres. Algunes de les espècies identificades s'han aïllat també en el semen descongelat, podent ser causa d'un descens de la qualitat espermàtica. En conclusió, cal extremar les mesures higièniques en tots els passos del procés de criopreservació del semen de porcí per evitar o almenys minimitzar la bacteriospèrmia.

Paraules clau: criopreservació, bacteriospèrmia, germoplasma, semen porcí.

Abstract

In swine industry, the creation of banked germplasm is very important to maintain genetic lines of interest. The cryopreservation process is not sterile and, although it may seem that low temperatures constitute a barrier to bacterial survival, certain microorganisms manage to survive. In this study, the presence of bacteria in semen before and after the freezing and thawing processes was evaluated and the main points of contamination were identified. Samples of media and extenders, devices, equipment and personnel were taken and the genera and bacterial species present in each site were identified. Results showed that the main focus of contamination during the cryopreservation/thawing process is the personnel that manipulates the samples. Some of the identified species have also been isolated in the thawed semen and may cause a decrease in sperm quality. In conclusion, the use of strict hygiene measures must be implemented in all the steps of the cryopreservation process of boar semen to prevent or, at least, minimize bacteriospermia.

Key words: cryopreservation, bacteriospermia, germplasm, boar semen.

INTRODUCCIÓ

La bacteriospèrmia, o més recentment bacteriosemina, es defineix com la presència de bacteris en semen. S'ha descrit que produeix un descens important de la qualitat espermàtica, així com alteracions en la capacitat fecundant dels espermatozoides i baixes taxes de fertilitat comportant, en global, un descens del rendiment reproductiu en les granges (Maes *et al.*, 2008). Són diverses les causes de la bacteriospèrmia i tradicionalment es classifiquen en causes d'origen animal i d'origen no-animal (Althouse i Lu, 2005; Althouse, 2008).

En reproducció porcina té molta importància l'establiment de bancs de germoplasma per tal de mantenir línies genètiques d'interès productiu. El procés de criopreservació no és un procés exempt de contaminació microbiana, ja que no es realitza en condicions d'esterilitat. De totes maneres, cal remarcar que malgrat que les baixes temperatures afecten la viabilitat microbiana, hi ha espècies que sobreviuen al procés i fins i tot es parla d'una microflora associada al procés de congelació del germoplasma (Bielanski, 2012).

Alguns estudis han descrit en boví la presència d' *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* en mostres d'espermatozoides criopreservats, i podrien ser susceptibles de ser transmesos durant la inseminació artificial (Silveria Prado i Machado Pérez, 2005).

L'objectiu d'aquest treball és identificar quins són els potencials focus de contaminació durant el procés de criopreservació/descongelació de semen de porcí i identificar les espècies bacterianes implicades.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi es van congelar tres ejaculacions de mascles reproductors porcins postpuberals sans de la raça Piétrain (GePork, Roda de Ter, Catalunya). Per a la congelació de les ejaculacions es va seguir el mètode Hülsenberger, descrit originalment per Westendorf i col·laboradors (1975), en el qual els espermatozoides són lentament refredats en un medi crioprotector i, posteriorment, envasats en palletes de 0,5 cc. Durant tot el procés de criopreservació i descongelació, només en el procés de congelació o només en el procés de descongelació, es van recollir mostres d'estris, recipients, diluents i també de les persones que van manipular les mostres durant el procés. Concretament en el procés de congelació i descongelació (CD) es van prendre mostres de semen, puntes de micropipetes, micropipetes, exterior de la palleta, nitrogen líquid, tanc de nitrogen i braços, cara, cabells i guants de les tres persones que van manipular les mostres al laboratori. Pel que fa a la congelació (C) es van mostrejar els tubs de centrifugació, la vitrina de refrigeració, el carregador semiautomàtic de palletes, el medi crioprotector LEY, el medi crioprotector amb glicerol LEYGO i el biocongelador. Els punts de mostreig durant el procés de descongelació (D) van ser l'interior de la palleta, el diluent de descongelació ACTE, l'aigua del bany de descongelació i les pinces per agafar les palletes.

En el cas de les substàncies líquides (semen, medis, diluent i aigua del bany) se sembraven 100 µl directament, mentre que en el cas de material o superfícies sòlides, s'usaven escovillons estèrils amb solució de Ringer.

Les mostres se sembraren en dues plaques de medi LB (Conda Pronadisa, Madrid, Espanya) i s'incubava una placa en condicions anaeròbies i una altra en aeròbies a 37ºC durant 72h. Les plaques s'analitzaren diàriament i a les 72h es van aïllar totes les colònies crescudes per a la posterior identificació.

Es va fer una extracció de DNA de les colònies aïllades mitjançant l'aparell QiaCube (Qiagen, Madrid, Espanya) utilitzant el kit "Blood and Tissue DNA extraction" (Qiagen, Madrid, Espanya), es va procedir a l'amplificació del DNA amb una PCR convencional usant els encebadors 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) i 1492r ((5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Frank *et al.*, 2008) amb el kit "MyTaqMix 2x" (Bioline, Londres, Regne Unit). Es van purificar els productes de PCR, de nou amb el robot QiaCube i usant el kit "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, Madrid, Espanya). Finalment, les mostres purificades es van enviar a seqüenciar a l'empresa Macrogen (Amsterdam, Holanda).

RESULTATS

Els resultats indiquen que hi havia menys càrrega bacteriana durant el procés de criopreservació que després del procés de descongelació, essent també diferents les espècies identificades en els dos casos. De mitjana, durant el procés de criopreservació es van identificar tres colònies, mentre que en la descongelació, aquest valor es va duplicar. A la taula 1 es detalla el percentatge de bacteris aïllats durant els processos de congelació i descongelació, respectivament.

Durant el procés de congelació es va recomptar una mitjana de 24 UFC/ml, pertanyents a més de 14 gèneres i espècies diferents; algunes de les colònies aïllades, però, no van poder ser identificades. En el procés de descongelació la mitjana de UFC/ml fou de 34, de les quals se'n va poder identificar 24.

Les espècies i gèneres identificats durant el procés de criopreservació (excloent el semen) foren *Staphylococcus* spp., *S.hominis*, *S. equorum*, *S. pasteuri*, *Kocuria marina*, *Kocuria rhizophila*, *Proteus* spp., *Proteus mirabilis*, *Psychrobacter faecalis*, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus fascians*, *Achromobacter spiritinus*, *Arthrobacter gandavensis*, *Stentotrophomonas spp*.

En el semen abans de congelar s'hi van identificar *Proteus* spp., *Proteus penneri*, *Proteus mirabilis*, *Microbacterium aerolatum*, *Ralstonia* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter* spp., i *Pectobacterium carotovorum* i una colònia no identificada.

En el procés de descongelació, es van identificar *Proteus* spp., *Proteus penneri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus* spp., *S. hominis*, *S. warneri*, *S. equorum*, *S. capitis*, *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter gandavensis*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus* spp, *Terribacillus aidingensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia insidiosa*, *Rhodococcus fascians*, *Kocuria* spp., *Roseomonas massiliae*, *Janibacter* spp. i *Burkholderia multivorans*.

Pel que fa als gèneres i espècies identificats en el semen descongelat, foren *Microbacterium* spp., *Microbacterium aerolatum*, *Staphylococcus* spp., *S. hominis* *S. pasteuri*, *Arhtrobacter gandavensis*, *Sporosarcina ureae*, *Ralstonia* spp., *Corynebacterium stationis*, *Burkholderia* cepacia, *Alcaligenes faecalis*, *Acientobacter* spp. i *Terribacillus aidingensis* i 3 UFC no identificades.

Taula 1. Percentatge d'UFC/ml aïllats en els diferents punts de mostreig durant els processos de congelació i descongelació d'ejaculacions de porcí.

Lloc de mostreig	Percentatge (%) UFC/ml	
	Congelació	Descongelació
Biocongelador	0	-
Carregador de palletes	17	-
Campana freda	6	-
Medi LEYGO	8	-
Medi LEY	8	-
Puntes de micropipeta	0	-
Micropipetes	0	-
Falcons	8	-
Recipient inicial on es diposita el semen	2	-
Recipient per carregar palletes	0	-
Cabells	10	18
Cara	13	16
Guants	8	13
Braços	8	16
Tanc de nitrogen	12	9
Exterior de la palleta	0	8
Nitrogen líquid	2	1
Interior de la palleta	-	8
Pinces	-	4
Bany	-	5
Diluent ACTE	-	2

DISCUSSIÓ

Les ejaculacions de mascles porcins sans no solen estar contaminades, sinó que la contaminació s'adquireix durant la manipulació del semen, que inclou l'extracció, el processament i l'emmagatzematge (Kuster i Althouse, 2016). La criopreservació, en tant que requereix manipulació de les ejaculacions, és un procés molt susceptible de patir contaminacions microbianes. Tot i que podria semblar que les baixes temperatures disminueixen la supervivència bacteriana, s'ha descrit que els bacteris són més criotolerants que els espermatozoides (Althouse, 2008).

En el cas de les espècies o gèneres bacterians que es van aïllar tan abans com després de la criopreservació i que, per tant, serien criotolerants, s'hi troben *Microbacterium aerolatum, Ralstonia* spp., *Acinetobacter* spp. i *Alcaligenes faecalis*. D'altra banda, hi ha altres gèneres i espècies que només es troben abans de la criopreservació, i que, per tant, serien susceptibles al procés, mentre que d'altres només s'identifiquen en el semen una vegada descongelat; en el cas del semen descongelat s'hi va trobar per exemple *Staphylococcus pasteuri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus* spp., *Arthrodobacter gandavensis*, *Sporosarcina ureae*, *Corynebacterium stationis*, *Burkholderia cepacia*, *Microbacterium* spp. i *Terribacillus aidingensis*.

Alguns dels bacteris aïllats del semen només després de la congelació, però no abans, també es van identificar en altres punts de mostreig durant els processos de congelació/descongelació. És el cas de *Staphylococcus pasteuri* (aïllat de la vitrina de refrigeració), *Staphylococcus hominis* (de la cara, braços i guants del personal, així com de l'exterior de la palleta, dels tubs de centrifugació, del carregador de palletes i del tanc de nitrogen), *Staphylococcus* spp. (de cabells, braços, guants i cara de les investigadores, de la vitrina de refrigeració, del carregador de palletes i del tanc de nitrogen), *Ralstonia* spp. (del diluent ACTE), *Acinetobacter* spp. (del cabells i braços de les investigadores i del tanc de nitrogen) i *Terribacillus aidingensis* (del medi LEY).

Els bacteris aïllats únicament en el semen descongelat i que no s'hi trobaven inicialment , indiquen que aquest procés no és estèril i que els processos de congelació i descongelació tenen diferents punts de contaminació. Un dels principals focus són les persones que manipulen les mostres, així com els medis de congelació o de descongelació, el material fungible i els aparells emprats. També cal destacar que els tancs dispensadors de nitrogen, així com el d'emmagatzematge, no són llocs estèrils malgrat les baixes temperatures.

Molts gèneres bacterians s'ha demostrat que poden sobreviure a baixes temperatures (inclús a -196ºC, en nitrogen líquid), ja que tenen gran tolerància al procés de congelació i a concentracions elevades de crioprotectors com ara el glicerol (emprat en aquest estudi) (Bielanski, 2012). A més, tot i la presència d'antibiòtics con la kanamicina en els medis que s'usen per a la criopreservació, els bacteris són capaços de sobreviure. Un motiu que ho podria explicar, a part de possibles resistències, seria el fet que el glicerol s'ha demostrat que interfereix en les propietats antimicrobianes de les ejaculacions i, per tant, és més aconsellable afegir els antibiòtics en les ejaculacions un cop extretes que no pas en els medis de criopreservació (Bielanski, 2007).

Un altre factor que explicaria la resistència bacteriana al procés de congelació i descongelació és que els components dels diluents de criopreservació (per exemple l'albúmina, la sacarosa, el sorbitol o altres sucres) poder actuar com a estabilitzants dels bacteris a temperatures de congelació; això sumat al fet que aquests components poden afavorir el creixement dels bacteris i que les baixes temperatures també poden reduir l'activitat antimicrobiana d'alguns antibiòtics, fa que la criopreservació sigui un procés que no solucioni el problema de la bacteriospèrmia, sinó tot el contrari (Bielanski, 2012; Úbeda *et al.*, 2013).

En aquest treball s'ha determinat que aproximadament un 51% de la contaminació prové del personal que manipula les mostres, concordant amb els estudis de Bielanski (2012). Tal i com s'ha observat, alguns bacteris no sobreviuen a tot el procés, però d'altres sí, i conseqüentment, la seva presència pot alterar la qualitat espermàtica del semen criopreservat. Un exemple és el gènere *Staphylococcus* spp, que s'ha demostrat que pot minvar significativament la qualitat espermàtica (Esmailkhani *et al.*, 2018).

A més del personal, també s'ha constatat que la contaminació pot provenir dels medis o de les superfícies, i fins i tot dels tancs de nitrogen líquid o del propi nitrogen líquid. El nitrogen líquid es fabrica a partir d'un procés de liqüefacció i posterior destil·lació i els fabricants no solen aportar dades sobre la contaminació microbiana. Seria convenient que es pogués esterilitzar el nitrogen líquid mitjançant filtració o amb llum UV, però hi ha l'inconvenient que filtrar o irradiar grans volums de nitrogen líquid no és pràctic (Vatja *et al.*, 1998, Bielanski, 2012), i a banda, l'esterilització del nitrogen exigiria treballar en condicions estèrils, fet inviable a escala industrial pels elevats costos econòmics i de temps que requeriria.

Tot i que sembla que hi ha una microflora associada al germoplasma criopreservat (Bielanski *et al.*, 2003), en porcí no s'havia descrit fins ara quins serien els gèneres i espècies bacterians que en formarien part. De totes maneres, en equí i boví sí que existeixen estudis que ho descriuen. En el cas del boví, després del procés de congelació i descongelació es van aïllar *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus sciuri*, *Actinobacter cacloaceticus*, *Pantoeau agglomerans* i *Flavobacterium* spp (Zampieri *et al.*, 2013). En equí es va detectar *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* i bacteris anaeròbics com *Propionibacterium granulosum* o *Clostridium* spp. (Corona i Cherci, 2009).

Cal destacar que tant en els estudis de boví i equí, com en el present de porcí, han quedat colònies sense identificar. Alguns d'aquests gèneres o espècies també s'han trobat en alguns punts de mostreig d' aquest treball, tot i que només el gènere *Staphylococcus* spp. s'ha acabat aïllant en semen descongelat.

En conclusió, la criopreservació i descongelació de semen de porcí són processos amb punts crítics de contaminació que poden derivar en bacteriospèrmia en les ejaculacions descongelades i conseqüentment, generar un baix rendiment reproductiu. La contaminació prové sobretot de les persones que participen en el procés, però també dels aparells o medis, i fins i tot, del nitrogen líquid. Per aquest motiu, es recomana usar sempre que es pugui material d'un sol ús, netejar encara més acuradament els aparells i superfícies, filtrar, si és possible, els medis i diluents i seguir estrictament el manual de bones pràctiques al laboratori per minimitzar la contaminació bacteriana durant el procés de congelació i descongelació de semen de porcí.

REFERÈNCIES

ALTHOUSE, G.C. (2008). «Sanitary procedures for the production of extended semen». *Theriogenology*, vol. 43, supl. 2, p. 374-378.

ALTHOUSE, G.C; Lu, K.G. (2005). «Bacteriospermia in extended porcine semen». *Theriogenology*, vol. 63, núm. 2, p. 573-584.

BIELANSKI, A. (2012). «A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices». *Theriogenology*, vol. 77, núm. 3, p. 467-482.

BIELANSKI, A. (2007). «Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals». *Theriogenology*, vol. 68, núm. 1, p. 1-22.

BIELANSKI, A. [et *al.*] (2003). «Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen». *Criobiology*, vol. 46, núm. 2, p. 146-152.

CORONA, A.; Cherchi, R. (2009). «Microbial quality of equine frozen semen». *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 115, núm. 1-4, p. 103-109.

ESMAILKHANI, A. [et *al.*] (2018). «Assessing the prevalence of Stahpylococcus aureus in infertile male patients in Tabriz, northwest Iran». *Int. J. Reprod. Biomed.*, vol.16, núm. 7, p. 469-474.

FRANK, J.A. [et *al.*] (2008). « Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.74, núm. 8, p. 2461-2470.

KUSTER, C.E.; Althouse, G.C. (2016). «The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance». *Theriogenology*, vol. 85, núm. 1, p. 21-26.

MAES, D [et *al.*] (2008). «Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview». *Theriogenology*, vol. 70, núm.8, p.1337-1345.

SILVEIRA PRADO, E.; MACHADO PÉREZ, R. (2005). «Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación». *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.*, vol. VI, núm. 10, p. 1-8.

ÚBEDA, J.L. [et *al.*] (2013). «Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality». *Theriogenology*, vol. 80, núm. 6, p. 565-570.

VAJTA, G. [et *al.*] (1998). «Sterile application of the Open Pulled Straw (OPS) verification method». *Cryo-Letters*, vol. 19, núm. 6, p. 389-392.

WESTENDORF, P. [et *al.*] (1974). «Zur Tierfgefrierung von Ebersperma: Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberg Pailleten Verfharen». *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift.*, vol. 82, p. 261-267.

ZAMPIERI, D. [et *al.*] (2013). «Microorganisms in cryopreserved semen and culutre media in the in vitro production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectometry (MALDI-MS)». *Theriogenology*, vol. 80, núm. 4, p. 337-345.