

Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilina-estreptomycin en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas (Durability of the effectiveness of the penicillin-streptomycin combination in the reduction of the bacterial content of frozen bulls semen in concentrated pellet form)

Luis O. Alba Gómez¹ y Enrique A. Silveira Prado² (1) Médico Veterinario. Profesor Titular. PhD. Departamento Agropecuario. Centro Universitario de Sancti Spiritus. Cuba. (2) Médico Veterinario. Profesor Consultante. Dpto. de Registros de Medicamentos y Ensayos Clínicos. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba.

Contacto: esilveira@cbq.uclv.edu.cu y esilveira@comunidad.veterinaria.org

RESUMEN

Se investigaron por bacteriología general 206 muestras de semen fresco, 133 de semen diluido y congelado en forma de pastillas con adición de penicilina-estreptomycin y 33 sin antibióticos, de diferentes toros de inseminación artificial clínicamente sanos. El resumen de los aislamientos agrupados según las especies bacterianas reveló que las especies más frecuentemente aisladas en muestras de semen fresco fueron *E. coli* (50,6%), otras enterobacterias (27,7%), *Staphylococcus coag. neg.* (26,2%) y *S. aureus* (17,5%). En el semen congelado sin antibióticos y congelado con antibióticos estas bacterias fueron igualmente las predominantes. Se observó disminución de la frecuencia de aislamientos en las muestras de semen congelado sin antibióticos (78,8%) que se hizo más notable en las muestras con antibióticos (18,8%), diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). El 89,5% del semen congelado con antibióticos se mantuvo por debajo de las 500 UFC/mL, límite establecido por muchos países como admisible para su utilización en los intercambios internacionales. Se concluye que la adición de la combinación penicilina-estreptomycin continua siendo efectiva en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro procesado para congelar.

Palabras claves: Inseminación artificial. Bovinos. Semen fresco. Semen congelado. Flora bacteriana. Antibióticos. Penicilina. Estreptomycin.

Abstract

For this work 206 samples of fresh semen were investigated bacteriologically, 133 of diluted semen and frozen in form of pills with penicillin-streptomycin addition and 33 without antibiotics, of different bulls of artificial insemination clinically healthy. The summary of isolations grouped according to the bacterial species revealed that the most frequently isolated species in samples of fresh semen were *E. coli* (50,6%), other enterobacterias

(27,7%), *Staphylococcus coag. neg.* (26,2%) and *S. aureus* (17,5%). In frozen semen without antibiotics and frozen with antibiotics these bacterias were equally the predominant ones. A decrease of the frequency of isolations was observed in the samples of frozen semen without antibiotics (78,8%) that became more remarkable in the samples with antibiotics (18,8%), statistically significant difference ($p < 0,01$). The 89.5% of frozen semen with antibiotics stayed below the 500 CFU/MI, limit settled down by many countries like acceptable for its use in the international exchanges. It was concluded that the combination of penicillin-streptomycin remained effective in the reduction of the bacterial content of the bull semen processed for freezing.

Key words: Artificial insemination. Bovine. Fresh semen. Frozen semen. Bacterial flora. Antibiotics. Penicillin. Streptomycin.

INTRODUCCIÓN

A pesar de las medidas higiénicas que se toman en los centros de inseminación artificial para la manipulación y preparación del semen, en éste pueden encontrarse especies bacterianas saprofitas, con mayor frecuencia, pero también pueden estar presentes algunas especies patógenas, capaces de participar desfavorablemente en su conservación.^[1-4]

Para inhibir el crecimiento bacteriano se les ha añadido a los menstros sulfamidas o antibióticos. En 1948 Foote y Salisbury^[5] demostraron que la penicilina disminuía notablemente el consumo de glucosa y de oxígeno por parte del nemaspermo y reducía el crecimiento bacteriano. Almquist et al. en 1949,^[6] comprobaron que la utilización simultánea de penicilina y estreptomicina, tenían una actividad antibacteriana más eficaz con disminución del efecto tóxico. A partir de esos descubrimientos, estos antibióticos se comenzaron a utilizar ampliamente en la mayor parte de los centros de extracción y procesamiento de semen bovino del mundo, tanto en los medios de dilución ordinarios como en los especiales para la congelación.

A pesar de la existencia de nuevos y potentes antibióticos de síntesis y de la posible aparición de antibiótico-resistencia de algunos microorganismos ambientales, en Cuba, desde 1965 se ha venido utilizando la combinación penicilina-estreptomicina añadida al medio de dilución de Nagase y Niwa^[7] para la congelación ultrarrápida del semen bovino en pastillas, sin que aparentemente se halla producido una disminución de la efectividad antimicrobiana de los mismos. El objetivo de este trabajo fue el de verificar la perdurabilidad de ese comportamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestras

Se investigaron bacteriológicamente 206 muestras de semen puro extraído con vagina artificial a diferentes toros (Holstein, Brown Swiss y mestizos $\frac{5}{8}$ Holstein x $\frac{3}{8}$ Cebú), 133 muestras de semen diluido y congelado en forma de pastillas con adición de antibióticos y 33 sin antibióticos.

Medio de dilución y antibióticos

Se utilizó el menstuo lactosa-yema-glicerina con adición de 1 000 UI de penicilina G potásica y 500 µg de dihidroestreptomicina/mL.^[8]

Examen microbiológico

Las muestras fueron investigadas bacteriológicamente según la metodología establecida para los Centros de Inseminación Artificial de Cuba.^[8]

Higiene y desinfección

Para la limpieza y desinfección de las instalaciones, animales, equipos y áreas de laboratorio, se procedió según los requisitos sanitarios internos para los Centros de Inseminación Artificial de Cuba.^[8]

Procesamiento estadístico

Los datos primarios se ordenaron y tabularon calculándose los porcentajes correspondientes. Para su análisis se utilizó la prueba de comparación entre dos proporciones muestrales, según la distribución Z de Gauss para muestras pequeñas.^[9]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La totalidad de las muestras de semen fresco sin diluir fueron positivas a las investigaciones bacteriológicas, aislándose gérmenes que forman parte de la microflora prepucial de los toros. Se observó disminución de la frecuencia de aislamientos en las muestras de semen congelado sin antibióticos (78,8%) que se hizo más notable en las muestras con antibióticos (18,8%), diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) (Tablas 1 y 2).

La caracterización de los aislamientos agrupados según las especies bacterianas reveló que las especies más frecuentemente aisladas en muestras de semen fresco fueron *E. coli* (50,6%), otras enterobacterias (27,7%), *Staphylococcus coag. neg.* (26,2%) y *S. aureus* (17,5%). En el semen congelado sin antibióticos y congelado con antibióticos estas bacterias

fueron igualmente las predominantes con diferencias en la frecuencia según se expuso antes.

Tabla 1. Resultados de las investigaciones microbiológicas

Microorganismos	Semen fresco		Semen congelado			
			Con antibióticos		Sin antibióticos	
	n	%	n	%	n	%
<i>E. coli</i>	51	24,8	2	1,5	5	15,2
<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella</i> sp.	14	6,8	2	1,5	3	9,1
<i>E. coli</i> + <i>A. aerogenes</i>	9	4,4	2	1,5		
<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	1	0,5			1	3,0
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>	16	7,8	2	1,5	2	6,1
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> coag. neg.	13	6,3				
<i>Klebsiella</i> sp.	20	9,7	3	2,3	3	9,1
<i>A. aerogenes</i>	11	5,3	2	1,5		
<i>P. aeruginosa</i>	2	1,0			1	3,0
<i>Arcanobacterium</i> sp.	3	1,5			1	3,0
<i>S. aureus</i>	19	9,2	2	1,5	1	3,0
<i>Staphylococcus</i> coag. neg.	39	18,9	4	3,0	6	18,2
<i>S. aureus</i> + <i>A. aerogenes</i>	1	0,5	4	3,0	3	9,1
<i>Stap.</i> coag. neg. + <i>A. aerogenes</i>	2	1,0	2	1,5		
<i>Streptococcus</i> sp.	5	2,4				
Totales	206	100,0	25	18,8	26	78,8

Tabla 2. Resumen de los resultados de las investigaciones bacteriológicas

Microorganismos	Semen fresco		Semen congelado			
			Con antibióticos		Sin antibióticos	
	n	%	n	%	n	%
Total de muestras	206		133		33	
<i>Escherichia coli</i>	51	24,8	2	1,5	5	15,2
Otras enterobacterias	31	15,0	5	3,8	3	9,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1,0			1	3,0
<i>Arcanobacterium</i> sp.	3	1,5			1	3,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	9,2	2	1,5	1	3,0
<i>Staphylococcus</i> coag. neg.	39	18,9	4	3,0	6	18,2
<i>Streptococcus</i> sp.	5	2,4				
Contaminaciones mixtas	56	27,2	12	9,0	9	27,3
Bacterias anaerobias						
Total de aislamientos	206	100,0 ^a	25	18,8 ^b	26	78,8 ^a

Alba Gomez, Luis; Silveira Prado, Enrique. Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilina-estreptomycinina en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas - **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 10, Octubre/2005, [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Veterinaria Organización S.L.](http://www.veterinaria.org)® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>

El predominio de estas bacterias en los aislamientos es coincidente con los hallazgos en la flora bacteriana vaginal de las vacas clínicamente sanas en Cuba.^[10-12] Sin embargo, la incidencia de *P. aeruginosa* fue muy baja y no se aislaron *A. pyogenes* ni bacterias anaerobias, hallazgos semejantes a los encontrados por otros investigadores en el semen de toros reproductores Holstein en la provincia de La Habana.^[13] Se ha señalado que *A. pyogenes* es un germen predominante como contaminante en el semen bovino^[1-4,14] pero, en las condiciones ambientales de Cuba, este germen no se ha encontrado en los eyaculados de toros sanos.^[15]

La perdurabilidad de la actividad contra gérmenes patógenos de la combinación penicilina-estreptomycinina a las dosis usuales fue señalada recientemente,^[16] observándose un 91,1% de inactivación después de la contaminación experimental del semen con *Leptospira santarosai* serovar *guaricura*, resultados muy superiores a los obtenidos con la Amoxicillina (59%) y el Ceptiofur sódico (32,5%), antibióticos utilizados para comparar.

En el semen congelado con antibióticos, la carga bacteriana fue significativamente más baja que la que presentó el semen congelado sin antibióticos (Tabla 3). El 89,5% del semen congelado con antibióticos se mantuvo por debajo de las 500 UFC/mL, límite establecido por muchos países como admisible para su utilización en los intercambios internacionales.^[17]

Tabla 3. Clasificación en categorías sanitarias de las muestras de semen estudiadas

UFC/mL	Semen fresco		Semen congelado			
			Con antibióticos		Sin antibióticos	
	Total	%	Total	%	Total	%
0	40	19,4	108	81,2 ^a	7	21,2 ^b
Hasta 100	65	31,6	11	8,3 ^a	15	45,5 ^b
Hasta 2 000	36	17,5	6	4,5 ^a	2	6,1 ^b
Hasta 5 000	14	6,8	5	3,8 ^a	4	12,1 ^b
Más de 5 000	51	24,8	3	2,3 ^a	5	15,2 ^b
Totales	206	100,0	133	100,0	33	100,0

Porcentajes con superíndices diferentes en la misma fila difieren significativamente para $p < 0,01$

El análisis conjunto de los resultados expuestos anteriormente demuestran la efectividad que aún mantiene la combinación penicilina-estreptomycinina en la eliminación de los microbios contaminantes normales del semen, a pesar del tiempo transcurrido desde su introducción en la práctica de preservación del semen bovino.

Desde hace muchos años se conoce que, en el semen de toro puede haber tipos bacterianos resistentes a la penicilina y a la estreptomycinina.^[18] Se creía que la producción de cepas microbianas resistentes podrían constituir un problema si se insistía en la adición de antibióticos al semen en forma sistemática y rutinaria. No obstante, las técnicas que se

Vol. VI, Nº 10, Octubre/2005 –

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>

vienen utilizando en inseminación artificial han demostrado no suministran medios a propósito para la perpetuación de tipos resistentes, pues la vía de reintroducción de los gérmenes resistentes al reproductor del que procede no es directa. Si la cama está limpia, el prepucio bien lavado y se aplican métodos rigurosamente asépticos para la preparación de los diluyentes, en el montaje de la vagina y en el colector vaginal, se pueden obtener eyaculados con un mínimo de contaminación bacteriana.^[5] Por todo ello el tratamiento del semen con antibióticos es sólo una débil defensa frente a la introducción de enfermedades y cualquier otro tipo de contaminación bacteriana.

CONCLUSIONES

La adición de la combinación penicilina-estreptomicina a los medios de dilución para la congelación del semen de toros, en forma de pastillas, continua siendo eficaz, para reducir la carga bacteriana del semen producido en los establecimientos de inseminación artificial de Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

1. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Parte 3 Anexos. Título 3.2 Toma y tratamiento del semen. Anexo 3.2.1 Semen de bovinos. 2004 http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E_00127.htm
2. Ramos J, López de Herrera I. Contaminación microbial del semen bovino congelado. Rev Univ La Salle 1996; 1:17-20.
3. Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado Taurus 1999; 1(3):18-31.
4. Jiménez C, Robayo I. Bioseguridad en el procesamiento del semen bovino. Rev Electrón Vet REDVET 2004; V(10). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101004.html>
5. Salisbury GW, VanDemark NL, Logde JR. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos. 1982; Ed. Acibia. Zaragoza .
6. Almquist JO, Glantz PJ, Shaffer HE. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. J Dairy Sci. 1949; 32: 543-548.
7. Nagase H, Niwa T. Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. V Congr. Int. Anim. Reprod. Trento. 1964; 4:410.
8. Manual de procedimientos para los centros de inseminación artificial. 49 p. Empresa de Inseminación Artificial. Ministerio de la Agricultura. 1997. C. de La Habana.
9. SPSS/PC+ Statistical Package for IBM PC Version 3.1 Microsoft Corp. 1989.

Alba Gomez, Luis; Silveira Prado, Enrique. Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilina-estreptomicina en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas - **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 10, Octubre/2005, [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Veterinaria Organización S.L.](http://www.veterinaria.org)® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>

Vol. VI, Nº 10, Octubre/2005 –

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>

10. Alba LO, Armas J, Fernández A, Rojas Delfa. Flora bacteriológica y uterina de vacas clínicamente sanas en diferentes períodos del ciclo estral. VI Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal 1977. La Habana.
11. Fernández A, Dimoso Z, Rojas Delfa. Estudio cualicuantitativo de la microflora normal de las secreciones cérvico-uterinas en vacas clínicamente sanas. IV Conferencia de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1982. Santa Clara. Cuba.
12. García Paulina, Martínez Elena, Peraza Nayda, González JA. Estudio comparativo del comportamiento de la microflora cérvico-vaginal en hembras recién paridas clínicamente sanas, con endometritis y repitentes de la raza Holstein y sus cruces. Rev Cub Reprod Anim 1990; 18(2):25-35.
13. Martínez E, Peraza Nayda, García Paulina. Soluciones desinfectantes usadas en lavados prepuciales para disminuir la contaminación bacteriana del semen. III Congreso Cubano de Ciencia Veterinaria. 6-9 de marzo. 1986. La Habana.
14. Roppel MK, Campero CM. Acción de *Actinomyces pyogenes* en el tracto reproductor bovino. Therios 1998; 27:14-20.
15. Nápoles E, Gómez Isabel, Remón Silvia, Laporte Georgina. Microorganismos aislados del aparato reproductor de sementales bovinos. III Congreso Cubano de Ciencia Veterinaria. 6-9 de marzo. 1986. La Habana.
16. Miraglia Fabiana, Morais Zenaide M, Cortez Adriana, Melville Priscilla A, Marvullo Maria FV, Richtzenhain LJ, Visintin JA, Vasconcellos SA. Comparação de quatro antibióticos para inativar leptospiras em sêmen bovino diluído em gema-citrato e experimentalmente contaminado com *Leptospira santarosai* serovar *guaricura*. Braz J Microbiol 2003; 34(2):147-151.
17. Consejo de Ayuda Mutua Económica (CAME) Métodos únicos de reconocimientos microbiológicos y de valoración higiénico-veterinaria del semen de los animales sementales agropecuarios determinados para las entregas mutuas. 1969. Bucarest.
18. Alford JA. The occurrence of bacteria resistant to penicillin, streptomycin and sulfanilamide in diluted semen. J Dairy Sci 1953; 36:1097-1103.

Manuscrito recibido el 04/08/2005, nº de referencia 100509_RED VET. Enviado por la Comisión de Arbitraje para REDVET en la Universidad Central de Santa Clara. Publicado en REDVET® el 01/10/05. (Copyright) 1996-2005. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504 Veterinaria.org® - Comunidad Virtual Veterinaria.org® - Veterinaria Organización S.L.® Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#)