



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONTAMINACION BACTERIANA DE
SEMEN CONGELADO DE GANADO
BOVINO LECHERO

TESIS PROFESIONAL

Que para Obtener el Título de:
Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A :

RODRIGO GONZALEZ VELAZQUEZ

Guadalajara, Jal. Sep. 1976

A MIS PADRES

*Con eterno agradecimiento, cariño
y admiración.*

A mis hermanos

AL M.V.Z. AQUILES MERLOS CASTANEDA.

Asesor de esta tesis en reconoci -
miento a su ayuda en la realiza --
ción de este trabajo.

A mi maestro M.V.Z.

Javier Rivera Hernández

A mis familiares y amigos.

Al P.M.V.Z. Fernando Hidalgo V

Por su gran ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A MI HONORABLE JURADO:

M.V.Z. Abel Buenrostro Silva

M.V.Z. J. Roberto Salgado R.

M.V.Z. Ricardo García Lozano.

M.V.Z. Josefina Valle de Hdez.

Q.F.B. Rosa Valdez Miramontes

INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
INTRODUCCION.	1
MATERIAL Y METODOS.	6
RESULTADOS.	14
DISCUSION.	18
CONCLUSIONES.	23
SUMARIO.	25
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	27

INTRODUCCION

I N T R O D U C C I O N

El gran incremento de la Inseminación Artificial en Animales, y en la actualidad con más auge en ganado bovino lechero, debido principalmente a su manejo más frecuente y su mayor accesibilidad, y dada la gran cantidad de toros usados en los diversos Centros de Inseminación Artificial en todo el mundo, da lugar a la pregunta del control efectivo de microorganismos en el semen.

Los Centros de Inseminación, se han visto posiblemente obligados a dedicar poco tiempo al "control de calidad" para aumentar la cantidad, dada la gran demanda. (18).

La identificación y control de agentes bacterianos contaminantes del semen bovino, así como las técnicas de dilución y preservación del mismo, han sido objeto de numerosas investigaciones.

La dilución del semen empleando medios a base de yema de huevo-citrato de sodio, adicionado de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y sometido a congelación, a temperaturas de menos 196° C, es una de las técnicas empleadas con mayor éxito. (16) (21).

Sin embargo pese a lo refinado de esta técnica, no podemos descartar la posible existencia de contaminantes que alteren la calidad del semen.

La importancia de una investigación bacteriológica del semen es de interés, ya que las alteraciones que producen los microorganismos al semen durante el tiempo en que éste permanece en dilución, así como la transmisión de infecciones a órganos genitales de hembras inseminadas con semen contaminado son:

- a). Competencia de la bacteria por sustancias vitales, dando como resultado una reducción de la vida del esperma en almacenamiento. (19) (20).
- b). Bajo porcentaje de fertilidad (2) (19) (20).
- c). Una baja en la motilidad del espermatozoide, (7) (15) (21).
- d). Transmisión de enfermedades tales como la brucelosis, vibriosis y como consecuencia de esto el aborto. (15) (21).
- e). Problemas de vaginitis, cervicitis, metritis, endometritis y piometra. (19) (21).

Todos estos factores son de tomarse en cuenta, ya que los problemas reproductivos son de los más importantes en el ganado bovino lechero.

La contaminación bacteriana del semen tiene diversas y variadas fuentes e incluyen desde el interior del tracto reproductor del macho, por ejemplo; una vesiculitis, orquitis, epididimitis, e inflamación de los vasos deferentes. Estas afecciones son causadas por; *Brucella abortus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomona aureginosa* y *estreptococos*. (19) (21).

Los gérmenes contaminantes del pene y prepucio comunes en este sitio son: *Pseudomonas*, *Coliformes* y *Stafilococos* (21).

Los contaminantes también pueden ser introducidos al semen a la hora de la colección, por una vagina y lubricante no estériles o por el aire y polvo circulante. (21).

Y aún los contaminantes pueden ser introducidos más tarde por diluentes y equipo de manejo no estéril. (21).

Los primeros reportes al respecto corresponden a IVANOV quien en 1917

señaló la existencia de organismos en el semen, capaces de transmitir infecciones, este mismo autor agregó ciertos compuestos químicos con fines bactericidas obteniendo resultados desfavorables. (15).

En 1939 SALISBURY pone especial atención al estudio de los gérmenes contaminantes del semen, que pudieran acarrear problemas en el proceso de conservación del mismo. (15) (20).

El efecto de las sulfas y antibióticos sobre la fertilidad del semen y la inhibición de crecimiento bacteriano en el mismo, ha originado múltiples investigaciones. (20).

El uso de antibióticos en el semen diluido, demostró un aumento de la fertilidad. ALMQUIST en 1947 encontró que 100 microgramos de estreptomina por ml. de semen diluido fueron capaces de inhibir el desarrollo bacteriano, pero descubrió también que niveles mayores de 1250 microgramos del antibiótico por ml. del semen diluido originaron una marcada disminución en la viabilidad del mismo, esto lo observó aumentando en forma paulatina la cantidad de antibiótico hasta llegar a la dosis perjudicial. (15).

Pruebas efectuadas con el fin de determinar la acción de la neomicina, clorotetraciclinas y cloranfenicol, produjeron resultados poco halagadores en lo que se refiere a inhibición de crecimiento bacteriano en semen diluido. (7) (21).

Los estudios de GUSALUS en 1941 considera a *L. Pseudomona aureginosa* como factor importante en la baja de fertilidad. (12).

El efecto de las bacterias hemolíticas sobre la viabilidad del semen, fue estudiado y se demostró que dichos gérmenes fueron capaces de disminuir la motilidad de los espermatozoides mantenidos en conservación. (7) (19).

BUSH en 1950 demostró una correlación entre fertilidad y número de -- bacterias. Entre los reportes más recientes encontramos las investigacio -- nes de CHOUUDORY y De B.N. en 1965 señalando la existencia de *Corynebacte -- rium*, *Streptococos*, *Estafilococos* y *Proteus* en el semen. (2) (5)

También hay estudios sobre el aislamiento de virus en 1970, reportán -- dose diferentes tipos de ellos. (1)

En lo que se refiere a la congelación, se descarta la posibilidad -- de que los gérmenes mueran a la temperatura de menos 196° C., que es la -- del Nitrógeno líquido, en el cual se almacenan las ampollitas, ya que se -- ha visto que las bacterias sobreviven perfectamente en este medio.

Debido a esto la posibilidad de que se encuentren bacterias en el se -- men bovino es bastante grande. (13) (19).

Durante el desarrollo del trabajo se dará especial atención a lograr -- el aislamiento de *Brucella abortus* y *Campylobacter (Vibrio) foetus*, aunque -- tomará en cuenta cualquier tipo de aislamiento que se logre.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

CRISTALERIA:

- Cajas de Petri
- Tubos de cultivo (5 y 10ml)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Matraces Erlen Meyer de 500 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Frascos para anaerobiosis (velobiosis)
- Tubos de ensayo, tapón de baquelita de 20ml.

MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar cistelna corazón
- Caldo thioglicolato
- Caldo PPLO
- Agar PPLO
- Agar gelosa sangre
- Staff 110
- Caldo nutritivo
- Mueller Hinton
- Tripticasa soya agar
- Caldo selenite
- Agar verde brillante
- Medios selectivos en tubo:

{
 Sim
 Agar citrato de Simons
 Urea agar base
 Agar TSI (triple
 azúcar hierro).

REACTIVOS:

- Peróxido de hidrógeno (prueba catalasa)
- Acetato de talio
- Telurito de potasio
- Carbohidratos para pruebas bio-
químicas.
- Indol.

{
 Arginina
 Glucosa
 Lactosa
 Maltosa
 Sucrosa
 Trehalosa
 Salicín

TINCIONES:*Gram y Giemsa.***OTROS MATERIALES:***Microscopio estandar de laboratorio.**Asas de platino (punta recta y redonda)**Vela de parafina**Estufa de cultivo bacteriológica**Autoclave**Masking tape**Etiquetas engomadas**Báscula de 2610 grs.**Lápiz graso**Mechero Bunsen**Thermo criogénico LR-21**Nitrógeno líquido**Suero de equina estéril**Sangre completa de bovino estéril**Lupa**Agujas vacutainer.***MATERIAL BIOLÓGICO:***40 ampollitas de semen congelado, de 6 diferentes centros de Inseminación Artificial.*

Al medio PPLO líquido se le añadió por cada 100 ml. lo siguiente:

Acetato de talio: 0.1 gr.

Suero equino: 10 ml.

En el medio de Thioglicolato usado para la resiembra del Agar cistelna corazón se le agregó por cada 100 ml. lo siguiente:

Cloruro de sodio: 3.5 gr.

Glicina: 1 gr.

Al medio Agar cistelna corazón por cada 400 ml lo siguiente:

Sangre de bovinos: 10 ml.

Verde brillante: .001 gr.

Las cajas de Petri, matraces, pipetas, tubos de ensayo, así como los medios de cultivo a excepción del Selenite, se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos, a 15 libras de presión y a 121° C. Después se procedió a hacerles la prueba de esterilidad a los medios de cultivo dejándolos 24 horas, en la estufa bacteriológica de cultivo, antes de utilizarlos en las pruebas para el semen.

El caldo selenite una vez rehidratado se sometió a calentamiento, evitando la ebullición, luego se le hizo la prueba de esterilidad. Después de probar la esterilidad de los medios de cultivo se pusieron en refrigeración para su posterior utilización, con excepción del caldo thioglicolato que se deja a medio ambiente.

Técnica para la tinción de Gram:

1. Se toma un portaobjetos y se limpia con alcohol.
2. Calentarlo o flamearlo en el mechero.

3. Hacer un círculo con lápiz graso y poner dentro de él una gota de agua destilada. (En caso de ser medio líquido no se agrega agua destilada).

4. Tomar una muestra de la colonia con el asa de punta redonda y homogeneizarla con el agua destilada.

5. Flamear hasta secar.

6. Agregar cristal violeta por 2 minutos.

7. Lavar con agua corriente.

8. Agregar lugol para fijar las bacterias Gram (+) por 1 minuto.

9. Lavar con agua corriente.

10. Decolorar con alcohol acetona (meter y sacar).

11. Lavar con agua corriente.

12. Agregar safranina al 2% por 15 segundos (colorante de contraste. -
Tiñe las Gram Negativas).

13. Secar.

14. Observar al microscopio en inmersión en aceite.

Técnica para la tinción de Giemsa:

1. Al 5 son iguales que en la tinción de Gram.

6. Fijar la extensión en alcohol metílico durante 3 a 5 minutos.

7. Secar al aire.

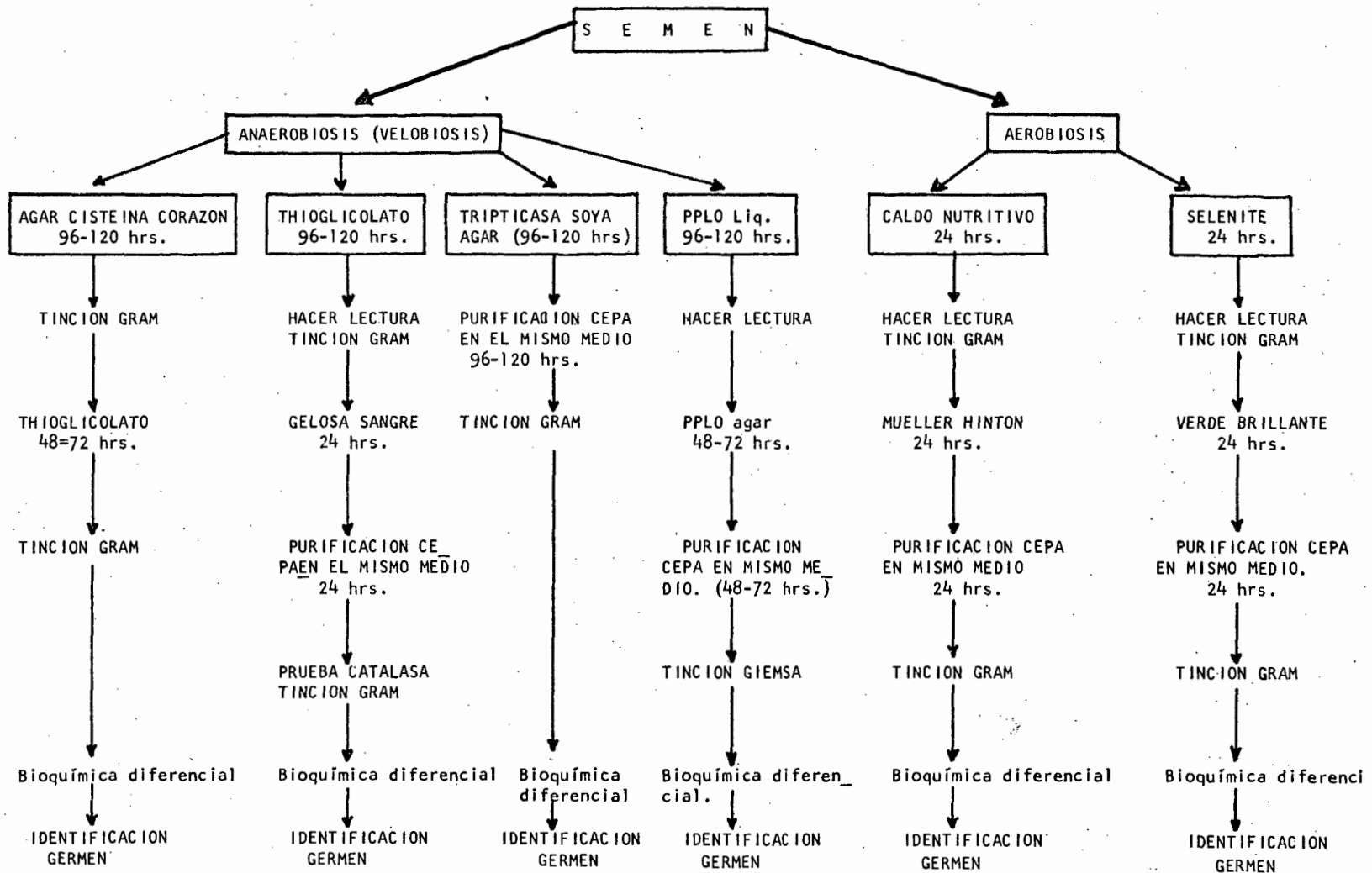
8. Sumergir en el colorante de Giemsa diluido durante 20 a 30 minutos.

9. Lavar con agua destilada.

10. Poner vertical para secar.

11. Observar al microscopio en inmersión en aceite.

ESQUEMA DE LA METODOLOGIA GENERAL



RESULTADOS

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA01990

Autor:

Gonzalez Vazquez Rodrigo

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Folios Faltantes No. 13 y 14

R E S U L T A D O S

CANADA:

O.A.;A.B.

A-1	THAMES CREST MARQUIS	(+)	<i>Pseudomona</i> spp
A-2	Glenbrook Starbrook	(+)	<i>Pseudomona</i> spp
A-3	Browndale Orbit	(+)	<i>Pseudomona</i> spp
A-4	High Silo haven Master Red	(+)	<i>Escherichia coli</i>
A-5	Zeldenrust Pontiac deligth	(-)	
A-6	Roycedale reflection	(-)	
A-7	Weaver Maple Leader	(-)	

ESTADOS UNIDOS:

CARNATION.

B-1	Paclamar Goliath	(-)	
B-2	Willard Astronaut	(-)	
B-3	Dunwood R.A. Pride	(+)	<i>Proteus mirabilis</i>
B-4	Rwjs Du vat General	(-)	
B-5	Elv Reflexion Winner	(-)	
B-6	9928 (055) 1347448	(-)	
B-7	Diamond Orion Zest	(-)	
B-8	Spring Valley Rollo	(-)	

A B S

E-1	Utag Ivanhoe Ultimate	(+)	<i>Pseudomona</i> spp.
E-2	Citation R Maple	(-)	
E-3	Paclamar Bootmaker	(-)	
E-4	Arlinda Forty nine Starr	(+)	<i>Escherichia coli</i>
E-5	Homo Wis Burke Memorij	(-)	

CURTIS

D-1 Midrock King Oscar	(-)	
D-2 Arlinda Chief Diplomat	(-)	
D-3 Locombe Bandit	(+)	<i>Escherichia coli</i>
D-4 Glenahton Charm	(-)	
D-5 High Meadow farm sky high	(-)	

MEXICO :

S.A.G.

C-1 Dunlea Carnation Sinus	(+)	} <i>Corynebacterium pyogenes</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomona spp.</i>
C-2 Meadow Lee Majority	(+)	
C-3 Chiconave	(-)	
C-4 Don Head Glad Linesman (Jersey)	(+)	<i>Escherichia coli</i>
C-5 C.M.I. Gavilan	(-)	
C-6 Oak Ridges Regal Lucky	(-)	
C-7 Dunlea Mejar Inka Ray	(-)	
C-8 Welcome in Joans Supreme	(-)	
C-9 Sag Leroy	(-)	
C-10 Coastal D. Plato.	(-)	

MEXICO - CANADA:

M.I.N.S.A.

F-1 S. Mónica Moro H. Marquis	(-)	
F-2 Bunsow Citation Apolo	(+)	<i>Pseudomona spp.</i>
F-3 S. Mónica Herdsman Marquis.	(-)	
F-4 S. Mónica Greenhope Crisscross	(-)	
F-5 North Leeds Prince	(-)	

PORCENTAJE DE AISLAMIENTO.

AISLAMIENTO TOTAL: 30%

PORCENTAJE DE AISLAMIENTO POR CENTROS DE INSEMINACION ARTIFICIAL:

(A) - O.A.A.B. (Canada)	57.14%
(E) A B S (E.U.A.)	40.00%
(C) S.A.G. (México)	30.00%
(D) CURTIS (E.U.A.)	20.00%
(F) M.I.N.S.A. (México-Canada)	20.00%
(B) Carnation (E.U.A.)	12.50%

PORCENTAJE POR AISLAMIENTOS:

<i>Pseudomona spp.</i>	50.00%
<i>Escherichia coli</i>	28.58%
<i>Proteus vulgaris.</i>	7.14%
<i>Proteus mirabilis</i>	7.14%
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	7.14%
	<hr/>
	100.00%

DISCUSSION

D I S C U S I O N

Este trabajo se efectuó con 40 ampollitas de semen congelado de 6 - Centros de Inseminación Artificial diferentes, tanto nacionales como ex -- tranjeros.

CASOS A-1, A-2, A-3, C-1, C-2, E-1, F-2:

En el medio de verde brillante las colonias eran grandes, redondas, - de bordes regulares, convexas, mucoides y un poco grisáceas. Hubo viaje - en el medio a un color rojo; por estas características se sospechó de PSEU DOMONA spp. y para su confirmación se resembró en medios selectivos: Sim, - Citrato de Simons, Urea agar, TSI, con los resultados siguientes:

Sim: Motilidad (+)

Indol (-)

Citrato de Simons: (-)

Urea agar (-)

TSI (-)

En todos los casos anteriores el germen aislado fue Gram (-).

En el caso C-1 creció primero en gelosa sangre (anaerobia), produ - ciendo una hemólisis beta y un pigmento verdoso, se resembró en verde bri llante y de éste a medios selectivos, con el resultado antes mencionado - (Pseudomoná spp).

CASOS A-4, C-4, D-3, E-4:

El germen aislado en estos casos fue Gram (-). Colonias blancas, pe - queñas, circulares, brillantes, de borde continuo, húmedas; el medio de -- verde brillante viró a un color verde; sospechándose de ESCHERICHIA COLLI-

y para su confirmación se sembró en medios selectivos, dando los siguientes resultados:

Sim:	Motilidad	(-)
	Indol	(+)
	Citrato de Simons	(-)
	Urea agar	(-)
	TSI	(-)
	Glucosa	(+)

El caso A-4 creció en gelosa sangre, resemebrándose en verde brillante y dando los mismos resultados.

CASO B-3:

Hubo crecimientos en verde brillante, colonias pequeñas, blanquecinas, circulares, Germen Gram (-). Se sembró en medios selectivos con el siguiente resultado:

Sim:	Motilidad	(+)
	Indol	(-)
	Citrato de Simons	(-)
	Urea agar	(+)
	TSI	(+)
	Glucosa	(+)

Por ello se sospechó de *PROTEUS MIRIABILIS*.

CASO C-1:

También creció en verde brillante dando el mismo tipo de colonias que el anterior. Gram (-).

Se sembró en medios selectivos dando lo siguiente:

Sim:	Motilidad	(+)
	Indol	(+)
	Citrato de Simons	(-)
	Urea agar	(+)
	TSI	(-)
	Glucosa	(-)

Resultado del caso C-1: *PROTEUS VULGARIS*.

CASO C-1:

Aparte de haber crecido en verde brillante como se dijo anteriormente, este también creció en agar cisteína corazón, siendo el germen Gram (+), - se hizo resiembra en gelosa sangre con telurito de potasio y Staff 110 habiendo crecimiento en telurito y dando colonias pequeñas, lisas de color café oscuro, por esto se sospechó de *CORYNEBACTERIUM PYOGENES* y para corroborarlo se hizo bioquímica diferencial con los siguientes resultados:

Catalasa	(-)	Sucrosa	(+)
Urea	(-)	Trehalosa	(-)
Glucosa	(+)	Salicín	(+)
Lactosa	(+)	Arginina	(+)
Maltosa	(+)		

Aunque no se aisló *Campylobacter (vidrio) foetus*, ni *Brucella abortus*, los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con las publicaciones de diversos autores [5] [7], en lo referente a tipos bacterianos, aislándose: *pseudomona*, *Escherichia*, *Corynebacterium* y *Proteus*.

De acuerdo con la opinión de varios autores, la presencia de gérmenes del tipo *Corynebacterium*, *Escherichia* y *Pseudomona*, en el semen bovino, puede originar alteraciones a los espermatozoides y aparato genital del macho, tales como: orquitis, vesiculitis, epididimitis, disminución en el grado de motilidad [7] [19] y pérdidas considerables en el porcentaje de fertilidad [12] [15].

• Los problemas que acarrearía en la hembra la realización de la Inseminación Artificial, empleando semen contaminado, pueden ser desde abortos, así como casos de metritis, vaginitis y cervicitis [17] [19].

Como puede observarse, a través de los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos reflejan que sí existe una contaminación bacteriana en el semen congelado de ganado bovino lechero. Dejando abierto el campo para que en futuras investigaciones, se estudie la relación que tal vez exista entre estos gérmenes y algunas entidades patológicas que afectan la función reproductora de las hembras o que causen problemas en animales neonatos de tan importante especie, como lo es el bovino lechero.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. Del total de muestras trabajadas nos demuestran que un alto porcentaje (30%) presentan contaminantes.
2. Los gérmenes aislados fueron tanto Gram (-) como Gram (+).
3. Dentro de los gérmenes aislados el de mayor incidencia fue PSEUDOMONA spp. con 50.00 % siguiéndole *Escherichia coli* con 28.58% y al final con 7.14% el *Proteus Miriabilis*, *Proteus Vulgaris* y *Corynebacterium Pyogenes*.
4. En ninguno de los casos fue posible el aislamiento de patógenos del tipo *Brucella abortus* o *Campylobacter foetus*.

SUMARIO

SUMARIO

Se muestrearon 40 ampolletas de semen congelado y de seis diferentes Centros de Inseminación Artificial, de México, Canadá y Estados Unidos.

Se hicieron siembras bacteriológicas utilizando medios de cultivo diferentes, tanto para gérmenes Gram positivos como para Gram negativos.

Se demostró la presencia de contaminantes con predominancia muy marcada de Gram negativos, (*Pseudomona* y *Escherichia coli*).

El porcentaje total de contaminación fue de 30%.

Los gérmenes aislados en orden de importancia fueron:

<i>Pseudomona</i> spp.	50.00%
<i>Escherichia coli</i>	28.58%
<i>Proteus vulgaris</i>	7.14%
<i>Proteus mirabilis</i>	7.14%
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	7.14%

La identificación de los gérmenes se llevó a cabo por medio de las características morfológicas de las colonias, diferenciación bioquímica, tinción de Gram y reacciones en medios selectivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Branny and Zembala M, 1970. "Some Characteristics of viruses isolated from bull semen and their possible pathogenicity".
Br. Vet. J. 127: 86-91
2. Bush, L.J. 1950. "The effect of bacteria on the fertility of bovine semen". J. Dairy Sci. 33: 633-638
3. Bryner, A.B. and Frank A.H. 1955. "Laboratory Techniques for isolation of vibrio from cattle". Am. Vet. J. Res. 16:634-635
4. Carter, G.R. 1973. Diagnostic Procedure in Veterinary Microbiology. Second edition. p. 46-59, 31-37, 110-114, 38-41, 77-82, 187-196. - Illinois, U.S.A.
5. Choudory, T.M. and De B.N. 1965. "Bacterial flora of bovine semen" Indian Animal Health. 4: 27-31
6. Difco Manual of Dehydrated culture media and reagents for Microbiological and Clinical Laboratory procedures.
Ninth Edition Difco Laboratories
Detroit, Michigan, U.S.A.
7. Edmonson, J.E. and H.A. Herman, 1948. "A study of the types of bacteria and their effect upon motility". J. Dairy Sci. 31:681
8. FAO. Prepared by the legislation Research Branch in cooperation -- with the Animal Health Branch. 1966. Movement of Animal semen -- international trade. Animal Health Branch Monograph No. 8: 22-25, 129-134.
9. Flores, C.R. y Ruiz, D.R. 1975. Diagnóstico y control de la vibriosis genital bovina en un hato de ganado productor de carne. Técnica pecuaria. 29: 21-24
10. Fuentes, V.P. 1974. Notas de Farmacología. 1ra. parte. p. 52-69. - México, D. F. UNAM.
11. Gibbons, Catcott, Smithcors. 1970. Bovine Medicine and Surgery -- First edition. p. 689-695, 91-104, 655-659. Wheaton, Illinois, -- U.S.A. American Veterinary Publications, Inc.
12. Gusalus, I.C. 1941. "The bacteriology of bull semen". J. Dairy Sci. 24: 911-919

13. J.M. López Gutiérrez
Tesis Profesional
"Efectos de la criopreservación sobre algunas cepas bacterianas --
con Nitrógeno líquido".
Guadalajara, Jal. 1976
14. Manual Merck de Veterinaria, 1970. Primera edición. págs. 645-652-
Rahway, N.J. E.U.A. Editado por Merck and Co., Inc.
15. Maule, J.P. 1962. The semen of Animals and Artificial Insemination.
First edition. p. 97-108. England, Commonwealth Agricultural, Bu ---
reaux.
16. Mc Donald, L.E. 1971. Reproducción y Endocrinología Veterinaria --
Primera edición. págs. 271-317. México. Interamericana.
17. Merchant y Packer. 1970. Bacteriología y Virología Veterinaria --
Tercera edición. págs. 263-267, 285-290, 440-443, 328-340, 248-257,
222-239. España. Editorial Acribia.
18. M.V.Z. Merlos Castañeda Aquiles
Comunicación Personal
19. Roberts, S.J. 1956. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases --
First edition. p. 46-59, 31-37, 225-232, 234-240, 301-327, 367- -
383, 501-502. Michigan, U.S.A. Edwards Brithers Inc.
20. Salisbury, G.W. 1947. "The effect of sulfanilamide in the diluent
upon fertility of bull semen". J. Dairy Sci.
30: 361-369
21. Salisbury, G.W. and Vandermark, N.L. Physiology of Reproduction -
and Artificial Insemination of cattle. First edition. p. 402-406.
San Francisco, Cal. U.S.A. W.H. Freeman and Company.
22. Zinsser. 1967. Microbiología. 13a. edición, págs. 140-171.
México. UTEHA.