

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Determinación de Niveles de Aglutininas de Brucella en
Becerras de 2, 4 y 6 Meses de Edad Vacunadas Contra
Brucelosis con Cepa 19 y Referencia al Nivel de Respuesta

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Luis Valencia Jaime

GUADALAJARA, JAL. 1977

A la memoria de mi PADRE
con cariño y admiración.

Con todo cariño a mi MADRE
que con su ejemplo, fortaleza y ternura alentó mis-
pasos.

A mis queridos hermanos
Marcela y Gabriel
Elba Raquel
Gabriela Adriana
Sergio
José Juan
Guillermo

AL M.V.Z. ABEL BUENROSTRO SILVA

En agradecimiento por su gran -
ayuda como asesor de este trabajo
jo.

A mi maestro M.V.Z.

Carlos B. Figueroa Durán.

Por su cooperación

Q.F.B. Yolanda Partida

Q.F.B. Rosa E. Valdez

A mis familiares y amigos.

Al

*Banco de Crédito Rural de Occidente,
S.A.*

Sr. J. Jesús Landeros Ochoa.

Grupo Solidario Ejidal

Estado Colectivo "El Teniente".

Arenal, Jalisco.

A MI HONORABLE JURADO

- Q.F.B. Rosa Elena Valdez M.
M.V.Z. Guifré María I. Rouret.
M.V.Z. Hiram Osiris González C.
M.V.Z. J. Antonio González M.
M.V.Z. J. Antonio Orozco S.

INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
INTRODUCCION.	1
MATERIAL Y METODOS.	7
RESULTADOS.	11
DISCUSION.	28
CONCLUSIONES.	31
SUMARIO.	32
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	33

INTRODUCCION

Una de las bases primordiales para mantener un hato lechero económicamente "saludable" consiste en el control adecuado de los problemas de la reproducción. De ahí que todos los esfuerzos encaminados al mejoramiento de la fertilidad darán por resultado una alta eficiencia en la productividad, que a su vez repercutirá directa y favorablemente sobre las utilidades obtenidas.

El ganado se tiene para beneficio económico y la meta definitiva de los programas de la medicina preventiva en relación con la reproducción debe ser, mantener la producción en el nivel más provechoso. (26).

Entre las enfermedades que más frecuentemente afectan el tracto reproductivo del ganado, haciendo de la reproducción un fracaso, tenemos a la brucelosis bovina que por su amplia difusión se ha constituido en una de las zoonosis más importantes, y su alta prevalencia en la ganadería ocasiona grandes pérdidas económicas, constituyéndose además en un problema de marcada significación en salud pública.

En México, es considerada como la zoonosis número uno. El porcen-

taje de los rebaños infectados está por encima del 60% y el de reactores positivos sobrepasa generalmente el 10%, llegando en ocasiones --- hasta un 30% o más. Las pérdidas debidas a la brucelosis en el ganado bovino lechero durante el año de 1969 fueron:

Pérdidas en crías	\$ 81,000,000
Pérdidas en leche (no prod).	375,000,000
Pérdidas en leche (descenso prod.)	281,000,000
Pérdidas por esterilidad	<u>80,000,000</u>
	\$ 817,000,000

(20)

La brucelosis del ganado vacuno, causada por *Brucella abortus*, - es una enfermedad contagiosa, aguda o crónica, caracterizada primera- mente por expulsión prematura del feto en las hembras gestantes, y --- por retención de placenta e infertilidad. En menor extensión, provoca, orquitis e infección de las glándulas reproductoras accesorias en el - macho, (2) (9) (14) (17).

Aunque el aborto contagioso de las vacas se conocía en el Siglo - XVIII, no fue sino hasta en 1897 cuando Bang aisló el organismo, ahora clasificado como *Brucella abortus*, de fetos abortados. (13).

En 1969, Hafez, señaló que la brucelosis en el ganado vacuno es - tá causada casi exclusivamente por *Brucella abortus*, pero ocasionalmen - te son aisladas *Br. suis* o *Br. melitensis*. (2).

La transmisión ocurre más comúnmente por la ingestión de bacte -

rias biables presentes en alimento, agua o material contaminado por --
 las descargas uterinas de animales enfermos. Sin embargo, otras vías--
 de entrada pueden ser a través de mucosas, posiblemente por la piel y-
 por medio de la inseminación artificial al usar semen contaminado (2),
 (14) (21) (26).

Las vacas infectadas abortan una vez, y en raras ocasiones dos -
 veces, pero en preñeces sucesivas el útero se reinfecta por vía de la-
 ubre, aunque entonces el animal logra llevar el feto a término. El --
 tiempo transcurrido entre la exposición y el aborto es inversamente---
 proporcional al estado de la gestación. (1) (9) (11).

La expulsión del feto ocurre cuando las bacterias emigran por --
 vía sanguínea al útero gestante, se establecen y multiplican en las -
 curtúnculas y vellosidades del corion y dan lugar a alteraciones infla-
 matorias de los placentomas. De este modo sufre una perturbación el --
 intercambio de nutrientes y oxígeno entre la madre y el feto. (1) (4)
 (24).

Un hecho importante, es la gran predilección que tiene Br. abor-
 tus por los tejidos embrionarios del feto y la placenta materna, pues-
 to que el útero no grávido, es desfavorable para su propagación. Tal -
 predilección por el tejido placentario puede ser debida a la presencia
 de eritritol en las células epiteliales del corion. (1) (2) (11) (25).

Dado que en la actualidad no existe un tratamiento eficaz contra-
 la brucelosis, los esfuerzos han sido dirigidos por consiguiente, a -
 la prevención, control y erradicación del problema.

Una erradicación eventual de la enfermedad depende de las prue -

bas de seroaglutinación y eliminación de los reactivos. (14).

Dentro de un mismo país pueden presentarse zonas con una tasa de infección elevada, mediana o baja. El programa podrá iniciarse a escala nacional o por zonas, de acuerdo a las tasas de prevalencia y condiciones de la explotación ganadera, procedimientos y disponibilidad de recursos.

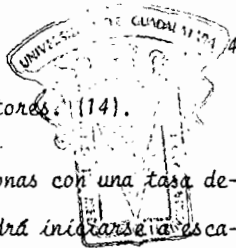
En regiones del país altamente infectadas, los esfuerzos iniciales del programa deben ser dirigidos a obtener una reducción de la prevalencia de la enfermedad. Esta fase inicial del programa, con una duración mínima de 5 años, hará posible la iniciación de la fase de erradicación del mismo.

En zonas con una tasa baja de infección, podrá adoptarse desde el principio un programa de erradicación por el método de prueba serológica y sacrificio de reactivos. (15).

Las pruebas serológicas son el método más práctico para el diagnóstico de brucelosis en el ganado. Numerosas pruebas basadas en la presencia de aglutininas de *Br. abortus* en el suero sanguíneo, leche, moco vaginal o plasma seminal de animales infectados han sido y están siendo empleadas con mucho éxito. (9).

Los antígenos y procedimientos uniformados han hecho las pruebas de aglutinación de suero sanguíneo altamente precisas y universalmente aceptadas como el medio más útil para detectar la infección por *Brucella* en el animal individual (9) (14).

La práctica sumamente generalizada de vacunar a las terneras con-



OFICINA DE
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Br. abortus Cepa 19, ha dado lugar a que se modifique en parte la interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de seroaglutinación.

Todos los animales suelen hacerse reactivos a las pruebas sanguíneas una semana después de la vacunación; desarrollan sus más altos títulos de aglutinación en 4 a 6 semanas aproximadamente y por lo general empiezan a perderlos progresivamente.

En algunos animales, estos títulos no bajan o lo hacen en forma tan lenta que incluso después de varios años son lo suficientemente elevados para ser considerados positivos en animales no vacunados. Esto ocurre generalmente en animales que sobrepasan los 8 meses de edad o se acercan a su madurez sexual al momento de ser vacunados. La vacunación en terneras de poca edad tiende a reducir este problema. (3) (6) (7) (9) (10) (18).

Recientemente, varios investigadores, reportaron el aislamiento de organismos de Br. abortus Cepa 19 encontrados en la leche de animales examinados. El 85% de estos aislamientos fueron hechos de ganado que fue vacunado a la edad de 8 meses o más. Este dato confirma que la localización y persistencia de los organismos vacunales en la ubre están estrechamente relacionadas con la madurez sexual de la becerria al momento de la vacunación. (9) (19).

Redman en 1967, verificó que la vacunación de becerras de 2 a 3 meses de edad confería tan buena protección como la obtenida en animales vacunados entre 4 y 8 meses de edad, observando además que los anticuerpos post-vacunales decrecían hasta un estado negativo, más pron-

to que en los vacunados a edades más avanzadas. (7) (18).

El objetivo del presente trabajo es la realización de un estudio de los títulos de aglutininas post-vacunales presentes en la sangre de becerras vacunadas con *Br. abortus* Cepa 19 a edades de 2, 4 y 6 meses.

MATERIAL Y. METODOS.

MATERIAL:

- Tubos de ensayo.*
- Gradillas.*
- Etiquetas engomadas.*
- Centrífuga.*
- Placa de Aglutinación (con concavidades o planas).*
- Lámpara (fuente de calor).*
- Goteros para suero.*
- Pipetas graduadas de 0.1 ml.*
- Palillos de plástico.*
- Solución salina fisiológica estéril.*
- Agua bidestilada.*
- Agujas hipodérmicas 16 y 18*
- Jeringas desechables.*
- Antígeno de Brucella.*
- (Proveedora Nacional de Biológicos Veterinarios).*
- Suero sanguíneo de las becerras.*
- 15 vacunas Br. abortus Cepa 19.*
- 5 becerras de 2 meses de edad.*

5 becerras de 4 meses de edad.

5 becerras de 6 meses de edad.

METODOLOGIA:

Fueron utilizadas para este trabajo, 15 becerras de la raza -- Holstein-frisian, cuyas edades eran de 2, 4 y 6 meses. Estas becerras se encontraban libres de brucelosis conforme a una prueba de seroaglutinación en placa realizada en forma previa a la iniciación del trabajo.

Inmediatamente después de haber hecho la selección de becerras, -- se procedió a la vacunación de las mismas utilizando la vacuna de Br. abortus Cepa 19 liofilizada, en dosis única de 5 ml. por vía subcutánea en la tabla del cuello, en donde fueron inoculados 60,000 millones de gérmenes vivos atenuados. (23).

A partir del momento de la vacunación, se recolectaron muestras -- sanguíneas de las becerras, con un intervalo semanal, haciendo cada vez la prueba de seroaglutinación en placa.

Trabajamos con la prueba de seroaglutinación en placa por consi -- derarla como el método más práctico, económico y accesible en nuestro medio. Estando además aceptada universalmente como un medio muy útil -- para detectar la presencia de aglutininas de Brucella en el animal individual. (9) (14).

El intervalo de 7 días entre las pruebas sanguíneas se estable -- ció así, porque desde el punto de vista inmunológico es aceptado (8) --

(16) y por otra parte se hizo para evitar el manejo excesivo de los animales facilitados para este trabajo.

Para la interpretación de los resultados en la prueba de seroaglutinación en placa, se usó la siguiente nomenclatura: (5).

<u>Grado de aglutinación</u>	<u>Nomenclatura</u>
Total	(+)
Parcial	(⁺ -)
Ausente	(-)

<u>Cantidad de suero (ml)</u>	<u>Título</u>
0.08	1:25
0.04	1:50
0.02	1:100
0.01	1:200
0.005	1:400
0.0025	1:800

Para obtener títulos inferiores a 1:25 se procedió de la manera siguiente: partiendo de que 0.08 ml. de suero es igual al título 1:25, entonces aumentamos la cantidad de suero al doble y sacamos la mitad al título 1:25, lo que nos da en números redondos 0.16 ml. de suero es igual al título de 1:12. Si repetimos el proceso, tendremos que 0.32--ml. de suero es igual al título 1:6 y así sucesivamente.

En el otro caso, para lograr títulos mayores a 1:200 se hace una dilución de suero en solución salina fisiológica estéril.

El título de aglutinación máxima alcanzado semanalmente por cada uno de los animales, se fue tabulando, para después pasar los datos a una gráfica individual.

De tal manera que al concluir con el trabajo se obtuvo una curva del nivel de aglutininas post-vacunales presentes en la sangre, su -- persistencia en la misma y su variación conforme a la edad de las bece--
rras.

En la parte superior de cada una de las gráficas, se anotó la - edad y el número de arete correspondiente al animal muestreado. Des -- pués de haber obtenido todos los resultados, se representó en otra --- gráfica la medida de los títulos aglutinantes por grupos de edad.

RESULTADOS

TITULO DE AGLUTINACION MAXIMO ALCANZADO
SEMANALMENTE POR LAS BECERRAS VACUNADAS CON CEPA 19.

EDAD A LA VACUNACION (meses)	IDENTIFICACION (arete)	TITULO AGLUTINANTE (intervalos de 7 días)*																			
		7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140
2	291	200	300	300	500	200	± 100	50	± 50	25	25	25	25	25	12	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	293	200 ^(W)																			
2	294	200	± 400	600	± 100	± 100	± 100	50	25 ^(W)												
2	295	± 200	300	400	100	50	± 50	± 50	± 50	± 50	± 50	25	25	25	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	297	± 200	300	500	200	± 100	± 100	50	± 50	25	25	25	25	± 25	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	285	200	± 400	600	± 400	100	100	100	100	50	50	50	50	50	± 50	25	12	12	6	(-)	(-)
4	287	300	± 400	600	± 200	± 100	± 100	± 100	± 100	50	50	50	50	25	25	25	12	12	(-)	(-)	(-)
4	288	300	300	600	± 400	100	100	50	50	± 50	25	25	25	25	12	12	6	(-)	(-)	(-)	(-)
4	289	300	400	600	200	100	± 100	50	50	25	25	25	25	25	12	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	290	200	300	± 600	200	100	± 100	50	50	± 50	25	25	25	± 25	12	12	6	(-)	(-)	(-)	(-)
6	275	400	600	600	200	± 200	± 200	100	100	50	50	± 50	50	25	25	25	12	12	6	6	6
6	281	300	600	600	± 400	± 200	± 200	100	100	100	50	50	50	50	25	25	25	12	12	12	6
6	282	± 400	600	600	± 400	± 200	± 200	100	100	100	50	± 50	25	25	25	25	± 25	± 25	12	12	12
6	283	300	600	600	± 400	± 100	± 100	50	50	± 50	25	25	25	25	25	25	12	12	12	6	6
6	284	300	400	600	± 400	100	± 100	100	100	50	50	50	50	50	± 50	± 50	25	± 25	12	12	6

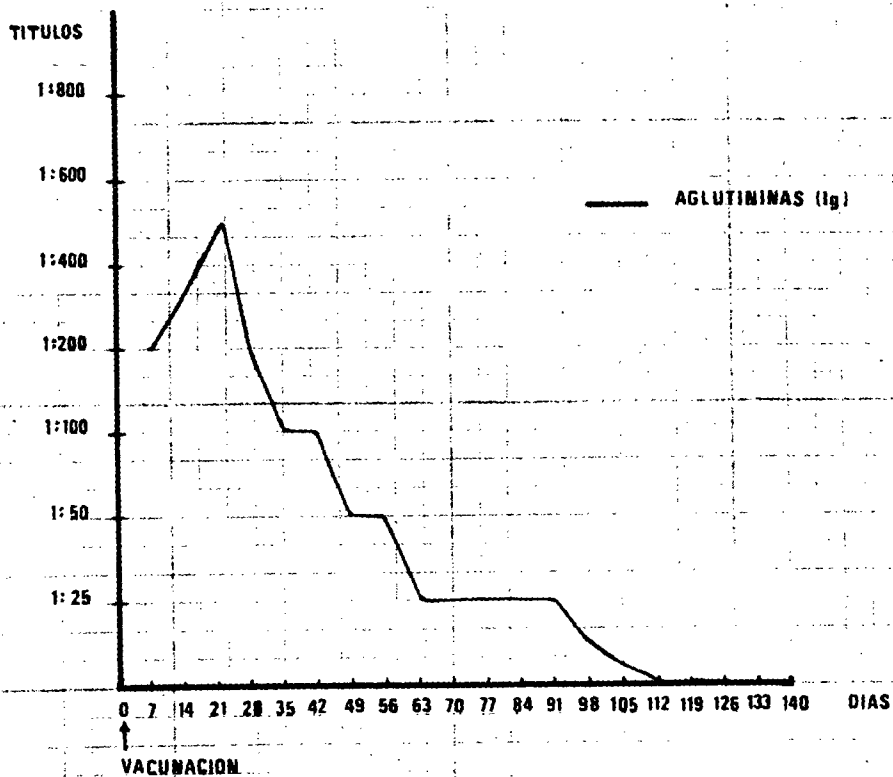
(±) Aglutinación parcial

(-) Aglutinación ausente

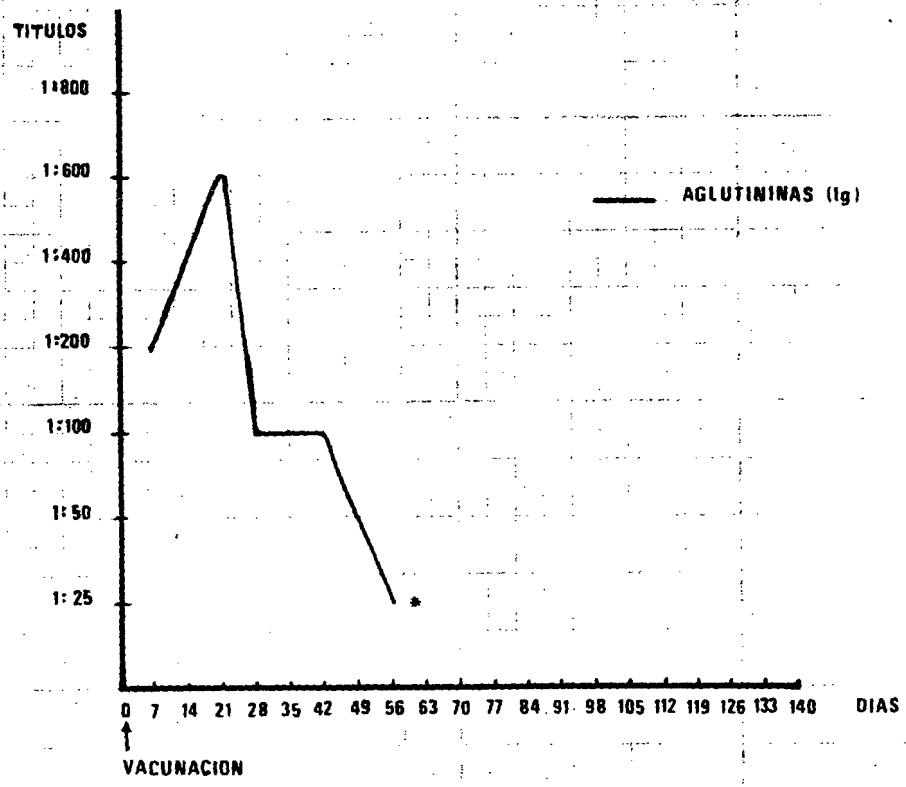
* Los días están anotados en forma acumulativa.

^(W) Murió por timpanismo

EDAD 2 MESES
IDENTIFICACION 291
(arete)

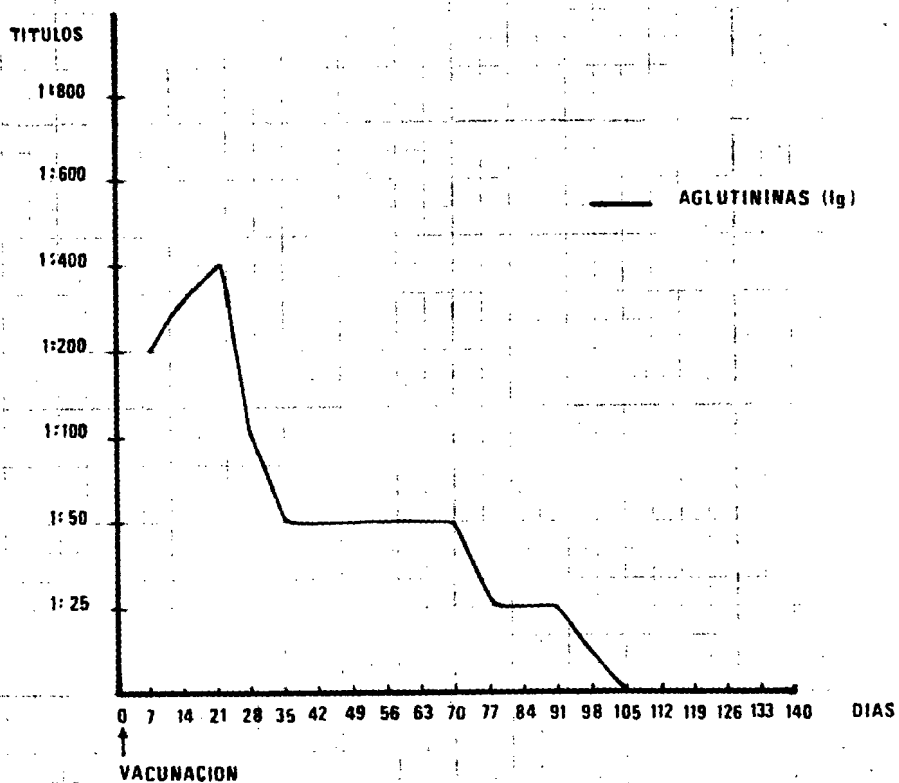


EDAD 2 MESES
IDENTIFICACION 294
(arete)

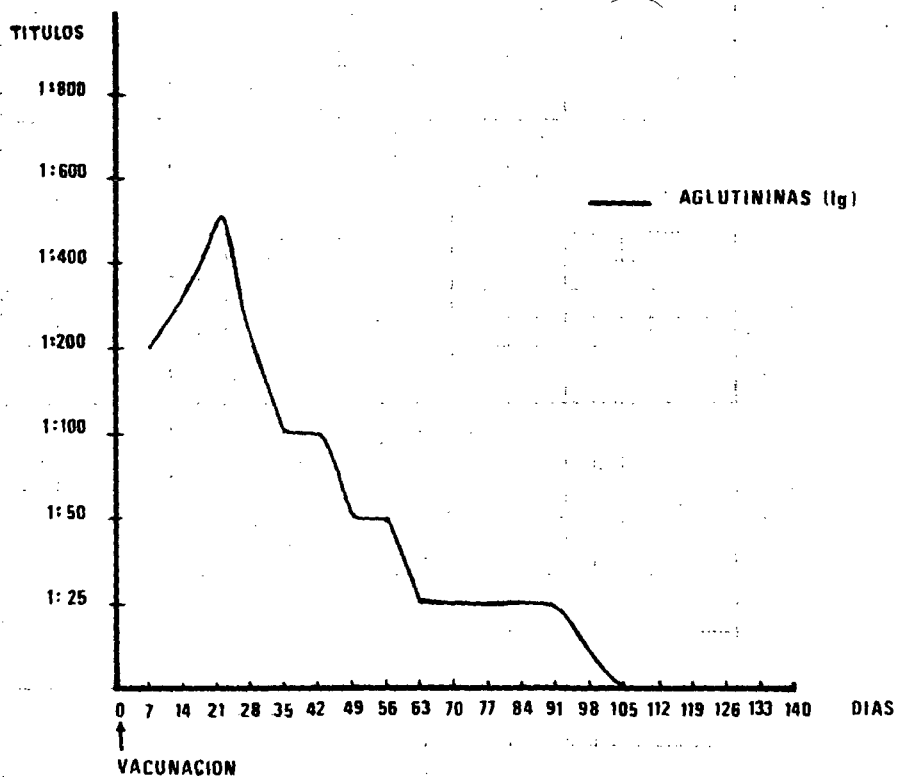


* murió por timpanismo

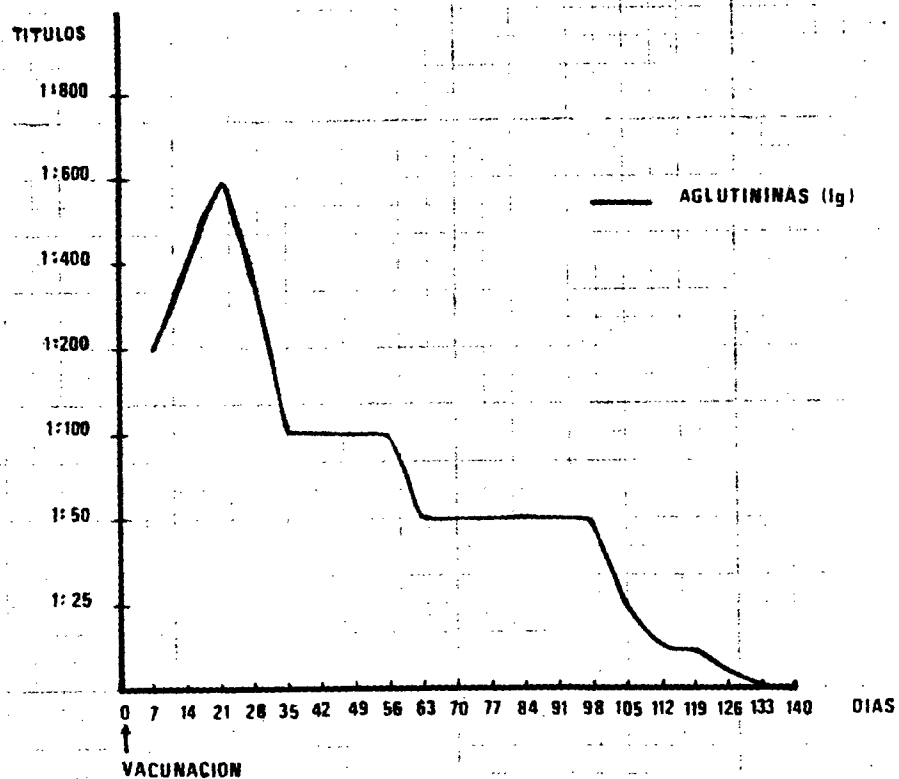
EDAD 2 MESES
IDENTIFICACION 295
(arete)



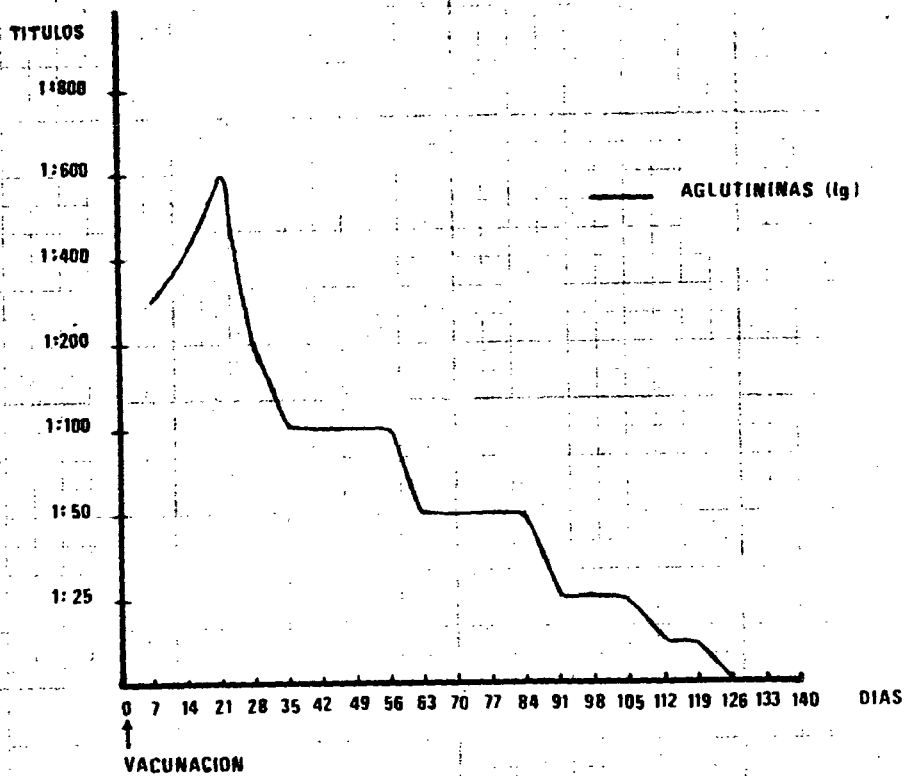
EDAD 2 MESES
IDENTIFICACION 297
(arete)



EDAD 4 MESES
IDENTIFICACION 285
(arete)

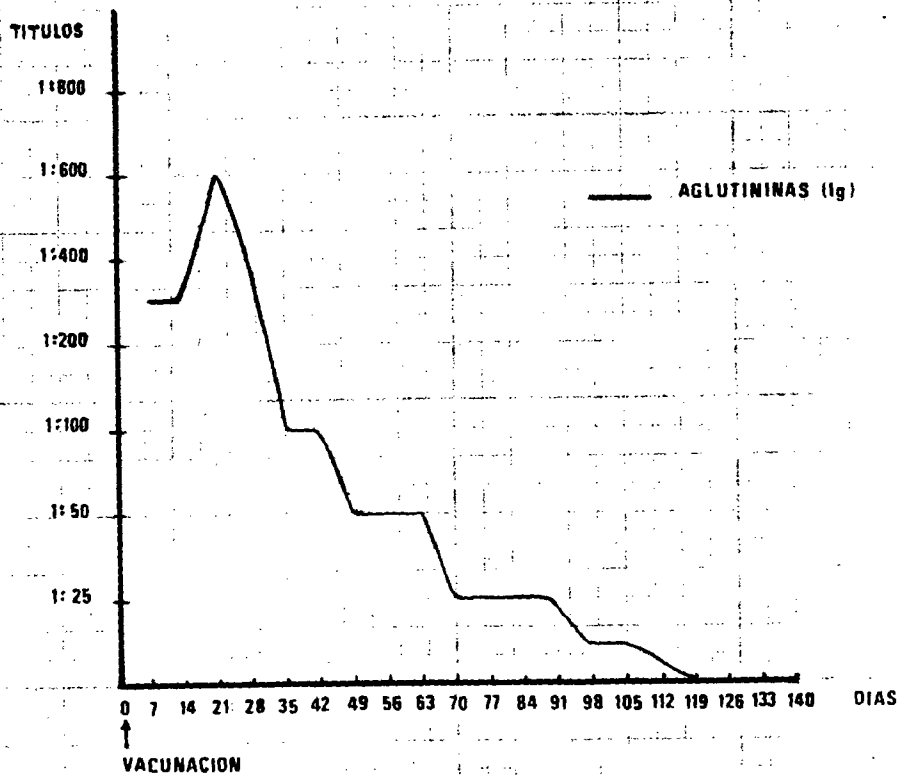


EDAD 4 MESES
IDENTIFICACION 287
(areta)

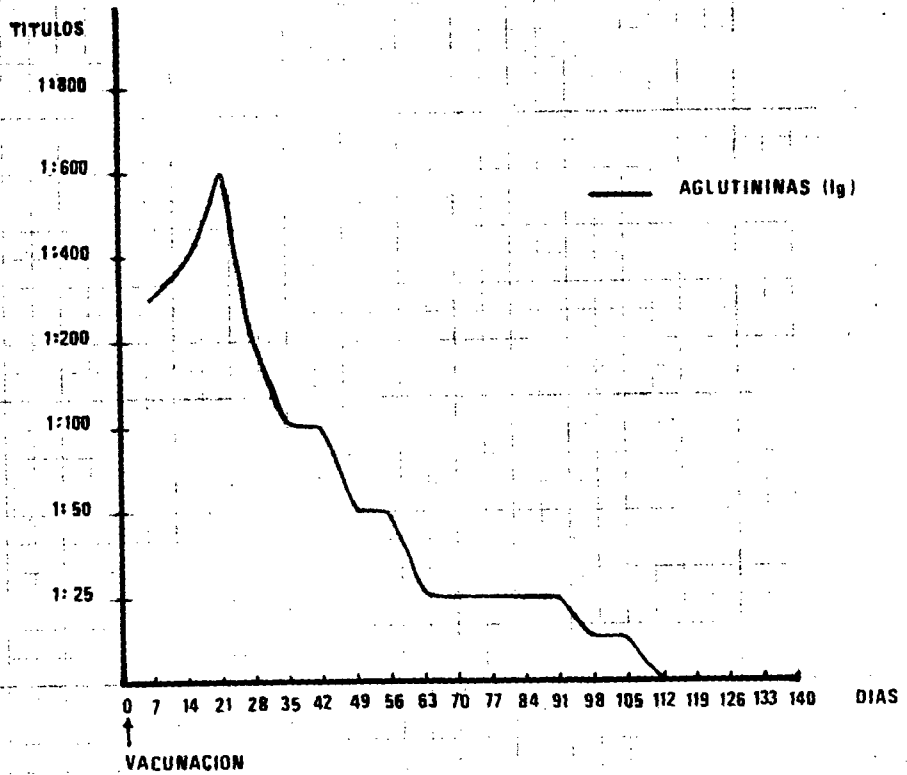


EDAD
IDENTIFICACION
(arete)

4 MESES
288

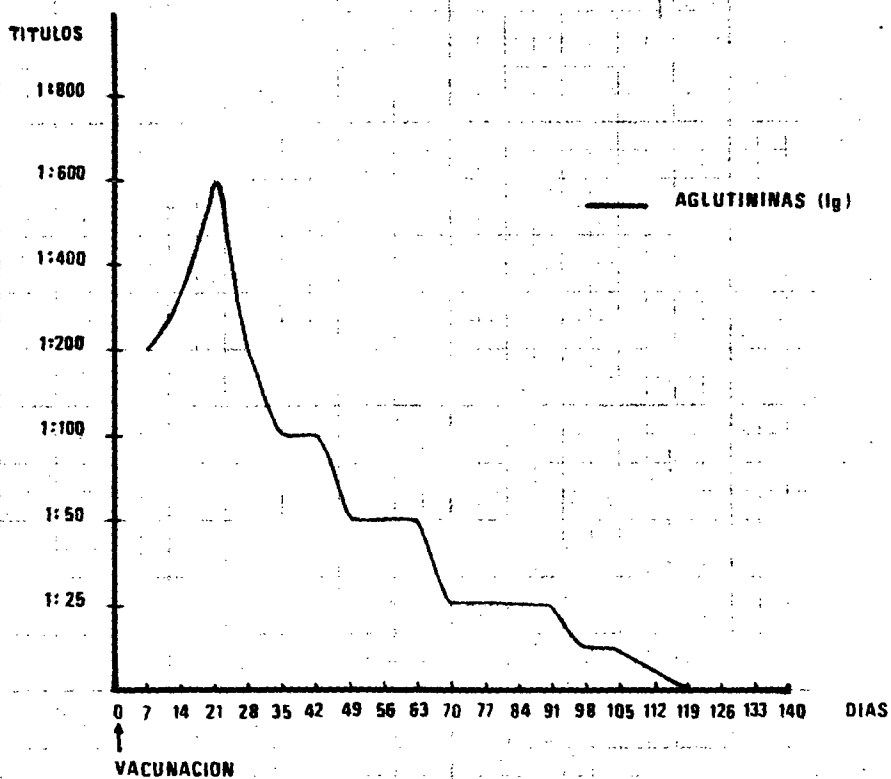


EDAD 4 MESES
IDENTIFICACION 289
(arete)

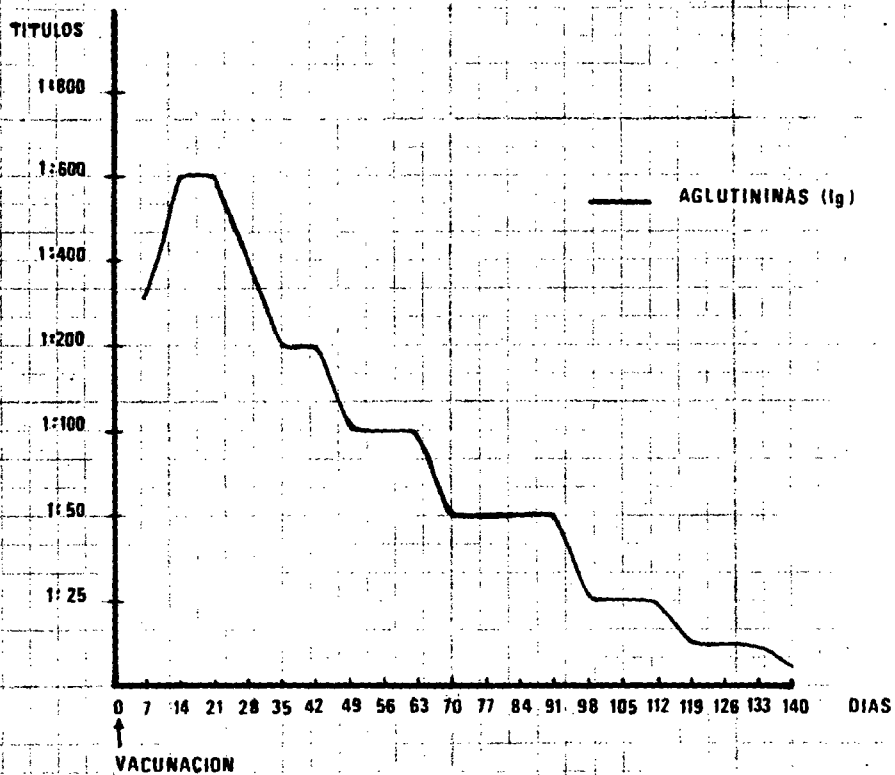


EDAD
IDENTIFICACION
(arete)

4 MESES
290



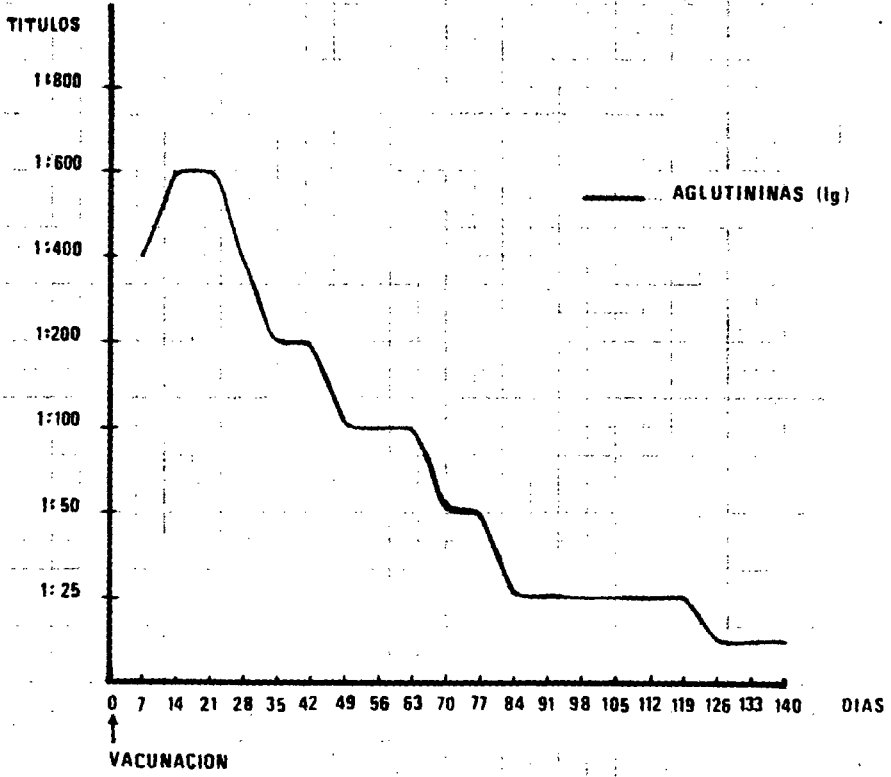
EDAD 6 MESES
IDENTIFICACION 281
(arete)



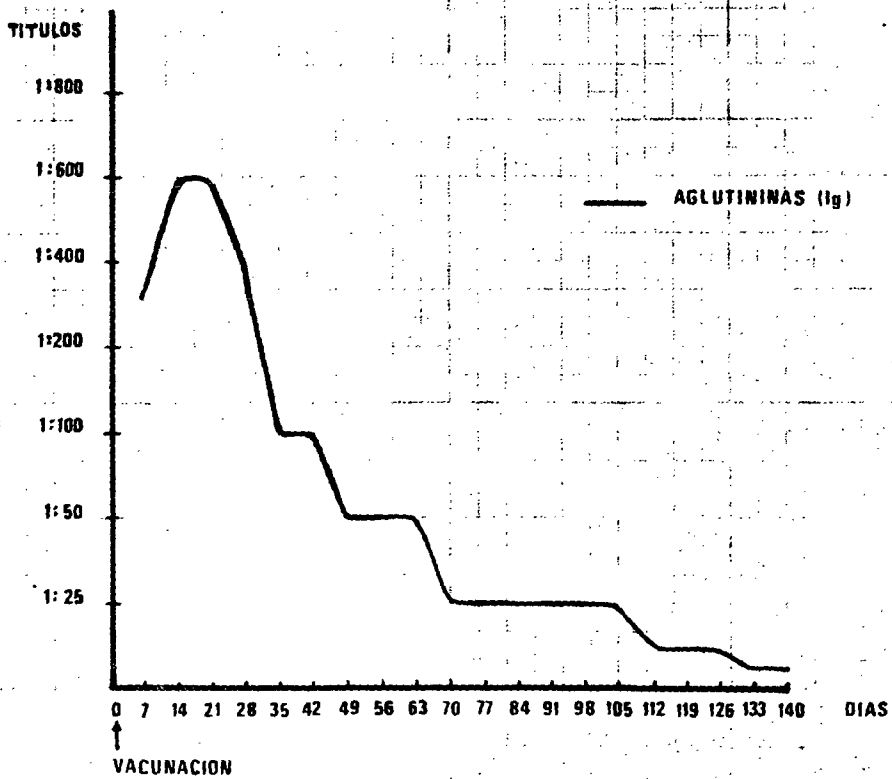


EDAD 6 MESES
IDENTIFICACION 282
(arete)

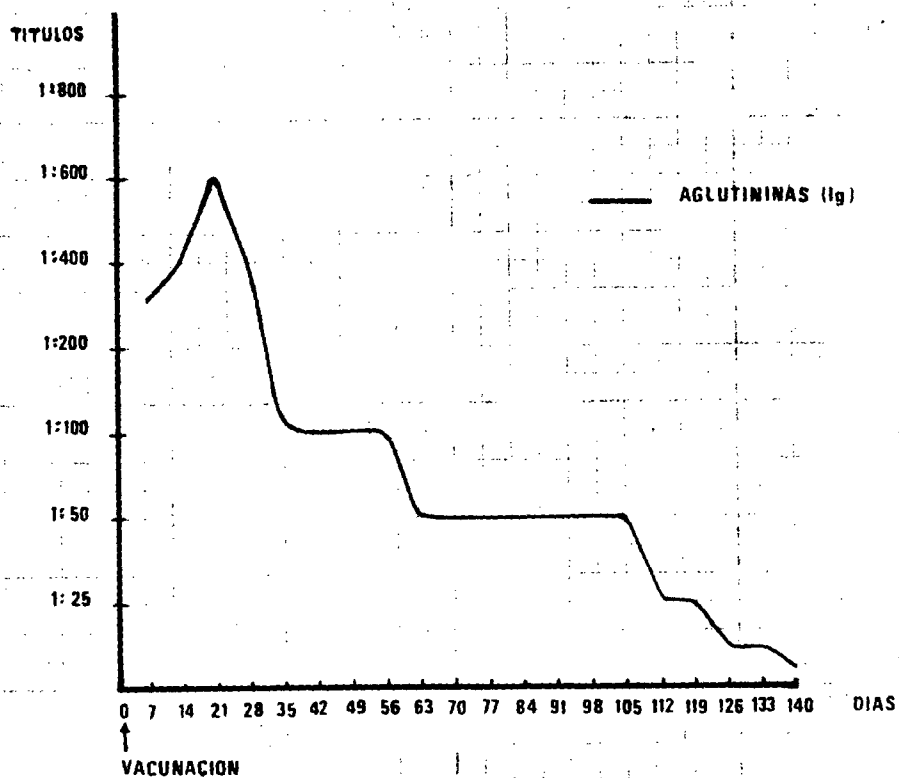
OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA



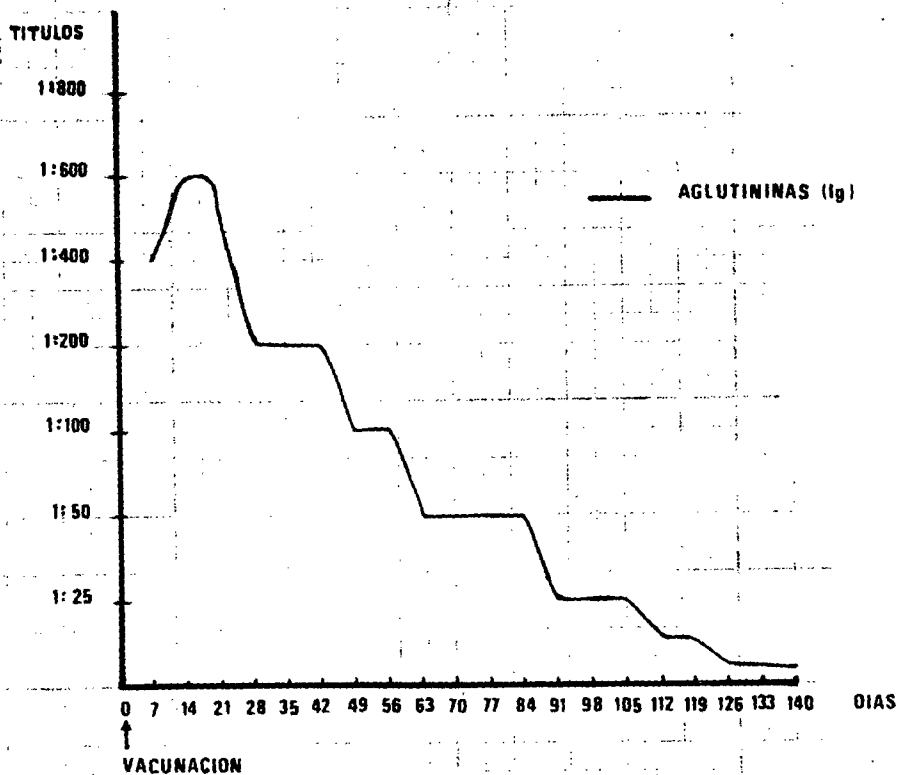
EDAD 6 MESES
IDENTIFICACION 283
(arete)



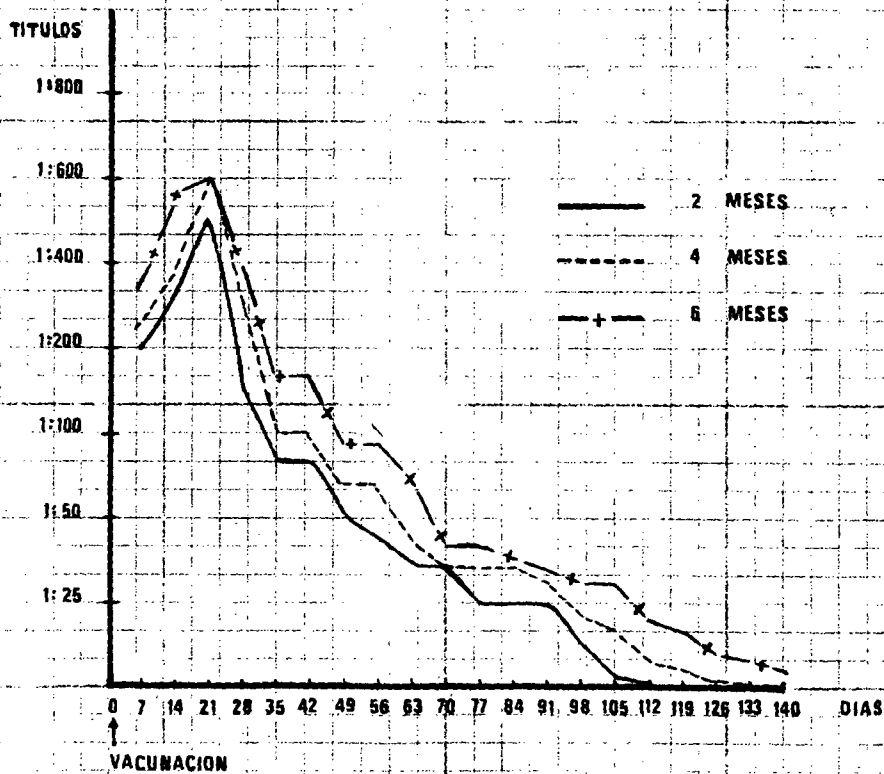
EDAD 6 MESES
IDENTIFICACION 284
(arete)



EDAD 6 MESES
IDENTIFICACION 275
(arete)



MEDIA DE LOS TITULOS AGLUTINANTES
(por grupo de edad)



DISCUSION

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos observar, que a partir de la vacunación con organismos de Br. abortus Cepa-19, la primera respuesta inmunológica en las becerras apareció al séptimo día, en base a la detección de aglutininas (Ig) en el suero sanguíneo.

La concentración de aglutininas fue aumentando progresivamente hasta alcanzar su cúspide entre los 14 y 21 días; decreciendo luego hasta volverse virtualmente imperceptible o permaneciendo a un bajo nivel; dependiendo esto de la edad de las becerras al momento de haber sido vacunadas.

Revisando las gráficas individuales, se observó, que entre las becerras de una misma edad no existe marcada variación en cuanto a la aparición y persistencia de aglutininas en el suero sanguíneo. En cambio, si pasamos a la gráfica comparativa de la media de los títulos aglutinantes (por grupo de edad), claramente podemos observar, que aun que los tres grupos siguen un patrón similar en lo referente al trazo de la curva; existen otro tipo de variaciones.

Tales variaciones se basan en que a mayor edad del animal vacunado, más alto es el título alcanzado cada semana y más largo el tiem-

po transcurrido entre la vacunación y el descenso a niveles bajos o ausencia total de aglutininas en el suero sanguíneo.

Por lo tanto, el grupo con becerras de 2 meses de edad alcanzó un estado negativo transcurridos 112 días después de la vacunación. El grupo de 4 meses alcanzó el mismo estado a los 133 días.

El grupo de 6 meses de edad al momento de finalizar el experimento (140 días) presentó un título inferior a la dilución 1:25. Es de suponer que estos últimos animales alcanzarán el estado negativo en el transcurso de unas semanas, aunque de cualquier forma el título es tan bajo que en la práctica clínica no es tomado en cuenta, ya que de ninguna manera interfiere con la interpretación de los resultados en las pruebas de seroaglutinación en placa, pues para fines de diagnóstico se parte de la dilución 1:25.

Durante el experimento murieron por timpanismo dos becerras de 2 meses de edad (293 y 294), y tal como puede observarse en la gráfica de la 294, hasta antes de su muerte había respondido inmunológicamente en la misma forma que las otras becerras de su edad.

Los resultados presentados en este trabajo, son en su esencia semejantes a los obtenidos por Morgan (1967), Fernández y Moojen (1974). (7).

Redman en 1967, verificó que la vacunación de becerras de 2 a 3 meses de edad confería tan buena protección como la obtenida en animales vacunados entre 4 y 8 meses de edad, observando además que los anticuerpos post-vacunales decrecían hasta un estado negativo, más pronto que en los vacunados a edades más avanzadas. (7) (18).

Debido a la persistencia de los títulos aglutinantes en ganado

vacunado alrededor de los 8 o más meses de edad, (9) (10) (11) (19) (22), y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda la vacunación de becerras entre los 2 y 6 meses de edad.

Un punto muy importante se basa en el hecho de que todos los animales empleados para este trabajo perdieron su título aglutinante o lo bajaron hasta un punto tal en que se evitará una futura interferencia en la interpretación de los resultados de la prueba de seroaglutinación.

CONCLUSIONES

1. A través de los resultados obtenidos, concluimos que los animales vacunados a edades de 2 y 4 meses no presentaron títulos aglutinantes residuales a partir de los 112 y 133 días después de la vacunación, disminuyendo, de este modo la interferencia en el diagnóstico y clasificación de reactores.
2. Los animales de 6 meses de edad presentaron a los 140 días después de la vacunación, títulos aglutinantes inferiores a la dilución 1:25, no interfiriendo tampoco con la clasificación e identificación de reactores.
3. Por último y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda dar un mayor énfasis a la vacunación de becerras con Br. abortus Cepa 19, a edades que oscilen entre los 2 y 6 meses.

SUMARIO

Fueron realizadas pruebas de seroaglutinación en placa (Prueba de Huddlesson), para el estudio de los títulos aglutinantes post-vacunales en 15 becerras de la raza Holstein-frisian, vacunadas con organismos de Br. abortus Cepa 19, teniendo edades de 2, 4 y 6 meses.

Fueron detectadas, a partir del séptimo día de la vacunación, aglutininas (Ig), presentando su cúspide entre los 14 y 21 días, de creciendo luego hasta alcanzar un estado negativo entre los 112 y 133 días después de la vacunación en los grupos de 2 y 4 meses de edad. El grupo de becerras de 6 meses de edad permaneció hasta los 140 días que duró el trabajo, con un nivel de aglutininas inferior a la dilución 1:25.

El presente trabajo sirvió para establecer la conducta inmunológica de tres grupos de becerras con edades respectivas de 2-4-6 meses y en base a los resultados obtenidos, se determinaron como las edades convenientes para la vacunación con Cepa 19.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arthur H.G. 1965 Obstetricia Veterinaria de Wright Tercera Edición. págs. 381-386 México, Ed. Interamericana.
2. Buenrostro Silva Abel M.V.Z. 1971. Brucelosis as cause of sterility in Cattle. Ninth FAO Swedish International Veterinary Postgraduate Course on Animal Reproduction. P. 1-II Volume III Royal Veterinary College, Stockholm, Sweden.
3. Cunningham B. and O'Reilly D.J. 1968 Agglutinin Response to Brucella Vaccines. Vet Rec 82 (24) 678-680.
4. Derivaux J. 1967 Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Animales Domésticos págs. 253-263 Zaragoza, España Ed. Acribia.
5. Díaz Heredia. 1974 Estudio Epizootiológico del Brote de Brucelosis Ocurrido en una Explotación Lechera de 720 cabezas de Ganado Bovino en Tecate, B.C. Tesis Profesional U. de G.
6. English J.E. 1966. Brucelosis Titer in Calves VM/SAC 61 (5) p. 472-473.
7. Fernández J.C.T. y Moojen V. 1974. Título Aglutinante em Terneiras de Tres a Sete Meses, Vacinadas com Brucela 19. Arquivos da -

- Facultade de Veterinaria UFRGS Vo 2 No. 1 pág. 11-15 Porto Alegre, Brasil.
8. Gordon B.L. 1975. Lo Esencial de la Inmunología págs 84-95 México. Ed. El Manual Moderno, S.A.
 9. Gibbons, Catcott & Smithcors. 1970. Bovine Medicine & Surgery. First Edition. p. 104-121 Wheaton, Illinois USA A.V.P. Inc.
 10. Hagan, Bruner & Gillespie. 1970. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. Págs. 259-278 México La Prensa Médica Mexicana, S.A.
 11. Jansen & Mackey, 1971. Enfermedades de los Bovinos en los Corrales de Engorda. Segunda Edición. págs. 103-110 México. UTEHA.
 12. Marek-Mocsy. 1973. Diagnóstico Clínico de las Enfermedades Internas de los Animales Domésticos. Cuarta Edición págs. 603-613 México. Ed. Labor.
 13. Merchant I.A. & Packer, 1970. Bacteriología y Virología Veterinaria. Tercera Edición. págs. 328-340 España. Ed. Acribia.
 14. Manual Merck de Veterinaria. 1970. Primera Edición. págs. 258-262 Rahway, N.J. EUA Editado por Merck & Co.
 15. Organización Panamericana de la Salud. 1972, IV Reunión Interamericana Sobre el Control de la Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis. Informe del Comité Asesor Sobre Brucelosis. págs. 103-117.
 16. Partida C. Yolanda Q.F.B.
Comunicación Personal.

17. Reaves P. & Henderson H. 1969. La Vaca Lechera, Alimentación y Crianza. Segunda Edición. págs. 334-335 México. UTEHA.
18. Redman et al. 1967. Early Calfood Vaccination Against Brucellosis. JAVMA 150 (4) 403-407.
19. Roberts S.J. 1971. Veterinary Obstetrics And Genital Diseases. Second Edition. p. 108-112 Michigan, USA Edwards Bros. Inc.
20. SAG. Subsecretaría de Ganadería. 1969. Sanidad Animal Boletín Dedicado a la Campaña Contra la Brucelosis. Boletín 24.
21. Salisbury G.W. & Vandermark N.L. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. First Edition. p. 402-406. San Francisco, Cal. USA W.H. Freeman & Co.
22. Stamm G.W. 1975. Veterinary Guide For Farmers. p. 105-108 USA. 105-108 USA. The Hearst Corporation.
23. Vacuna Br. abortus Cepa 19. Literatura cedida por Química Hoechst de México, S.A.
24. Wiesner E. 1969. Enfermedades del Ganado Bovino. págs 304-305, 368-370 Zaragoza, España, Ed. Acribia.
25. Willoughby R. 1975. Curso de Actualización en Avances Relacionados en Economía Pecuaria y Medicina Preventiva en Bovinos. AMVEB. México. UNAM.
26. Zemjanis R. 1974. Reproducción Animal, Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. Segunda Reimpresión de la Primera edición. págs. 181-183, 215 México. Ed. Limusa.