

EFFECTO INHIBIDOR DE LA PENICILINA Y ESTREPTOMICINA SOBRE LA PROLIFERACION BACTERIANA DE SEMEN PORCINO DILUIDO EN BTS, ALMACENADO DURANTE TRES DIAS.

Toledo, C.A., Becerril, A.J., Soto, F.M.A., Díaz, R.C., Jiménez, G.E.A., Navarro, F.R.

1. Universidad Nacional Autónoma de México, 2. Granja Experimental Porcina Zapotitlán, FMVZ-UNAM, 3. Laboratorio de Diagnóstico del Depto. de Producción Animal: - Cerdos, FMVZ-UNAM, México, D.F.

#### INTRODUCCION

En los últimos años ha aumentado gradualmente el uso de la Inseminación Artificial (IA) en el cerdo, como una alternativa para solucionar problemas de tipo económico (10). En el presente, ofrece posibilidades considerables de desarrollo, por tal motivo se han desarrollado pruebas que permiten valorar la calidad y fertilidad del semen con objeto de preservarlo sin reducir su fertilidad (4).

Se ha demostrado que su conservación está limitada por un crecimiento bacteriano durante su almacenamiento a 15°C (6, 8 y 9). Avances recientes en la calidad de los diluyentes permiten incrementar el período de almacenamiento, ampliando el posible rendimiento de cada eyaculado de verracos seleccionados (5). La conservación sería mejor si la proliferación bacteriana pudiera controlarse, evitando sus efectos adversos en la sobrevivencia espermática (9). Requiriendo técnicas adecuadas para la preservación de semen buscando la mínima cantidad de espermatozoides por dosis para una fertilidad máxima (7).

#### OBJETIVO

Evaluar el efecto inhibidor de la penicilina y estreptomycinina sobre la proliferación bacteriana de semen porcino diluido en BTS, almacenado de 15 a 18°C durante tres días.

#### MATERIAL Y METODOS

El muestreo de este trabajo se realizó en la Granja Experimental Porcina Zapotitlán FMVZ-UNAM. El estudio bacteriológico se efectuó en el Laboratorio de Diagnóstico del Depto. de Producción Animal: Cerdos, FMVZ-UNAM.

Se utilizaron diez sementales de diferentes edades: Duroc, Hampshire, Landrace, Yorkshire e híbridos, pertenecientes al programa de IA. Colectándose tres eyaculados de cada semental, habiendo un total de 30 muestras trabajadas. Se preparó la solución Betsville Thawing Solution (BTS) con agua bidestilada con y sin antibióticos, utilizando 500 000 UI. de penicilina y 500 mg de estreptomycinina por litro. En los cultivos bacteriológicos se empleó gelosa sangre, agar selectivo para estreptococos y agar Mac-Conkey para germen gram negativos.

Del volumen total de eyaculado de cada animal se tomaron 5 ml sin diluir, se sembraron en gelosa sangre y en Mac-Conkey. Del semen diluido con y sin antibióticos se hicieron diluciones decimales en solución salina fisiológica hasta  $10^8$  para sembrar en gelosa sangre, agar selectivo para estreptococos y agar Mac-Conkey para bacterias Gram (-).

#### RESULTADOS

En el presente trabajo realizado las bacterias identificadas en el semen diluido fueron: Bacillus spp., Citrobacter freundii, Klebsiella spp., Micrococcus spp., Proteus mirabilis, Pseudomonas spp., Serratia rubidaea, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter aerogenes. Se identificaron en los diferentes tiempos de sembrado en las muestras con y sin antibiótico sin una tendencia a cambiar entre grupos o entre tiempos.

Los resultados globales indican una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano al usar el antibiótico ( $P < 0.01$ ). En promedio hubo 3.10 colonias bacterianas por mililitro de semen sin el uso de antibiótico y 0.01 colonias por mililitro al aplicar antibiótico.

La diferencia entre las horas de almacenamiento (0, 24 y 72 hs) fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ), mientras más tiempo duró almacenado el semen, el crecimiento bacteriano fué mayor, aún utilizando antibiótico ( $P < 0.01$ ).

El análisis estadístico indicó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la tasa de crecimiento con y sin el uso de antibiótico, indicando claramente una proliferación bacteriana más acelerada cuando no se utilizó antibiótico. Aunque a las 72 hs, la contaminación bacteriana con el uso del antibiótico también fué alta, hay una diferencia muy marcada con respecto a las muestras sin antibiótico, es decir, no sólo hubo menos contaminación con el antibiótico sino que el crecimiento del número de bacterias con el transcurso del tiempo también fué menor (cuadro 1).

CUADRO 1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS\* A DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO EN EL SEMEN CON Y SIN ANTIBIOTICOS

	H	O	R	A	S
Semen diluido	0		24		72
Sin antibiótico	0.015*		0.896		125.211
Con antibiótico	0.0003		0.002		0.677

\* Unidades formadoras de colonias por ml de semen.

La cantidad de contaminación que presentó cada una de las bacterias en forma global con y sin el uso de antibiotico se muestra en el (cuadro 2).

CUADRO 2. CRECIMIENTO PROMEDIO EN CADA ESPECIE DE LAS BACTERIAS IDENTIFICADAS

Tipo de Bacteria	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Con antibiótico		Sin antibiótico	
<u>Bacillus</u> spp.	3.5481		$0.1 \times 10^{-8}$	
<u>Citrobacter</u> Freundii	2.5		$0.05 \times 10^{-8}$	
<u>Klebsiella</u> spp.	$0.000002 \times 10^{-8}$		1.7	
<u>Micrococcus</u> spp.	$2.9 \times 10^{-8}$		$11.0 \times 10^{-8}$	
<u>Proteus</u> mirabilis	$0.000007 \times 10^{-8}$		1.1	
<u>Pseudomona</u> spp.	$2.3988 \times 10^{-8}$		1.1749	
<u>Serratia</u> Rubidaea	52.4807		131.8	
<u>Staphylococcus</u> spp.	3.1623		4.1	
<u>Interobacter</u> aerogenes	0.4		0.1	

NOTA: Unidades formadoras de colonias expresadas en forma directa ó en millones (  $\times 10^{-8}$  ).

## DISCUSION

En este estudio, todas las muestras de semen evaluadas produjeron colonias bacterianas por lo menos en alguno de los grupos en algun tiempo de cultivo ya fuera usando o no antibiótico. El conteo de bacterias, fluctuó entre 0 y 1600, con media de 1.98 este valor es comparable en el resultado de los trabajos realizados por Waltz et al. (11) y Sone et al. (8).

La proporción de bacterias, siempre fue menor con el uso de antibiótico, determinando que los antibióticos utilizados fueron efectivos. Los tipos de bacterias aisladas en este trabajo llevado a cabo corresponden a los mismos generos mencionados por Niwa, Koppang y Filseth, Rahman y Tamuli siendo la mayoría de las bacterias Gram (-).

Mizuho et al. (3), concluyo que la estreptomocina y penicilina daban los mejores resultados en el control de microorganismos en el semen diluido de cerdos. Comparado con el experimento de Lingam y Cambell (2) observaron sensibilidad de la penicilina donde las bacterias fueron resistentes a esta.

Los resultados obtenidos del trabajo efectuado no concuerdan con los datos encontrados por Rillo et al. (6), Tamuli et al. (9), Bamba y Sone (1), ya que estos encontraron que la penicilina G sodica y estreptomocina actuando por separado o no, cuando son usados en los diluyentes para IA tienen muy poca eficacia sobre el control bacteriano encontrando un 80% de no sensibilidad de las bacterias a estos antibióticos.

Si las muestras no estan contaminadas antes de diluir es nula la contaminación una vez ya diluido, lo que da como diferencia los resultados obtenidos en relación a la eficiencia del antibiótico con las que si presentaban contaminación antes de su dilución y lo que da pauta para definir que la mayor cantidad de contaminación bacteriana proviene en el momento que se proceda a la colección espermática, aumentando de manera considerable de no tomar consideraciones como lo es el no exprimir los diverticulos prepuciales de manera correcta, evitando se mezcle con el eyaculado (8). Este punto es de radical importancia ya que estos contienen orina, esmegma y destritos celulares ya establecidos con anterioridad por Sone et al. (5), encontrandose 500 a 1,000.000.00 de bacterias por ml y tambien determinaron diferencias de bacterias presentes en el divertículo prepucial.

Otro factor es evitar que el corral de colección se encuentre en mal estado, no permitiendo el polvo y las impurezas del potrero de montas como residuos de lodo y excremento, entre otros. Y verificar que las manos antes de proceder a la colección se encuentren limpias.

No debemos excluir el manejo del semen en el laboratorio para su procesamiento posterior a la colección, porque existió contaminación en muchas de las muestras aunque antes de diluir no se manifestara y que seguramente se contaminaron en el momento de la dilución espermática y envasado de las dosis de semen. Es indispensable que todo el material para su preparación sea estéril o bien tratar de que esté lo mas limpio posible, los diluyentes se preparen asepticamente y se almacenen en forma adecuada.

Dado que en condiciones de campo es casi imposible evitar la contaminación bacteriana de semen de verraco para la IA, y con el abuso de nuevos antibióticos se considera que las bacterias rapidamente pueden hacerse resistentes a ellos y subsecuentemente la resistencia puede ser transmitida a otras bacterias (8), de tal forma es necesario poner más atención a los aspectos señalados para disminuir las probabilidades de que las bacterias desarrollen resistencia a los antibióticos. Así como disminuir efectos dañinos en los espermatozoides (9). Por lo tanto uno de los avances en el problema puede ser la detección en la combinación efectiva de los antibióticos mas usados (8).

Logrando de esta forma una mayor conservación espermática en el semen diluido para Inseminación Artificial, y en consecuencia, mejores tasas de fertilidad.

## LITERATURA CITADA

1. Bamba, K. and Sone, M.: Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. J. of Reprod. and Fertility, 62, 193 (1981).
2. Lingam, S.A. and Campbell, E. A.: Artificial insemination of pigs in Australia - II. Handling and preservation of semen. Australian Vet. J. 41: 151 (1975).
3. Mizuho, A., Niwa, T. and Soejima, A.: Basic studies on the preservation of semen of farm animals. III, the effect of some diluents or antibacterial agents on the metabolism of spermatozoa in boar semen. Bul Nat. Inst. of An. Industry. Ministry of Agriculture and Forestry. Chiba City, Japan. No. 1. (1973).
4. Paquignon, M. and Courot, M.: Advances in boar semen preservation technology in France. Pig News inf., 2: 397-400 (1981).
5. Pérez, L.G., Lozano C.J.J. and Sánchez, S.R.: Fertility results in swine using - the sperm's diluents MR-A y Zorlesco in the long storage period at 15°C. Proceedings of the 8th I.P.V.S. Congress. Ghent, Belgium. 1984. 294 Internacional Pig Veterinary Society. Ghent, Belgium (1984).
6. Rillo, S.M., Sebastián, J.J., Alias, E. and Díaz, Y.C.: The effects of antibiotic associations in the conservation of boar semen at 15°C. Proceedings of the - 8 th I.P.V.S. Congress. Ghent, Belgium. 1984. 295. Internacional Pig Veterinary Society. Ghent, Belgium (1984).
7. Saacke, R.G.: Semen quality in relation to semen preservation. J. Dairy Sci., 66: 2635-44 (1983).
8. Sone, M., Ohmura, K. and Bamba, K.: Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. Vet. Rec., 111: 11-14 (1982).
9. Tamuli, M.K., Sharma, D.K. and Rajkumar, C.K.: Studies on the microbial flora of boar semen. Ind. Vet. J., 61: 858-861 (1984).
10. Villamil, F.: Manejo del verraco para la inseminación artificial: Estudio recapitulativo. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1987.
11. Waltz, F.A., Foley, C.W., Herschler, R.C., Tiffany, L.W. and Liska, B.J.: Bacteriological studies of boar semen. J. Anim. Sci., 27: 1357-1362 (1968).