

APROXIMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA PARA MEDIR Y ENTENDER EL ABORTO BOVINO

Jorge Zambrano-Varón DVM, MPVM, Ph. D.¹

Mark C. Thurmond DVM, MPVM, Ph. D.²

¹ Clínica de la Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

² Department of Medicine and Epidemiology, School of Veterinary Medicine, University of California.

RESUMEN

El objetivo del presente artículo es ilustrar algunos métodos para medir la tasa de aborto en bovinos. Así mismo, se describirán algunas de las asociaciones que se han encontrado entre aspectos demográficos, características reproductivas y la subsecuente presentación de aborto. El método de las tablas de vida permite calcular el riesgo de pérdida fetal (aborto) en unos intervalos predefinidos (ej. días o meses) durante la gestación, y la proporción de vacas que abortan. Por otro lado, el método de la densidad de aborto permite calcular el riesgo de aborto en un período calendario definido (ej. por mes) como una medida del número de abortos durante los días en que la vaca estuvo a riesgo. Ambos métodos estandarizan la información y toman en cuenta el cambio en el número de vacas a riesgo de abortar ya que excluye aquellas que ya no lo están porque fueron vendidas, murieron, abortaron o parieron; por ello proveen un resultado más alto, pero también más real de lo que normalmente se calcula. Estas medidas y modelos estadísticos han sido utilizados para calcular la magnitud esperada de aborto en fincas lecheras (cuyo rango varía entre 8-19%) y también para identificar asociaciones entre factores demográficos o características reproductivas de la vaca y el subsecuente riesgo de aborto. Algunos de esos factores serán discutidos incluyendo el efecto de abortos anteriores, número de partos y edad, días abiertos al momento de la concepción y el efecto de la estación. Otros métodos analíticos de utilidad también serán presentados para el diagnóstico de hato de aborto relacionado con la exposición a agentes infecciosos o a otros factores. Estos métodos permiten estimar el riesgo o la proporción de abortos atribuibles a la exposición a un agente infeccioso o a cualquier otro agente que pueda producir aborto.

Palabras clave: epidemiología, aborto bovino, tablas de vida.

EPIDEMIOLOGIC APPROACHES FOR MEASURING AND UNDERSTANDING BOVINE ABORTION

ABSTRACT

The purpose of the paper is to offer methods for use in measuring abortion rates and in undertaking abortion diagnostic investigations. In addition, some of the associations found between demographic and reproductive features of the dam and subsequent abortion will be described. The cohort life table method calculates the risk of fetal loss (abortion), for

1 jlzambranov@unal.edu.co

2 mcthurmond@ucdavis.edu

pre-defined time intervals (eg. days or weeks) during the gestation period, and the overall proportion of cows that abort. In contrast, the abortion density method calculates abortion risk for a defined calendar time (eg. per month) as the number of abortions per cow-days-at risk. Both methods are standardized to account for the changing number of cows at risk of abortion, as a result of culling, death, abortion, and calving, thus tend to produce higher, but more realistic, estimates for abortion than rates typically calculated. These measures and statistical modeling have been used to estimate the expected magnitude of abortion for dairies (ranging from 8% to 19%) and to identify associations between demographic or reproductive features of the dam and subsequent risk of abortion. Some of the factors to be discussed include effects of a previous abortion, dam gravidity and age, days open at the time of conception, and season. Analytic methods also will be presented for herd-based diagnosis of abortion related to infectious agents or other exposures. These methods permit estimates of the risk or proportion of abortions attributable to exposure to an infectious agent or to other putative abortifacient exposures.

Key words: Epidemiology, bovine abortion, life tables.

INTRODUCCIÓN

El aborto bovino continúa generando pérdidas económicas importantes tanto en ganaderías de leche como de carne. En fincas lecheras con manejo intensivo, el índice de aborto ha sido calculado entre el 8% y el 19% (1-4). Infortunadamente cuando se realizan estos cálculos al investigar los problemas del aborto, no se han aplicado medidas estandarizadas que permitan estimar la magnitud del aborto de manera adecuada, de tal forma que se pueda comparar entre hatos. En general, se reportan datos crudos, principalmente porcentajes, en los cuales el denominador no siempre incluye la población de vacas a riesgo y tampoco el periodo específico en que la pérdida gestacional ocurre, esto ha afectado la capacidad de comparar entre fincas y también de comenzar a entender los eventos y la naturaleza multi-causal del aborto en las ganaderías. El objetivo del presente artículo es ilustrar una metodología epidemiológica para calcular las tasas de aborto en hatos lecheros que pueda ser utilizada por el médico veterinario como herramienta dentro de las rutinas de investigación de los problemas de aborto.

MÉTODOS PARA MEDIR LA TASA Y EL RIESGO DE ABORTO

Se presentan a continuación dos métodos para medir el riesgo y las tasas de aborto. En el primero se describe el uso del método de las tablas de vida en estudios de cohorte, este método permite estimar la proporción acumulada de las vacas que abortan (o de los fetos que mueren), y el riesgo de que una vaca aborte en cualquier momento de la gestación (1, 2, 5, 6). El segundo método permite calcular el riesgo del aborto en un período específico de tiempo (Ej. el mes o el año o el tercio de la gestación), a través del cálculo de la incidencia o la densidad acumulada del aborto (2). Ambos métodos proporcionan un acercamiento estandarizado para medir las tasas de aborto, en ambos casos es necesario ajustar la población con base en el cambio en el número de vacas a riesgo de abortar en un cierto periodo del tiempo. Este ajuste permite realizar un análisis más acertado ya que permite evaluar periodos de riesgo específicos durante el curso de la gestación, así mismo es útil para establecer problemáticas y para definir los patrones de presentación de aborto durante el año.

MÉTODO DE LAS TABLAS DE VIDA

Una tabla de vida es un modelo teórico que describe numéricamente el proceso de extinción de una población. Permite determinar las probabilidades de sobrevivir o de morir a una edad o en un momento de riesgo determinado. El método de las tablas de la vida (7) será ilustrado construyendo una tabla de supervivencia fetal. Las tablas de vida utilizan datos actuales del hato para proyectar la tasa total de la supervivencia fetal (lo contrario de la tasa del aborto) y proporcionar un estimativo de los períodos del alto riesgo aborto durante la gestación. Los datos necesarios para construir la tabla de vida se obtienen de todas las vacas que se han diagnosticado preñadas en un determinado intervalo de tiempo específico. Por ejemplo, la tabla se puede utilizar para medir tasa de supervivencia fetal de todas las vacas preñadas diagnosticadas el último año, o de todas las vacas que estaban preñadas durante el año anterior. La siguiente es la información requerida por cada vaca para ser incluida en la tabla de la vida:

- a. Tiempo de preñez (TDP) al momento del primer diagnóstico de gestación.
- b. TDP al momento en que se supone que ocurrió la muerte fetal.
- c. TDP cuando la vaca murió, fue descartada, o se perdió durante el seguimiento por cualquier razón.
- d. TDP al momento del parto de la vaca.

Aunque este método se conoce como tabla de la vida fetal, realmente lo que evalúa es la pérdida gestacional que ocurre en el periodo de tiempo que existe entre el diagnóstico de gestación y el parto o el aborto. Este método permite analizar de manera más certera la información concerniente a pérdidas gestacionales en intervalos de tiempo específicos así: pérdidas embrio-

narias (<45TDP), pérdidas fetales (45-260 TDP), y partos prematuros (>260 TDP) (8).

Se debe tratar de recolectar toda la información sobre el tipo de pérdida fetal, incluyendo los abortos que se hayan podido observar directamente, así como las pérdidas que se hacen evidentes al encontrar vacas vacías que habían sido previamente diagnosticadas como preñadas. También se debe prestar atención e incluir la información de aquellas vacas que presentan preñeces cuyos fetos parecen ser de menor edad y tamaño de lo que había sido estimado previamente, o también aquellas cuyo tiempo de gestación parece ser menor comparadas con la fecha de la inseminación. En la práctica, la detección de la mayoría de los abortos se hace de 1 a 3 meses después de su ocurrencia real, por lo tanto, a menudo no es posible obtener la fecha exacta de la muerte fetal. Es importante, sin embargo, que la fecha de la muerte fetal sea calculada tan cerca de lo real como sea posible, así sea un estimativo retrospectivo, y que la fecha de diagnóstico del aborto no sea utilizada para calcular el TDP en momento del aborto (a menos que el aborto haya sido observado realmente). De este modo se puede establecer una mejor aproximación para estimar el momento al cual ocurrió el aborto con relación a un período específico de la gestación, lo cual elimina considerablemente el sesgo que presenta cuando se toma la fecha del diagnóstico del aborto ya que esta última genera un intervalo adicional de 1 a 3 meses el cual no corresponde a la fecha en que la muerte fetal ocurrió. Adicionalmente se debe considerar que muchos programas de computador como por ejemplo el DHIA (Dairy Herd Improvement Association), utilizan la regla de los 152 días para calcular la fecha del aborto de manera automática una vez la información del aborto entra en el sistema. Esto implica que si una vaca

en lactancia aborta antes del día 152 de la gestación, su información permanecerá en el sistema sin interrupción, y el programa ajustará la fecha del aborto a los 152 días, es decir que no registra el evento de aborto como si se iniciara una nueva lactancia, ya que la misma no se interrumpe. Por esta razón esta fecha no debe ser considerada para reemplazar la fecha del momento verdadero del aborto, en tal caso, las tasas de aborto así calculadas resultarán sesgadas y producirán resultados equívocos. Algunas pautas (basadas en la experiencia del trabajo de hato) para determinar cuándo ocurrió la muerte fetal incluyen: a) después de ocurrir el aborto puede darse una nueva concepción en promedio 1,5 ciclos después del celo observado luego del aborto, en lotes de vacas manejadas por monta natural, de esa forma la fecha aproximada del aborto puede ser obtenida al estimar el tiempo de preñez es decir la fecha de concepción de la nueva gestación, b) la involución uterina ocurre típicamente durante las siguientes 3-4 semanas que siguen el aborto, a menor tiempo de gestación más rápida será la involución del útero (9). Los médicos veterinarios deben desarrollar sus propias pautas y criterios para calcular la fecha del aborto de manera confiable, ya que esta información solo puede ser obtenida de sus propios resultados de palpación, así mismo, la calidad de la misma dependerá de la disciplina en la búsqueda de los problemas y de los tiempos predeterminados por el profesional para re-examinar vacas durante el periodo de gestación. Es recomendable por ello dentro de la rutina de diagnóstico reproductivo de los hatos, luego de haber realizado un diagnóstico de gestación inicial entre el día 35-60 (o antes si se utiliza ultrasonido), re-examinar los mismos animales entre los días 120-150 y finalmente antes del secado del animal, esto permite evaluar la viabilidad de la gestación o detectar pérdidas de la misma

en intervalos de tiempo específicos, lo cual facilita el análisis.

Los datos sobre el TDP indicados anteriormente para cada una de las vacas se incluyen en la tabla de vida utilizando intervalos específicos de la gestación. Estos intervalos pueden ser muy amplios (Ej. 30-40 días) o muy cercanos (de 1 a 2) dependiendo del número de las vacas incluidas en la tabla. En el caso de los hatos pequeños con relativamente pocas vacas, se deben utilizar intervalos más amplios, de otra forma no será posible realizar un estimativo general de los grupos de riesgo gestacional debido a la falta de datos en la mayoría de los intervalos. Intervalos de rangos más pequeños se pueden utilizar para los hatos con un mayor número de vacas. Sin embargo, el intervalo usado en la práctica profesional debe ser constante para poder comparar tasas y patrones del aborto entre los hatos. A continuación se realizará una descripción de la forma como se debe construir de cada una de las columnas que constituyen la tabla de la vida (Tabla 1):

Construcción de la tabla de vida

i: Número del intervalo: $i=1$ es el primer intervalo de tiempo gestacional donde $i=4$ es el cuarto intervalo. El número de días en el intervalo en este ejemplo fue fijado aquí en 35 por la conveniencia de la ilustración.

n: Número de vacas preñadas que comienzan cada intervalo. Las vacas se deben incorporar al intervalo al momento en que se diagnostica la preñez. Así, si la preñez de una vaca fue diagnosticada a los 70 días, sus datos serán incluidos en el intervalo del día 66-100. Por la simplicidad, se asumió que las preñeces de todas las vacas en este ejemplo fueron diagnosticadas en el primer intervalo.

a: Número de vacas que abortó o el número de los fetos que murieron en cada

intervalo. La designación aquí asume una estimación razonable de la fecha real de la muerte fetal como se discutió anteriormente.

c: Número de animales que fueron censados (eliminadas) durante el intervalo.

Esto representa las vacas que murieron, se perdieron del seguimiento, fueron descartadas, o cuya gestación no había avanzado más allá de este intervalo. El ejemplo dado aquí se simplifica para excluir las vacas preñadas que no habían avanzado más allá de un período dado de la gestación. Se asume que en promedio las vacas censadas durante el intervalo están a riesgo de abortar solamente durante la mitad del intervalo. Al indicar esto en términos del número de vacas, solamente se considera que la mitad de las vacas está a riesgo de abortar durante el intervalo entero.

r: Número de vacas a riesgo de abortar durante el intervalo.

Este número representa un ajuste a "n" que considera que las vacas censadas pasan solamente la mitad de su tiempo en el intervalo. Se calcula como: $r = n - \frac{1}{2}c$

q: Proporción de las vacas a riesgo de abortar en el intervalo y que **realmente abortan** durante el mismo, y se calcula como $q = a/r$.

p: Proporción de las vacas a riesgo de abortar **que no abortan** en el intervalo. Se calcula como: $p = 1 - q$

h: Incidencia o el riesgo del aborto durante el intervalo (designado a veces como el riesgo o peligro). Asume que las vacas que abortan lo hacen en promedio a medio camino del intervalo, o que las vacas están a riesgo de abortar solamente durante medio intervalo, así: $h = a/(r - \frac{1}{2}a)$.

S: La proporción acumulada de las vacas que continúan preñadas al comenzar

el intervalo (o que seguían gestantes al final del intervalo anterior). Este valor representa una medida de la supervivencia total de los fetos. El valor de S para el primer intervalo es por definición 1,0. Si se calcula como $S_{i-1} \times p_{i-1}$, indicando que la proporción que sobrevive hasta el principio de un intervalo es la proporción que sobrevivió desde el inicio de los intervalos previos por la proporción de aquellos que sobrevivieron durante el intervalo anterior.

La tabla de la vida a continuación presenta un ejemplo del tipo de datos que estarían disponibles históricamente de las vacas por presentación de abortos, muertes, o descartes, y aquellas que llevaron su gestación a término. Los valores del primer intervalo asumen que el diagnóstico de preñez fue realizado por palpación rectal; los intervalos pueden comenzar más temprano si se utiliza ultrasonido para diagnóstico temprano de gestación. Una tabla de tiempo real puede utilizarse como variación de esta tabla, en la cual se incluyen todas las vacas que se encuentran preñadas actualmente, es decir, aquellas vacas preñadas que no han parido o abortado. En este caso las vacas preñadas deben ser eliminadas de la columna (c), indicando el TDP para la fecha de hoy para cada vaca. En este caso el número de las vacas censadas aumentaría para cada uno de los intervalos de la gestación.

La tasa específica de aborto se calcula como $1 - P$ para el intervalo anterior. En esta ilustración, la tasa del aborto es $1 - 0,807$ o 19,3%. Es importante anotar que si se calcula la tasa de aborto considerando solamente 18 vacas de 100 vacas que abortan entonces la tasa de aborto sería del 18%. Si no se realizara el ajuste necesario tomando en cuenta las vacas censadas en el curso de la gestación, así como aquellas vacas que ya no están a riesgo porque abortaron, se obtendría un índice artificial y de un valor menor al

real. En este caso, el aborto se habría subestimado en un 6,7% ($\{0,193-0,180\} / 0,193$), comparado con el valor obtenido en la tabla de la vida. El cálculo del riesgo del aborto para cada período (h) se puede graficar para determinar el periodo de mayor riesgo de muerte fetal (figura 1). Esta información es muy útil para orientar el proceso de investi-

gación, ya que permite definir el grupo de animales que se encuentran en mayor riesgo de abortar para ser muestreados con fines de diagnóstico. Con base en lo obtenido en la tabla 1 y en la figura 1, el riesgo de muerte fetal en esta ilustración hipotética es el mayor durante el segundo tercio de la gestación específicamente hacia el quinto mes.

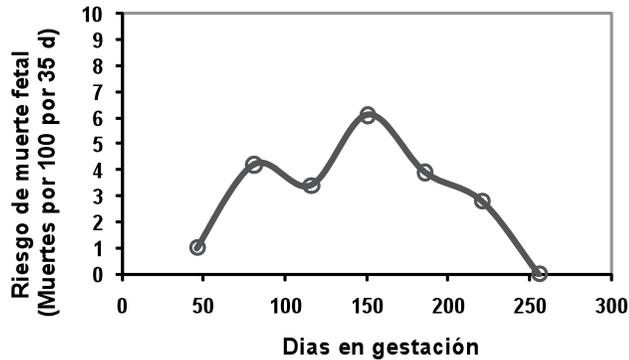


Figura 1. Estimativo del riesgo de muerte fetal durante el curso de la gestación para un grupo hipotético de vacas preñadas usando una tabla de supervivencia fetal (ver también la tabla 1)..

Tabla 1. Tabla de vida para calcular tasa de aborto, supervivencia fetal, y riesgo de aborto para un grupo hipotético de 100 vacas.

Intervalo (TDP) (i)	No. Preñadas (n)	No. Abortos (a)	No. Pérdidas (c)	No. a Riesgo de abortar (r)	Proporción Abortando (q) ¹	Proporción no Abortando (p) ²	Riesgo Aborto (h) ³	Proporción acumulada no Abortando (P) ⁴
31-65	100	1	2	99	0,01	0,989	0,01	1
66-100	97	4	1	96,5	0,041	0,959	0,042	0,989
101-135	92	3	3	90,5	0,033	0,967	0,034	0,948
136-170	86	5	2	85	0,059	0,941	0,061	0,917
171-205	79	3	2	78	0,038	0,962	0,039	0,863
206-240	74	2	3	72,5	0,028	0,972	0,028	0,83
241-275	76	0	1	75	0	1	0	0,807

1 $q=a/r$

2 $p=1-q$

3 $h=a/(r-1/2a)$

4 $P = P \times p$

En este ejemplo la tasa promedio de aborto se indica como 1-P, o 1-0,807 = 0,193 (19,3%)

MÉTODO PARA CALCULAR EL ÍNDICE DE ABORTO

El método de la densidad de aborto se usa para calcular el índice o la tasa de aborto por preñez/vaca/día para un periodo de riesgo definido (meses/vaca, o vaca/años a riesgo). Se debe entender que el denominador cambia dependiendo del número de vacas que se encuentran a riesgo de abortar, de esta forma ajusta el denominador ya que no deben ser incluidas en los cálculos todas aquellas que ya no lo están a riesgo porque murieron, fueron descartadas o vendidas, igualmente las que abortaron y las que ya han parido. Como un ejemplo supongamos que hubo 5 abortos en un mes, y que la suma de todos los días de las vacas preñadas durante el mes era 1200. El índice de aborto sería entonces:

El número de abortos= $5/12.000=0,000417$ por vaca/día/preñez a riesgo, o lo que equivale a 0,0417 abortos por 100 vacas-días a riesgo o el 4,17%.

En la tabla 2 se proporcionan los datos hipotéticos para calcular mensualmente el índice o tasa de aborto en una ganadería de 1000 vacas. Este método permite estandarizar la información para calcular las tasas de aborto en cualquier periodo específico de tiempo durante la gestación. Más aun, estas tasas se pueden específicamente calcular por etapas o tercios de gestación para mejor claridad. Por ejemplo, el índice de aborto se puede calcular para cada tercio de la gestación así: vacas con menos de 3 meses, preñez entre 3 y 6 meses, y con preñeces > 6 meses, esto resultará en una mejor aproximación diagnóstica con miras a establecer los patrones de aborto según los periodos de riesgo durante la gestación.

El número de vacas preñadas por mes a riesgo fue calculado dividiendo el número total de vacas preñadas/día en un determinado mes entre el número de días en el mes. Por ejemplo, 14.777 vacas/día fueron inclui-

das en el mes de enero lo cual representa 476,7 vacas/mes (14.777/31).

APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE ABORTO A NIVEL DE HATO

En general, el diagnóstico etiológico de la mayoría de los abortos ha sido difícil de establecer aun para grupos de patólogos que disponen de alta calidad de recursos de diagnóstico (10, 11). Uno de los grandes retos del diagnóstico en poblaciones es poder establecer causalidad entre la exposición a un patógeno y la presentación clínica de enfermedad, en este caso el aborto. Uno de los problemas es que, en general, no se han usado métodos de diagnóstico orientados a su estudio en hatos o grupos de animales (5, 12-14). La serología ha sido una de las herramientas propuestas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas que pueden producir pérdida gestacional (15-19), infortunadamente, una de las limitantes más importantes asociadas al diagnóstico serológico es la dificultad de establecer una asociación entre el momento de exposición al patógeno y el momento del aborto, adicionalmente, factores como la vacunación, la prevalencia y dinámica de la enfermedad, así como la sensibilidad y especificidad y los valores predictivos y puntos de corte de las pruebas, hacen que la precisión del diagnóstico sea variable, sin embargo se han descrito metodologías epidemiológicas apropiadas que permiten una mejor interpretación de los resultados (20-25). En esta sección presentaremos unos ejemplos de utilidad para ser utilizados a la hora de realizar una mejor aproximación diagnóstica de hato para el problema de aborto. Esta metodología se fundamenta en utilizar la información proveniente de la comparación entre grupos de animales (casos y controles) (26) evaluados serológicamente. Se trata de

Tabla 2. Cálculo mensual de la densidad de abortos para una población hipotética de 1000 vacas.

	En	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Agos	Sept	Oct	Nov	Dic
No. Abortos	9	11	7	9	12	10	13	11	8	9	7	9
No. de vacas Preñadas/mes a riesgo*	476,7	540,8	508,5	536,9	519,6	524,2	503,2	491,4	492,0	460,3	472,0	472,6
Índice de Aborto** por 100 vacas preñadas por mes	1,9	2,0	1,4	1,7	2,3	1,9	2,6	2,2	1,6	2,0	1,5	1,9

*No. vacas preñadas/mes calculado como: (la suma del número de días en que cada vaca está preñada durante el mes)/No. de días del mes

** Índice o tasa de aborto = $\frac{\text{Número de abortos}}{\text{Número de vacas preñadas/días a riesgo}}$.

contestar sí o no a la pregunta comúnmente realizada acerca de si existe una asociación entre la exposición de una animal a un agente infeccioso y la presentación de aborto en un grupo de animales. Para lograr esto, lo más recomendable es utilizar un diseño de diagnóstico de casos y controles, esto dictará con claridad las pautas a ser utilizadas para seleccionar los animales que van a ser muestreados para realizar pruebas de tipo serológico. En este caso se utilizan muestras de suero sanguíneo de las vacas que han abortado recientemente (los casos) y por lo menos la misma cantidad de sueros provenientes de un número de vacas que aún permanezcan en gestantes, se debe considerar que tanto los casos como los controles sean contemporáneos. Así, estas deben tener más o menos el mismo tiempo de gestación de las abortadas, es decir, que pertenezcan al mismo grupo y por ende que hubieran estado compartiendo el mismo ambiente (los controles) (13). Si los hatos son pequeños y las vacas abortadas no pueden ser identificadas con otras contemporáneas de iguales características tanto productivas como reproductivas al momento del muestreo, entonces se puede prolongar el tiempo del muestreo de las vacas durante un cierto período (incluso hasta un año o más) con el fin de obtener una muestra mayor que sea representativa de los animales que han abortado y de los que no han abortado. Las muestras de suero se pueden congelar con el fin de correr las pruebas al mismo tiempo preferiblemente. Los resultados serológicos obtenidos se organizan en una tabla de contingencia de 2 x 2 como se muestra más adelante en el ejemplo de las tablas 3 y 4. La primera pregunta sería si hay una relación evidente entre la presentación del aborto y la exposición al agente infeccioso; es decir, si el aborto y la exposición al patógeno son independientes una de la otra. El grado de independencia puede ser evaluado estadísticamente usan-

do una prueba de Chi cuadrado, o la prueba exacta de Fisher. Si el valor P obtenido es $< 0,10$, entonces se puede tener cierta confianza al concluir que la relación observada entre las vacas abortadas y la exposición al patógeno no ocurrió simplemente por casualidad. La interpretación depende del tamaño de muestra, de modo que para las muestras pequeñas (<30) se prefiere utilizar $P < 0,10$, mientras que para las muestras grandes (>50), se puede utilizar un valor $P < 0,05$. Si se obtiene un valor de P grande, como por ejemplo $P=0,15$ o mayor, entonces se podría concluir con un nivel de confianza razonable que los resultados obtenidos no demuestran ninguna asociación entre el aborto y la exposición. En este punto uno puede parar ya que no habría razón para realizar otros cálculos, o si se prefiere se pueden recoger más muestras para mejorar el poder del análisis y así establecer si existe una asociación verdadera.

Si se obtiene evidencia de que existe una asociación entre el aborto y la exposición, entonces el paso siguiente es estimar la fuerza de esa asociación. La fuerza de la asociación se puede medir a través de calcular el odds ratio (OR), el cual se utiliza también para estimar la proporción atribuible (PA). El OR indica cuánto mayor es el riesgo de abortar para los animales expuestos comparado con las vacas no expuestas. Por ejemplo, un $OR=3$ indicaría que la tasa del aborto en vacas expuestas sería 3 veces mayor que en vacas no expuestas. La proporción atribuible PA se calcula como $(OR-1) / OR$ y es un buen estimativo de la proporción de abortos en vacas abortadas y expuestas al patógeno que es realmente atribuible a la exposición. La PA es un parámetro muy importante de diagnóstico de hato ya que esta sí proporciona un estimativo de la importancia de la exposición en el contexto del hato o grupo de animales. Si el $OR=3$, entonces PA el = 66%, es decir que el

66% de los abortos en las vacas abortadas y además expuestas a determinado patógeno es atribuible a la exposición. Esta metodología es válida para ser utilizada con cualquier patógeno que afecte la reproducción como IBR, DVB, leptospirosis o brucelosis entre otras, pero no exclusivamente. Vale la pena mencionar que en los procesos de vacunación contra estos patógenos afectan de manera importante la interpretación de los resultados serológicos y por ello los mismos deben ser interpretados con cautela y considerando las últimas fechas de vacunación. Sin embargo, el hallazgo positivo de una asociación entre la exposición al patógeno y el evento clínico, al evaluar múltiples resultados serológicos, permitirá establecer prioridades en términos del control y prevención de uno o varios patógenos específicos, a la vez que permite evaluar el nivel de interacción de ellos en la presentación clínica del aborto. En la tabla 3 se presenta un ejemplo para evaluar el grado de asociación entre el estado serológico de *Neospora caninum* y un problema del aborto a nivel de hato (27). Aquí el valor P obtenido es significativo ($<0,05$), indicando que el estado serológico de *N. caninum* y el aborto no son independientes (hay probablemente una asociación entre los dos). Un OR de 4,6 sugiere que el índice del aborto entre vacas seropositivas en el hato es 4,5 veces mayor que entre vacas seronegativas y el PA sería del 78%

lo cual sugiere que cerca del 78% de los abortos entre vacas seropositivas se pueden atribuir al *N. caninum*. Se debe resaltar que no es infrecuente el hecho de **no** encontrar ninguna evidencia de una asociación entre el aborto y *N. caninum* u otros patógenos en algunos hatos, aún cuando ellos pueden tener una alta prevalencia de infecciones debidas a *N. caninum* (13). Esta ausencia en la asociación sugiere la presencia de otros factores que pueden variar entre hatos y que puedan predisponer o incrementar el riesgo en las vacas infectadas con *N. caninum*.

En la tabla 4 se muestra otro ejemplo para establecer causalidad en la infección congénita de *N. caninum*, en terneras nacidas de vacas seropositivas (28, 29), que puede ser utilizado como uno de los métodos de control de la enfermedad especialmente considerando que la infección congénita es la principal vía de transmisión de *N. caninum* y por ello perpetúa la transmisión en los hatos, y aunque no incrementa el riesgo de enfermedad en terneras infectadas (30), sí resulta ser un factor de riesgo para la presentación de aborto (31) como vimos en el ejemplo anterior (tabla 3).

La interpretación de los resultados en este caso sería que las terneras seropositivas a *N. caninum*, y nacidas de vacas seropositivas tienen 27 veces más probabilidades de haberse infectado congénitamente comparadas con las seronegativas OR= 27

Tabla 3. Estudio de casos y controles como método diagnóstico de hato en la evaluación de causas de aborto en bovinos, usando una exposición hipotética a *Neospora caninum*.

Serología <i>N. caninum</i>	Vacas Abortadas	Vacas no Abortadas	Total	Posibilidad (Odds) de abortar
Positivo	10	8	18	10/8
Negativo	6	22	28	6/22
Total	16	30	46	

$$\text{Chi cuadrado} = \frac{[(10)(22) - (8)(6)]^2}{(46)} \div \frac{[(10+8)(10+6)(8+22)(6+22)]}{46} = 5,6$$

$$\text{Valor P} = 0,023$$

$$\text{Odds ratio (OR)} = (10)(22) / (6)(8) = 4,6$$

$$\text{Proporción Atribuible (PA)} = (OR-1)/OR = (4,6-1)/4,6 = 0,78$$

Tabla 4 Muestreo de un hato hipotético donde se han tomado sueros sanguíneos pareados de 25 vacas con sus respectivas hijas. Las muestras fueron tomadas después de los seis meses cuando los títulos de anticuerpos maternos colostrales han desaparecido.

Serología <i>N. caninum</i>	Vacas Abortadas	Vacas no Abortadas	Total	Posibilidad (Odds) de abortar
Hijas Positivas	24	4	28	24/4
Hijas Negativas	4	18	22	4/18
Total	28	22	50	

Chi square = $\frac{((24)(18) - (4)(4))^2 (50)}{((24+4)(24+4)(28+22)(4+22))} = 8,4$

Valor P = 0,002

Odds ratio (OR) = $\frac{(24)(18)}{(4)(4)} = 27$

Proporción Atribuible (PA) = $\frac{(OR-1)}{OR} = \frac{(27-1)}{27} = 0,963$

95% IC (5,9, 122,8), valor p= 0,002. Por otro lado, la proporción atribuible calculada como $PA = \frac{(OR-1)}{OR} = \frac{26}{27} = 0,963$, nos indica que el 96,3% de la infección de las terneras nacidas de vacas seropositivas a *N. caninum* es atribuible al hecho de nacer de una vaca positiva. Mientras que el 3,7% de las infecciones de las terneras es atribuible a otras vías de transmisión (por ejemplo, la transmisión horizontal).

FACTORES DEMOGRÁFICOS Y AMBIENTALES ASOCIADOS AL ABORTO

Se presentan a continuación algunos factores que han sido tradicional y empíricamente considerados como factores de riesgo asociados a la presentación de pérdidas fetales en bovinos y que aunque han sido atribuidos como causa de aborto no han podido ser demostrados contundentemente como causas atribuibles de esta patología. Se tomarán como puntos de comparación algunas referencias de estudios realizados en lecherías del Valle Central de California.

Producción de leche: no se ha demostrado ninguna evidencia clara que establezca una asociación entre el aborto y la producción de leche o grasa (32, 33), quizás debido a las dificultades metodológicas al realizar

los seguimientos de grandes poblaciones de vacas para identificar si los cambios en la producción de leche o grasa preceden a la muerte fetal, y si la producción y el aborto son variables que se confunden por la enfermedad que afecta la producción de leche y la viabilidad fetal.

Características demográficas de la vaca: edad y número de gestaciones. En la especie humana, en mujeres con edad avanzada se cree que el riesgo de aborto espontáneo aumenta principalmente con el desarrollo de óvulos envejecidos y la mayor presentación de trisomias. No se han publicado estudios que evalúen específicamente la presentación de trisomias en ganado y tampoco el riesgo relacionado con el aborto. Aunque un estudio planteó la posibilidad de utilizar al bovino como modelo de estudio del efecto de la edad y el envejecimiento con relación a la función reproductiva en mujeres (34). Sin embargo, la edad puede desempeñar un papel importante en la reducción de la capacidad general de una vaca de mantener la preñez por disminución de la función inmune o de otros mecanismos (35). Un grupo de investigadores encontraron recientemente que no existía asociación estadística entre el número de partos, la producción de leche, el número de inseminaciones

naciones o el protocolo usado para ello con la presentación de aborto (32). Uno de los problemas al tratar de determinar si la edad es un factor que aumente el riesgo del aborto en vacas lecheras se relaciona con el hecho de que las vacas más viejas son normalmente retenidas en los hatos quizás porque han presentado pocos o ningún aborto en comparación con las que abortan de manera habitual. Así, el riesgo relativo del aborto asociado a la edad se podría ver disminuido en vez de aumentado con la edad porque cada categoría de edad sucesiva representa una cohorte de animales que ha presentado menos número de abortos.

Además, la relación posible entre la edad y la presentación del aborto es confundida por el número de partos de una vaca, que representa el número total de gestaciones en el curso de la vida. Se ha propuesto que a mayor número de gestaciones mayor es el desgaste reproductivo experimentado por la vaca y por ello tienen un mayor riesgo de perder la gestación. Debido a que el número de gestaciones y la edad aumenta de forma paralela y tienen una alta correlación, es difícil separar los efectos del aumento de la edad y el aumento del número de partos en relación con el riesgo del aborto. En un estudio realizado en vacas lecheras usando métodos estadísticos desarrollados recientemente y que podían evaluar los efectos de variables correlacionadas (36), se encontró que el riesgo del aborto aumentó en la medida en que las vacas envejecían (3). Aunque el efecto de la edad era estadísticamente significativo, el efecto era realmente pequeño, de tal forma que por sí mismo no contribuía probablemente de una manera importante con las tasas totales del aborto en la mayoría de los hatos estudiados. El factor edad podría contribuir en la tendencia de encontrar tasas más altas de aborto en criaderos de animales puros en los cuales se conserva una alta proporción de vacas con

elevado número de partos, así como para los hatos en expansión en los cuales las tasas de retención de animales aumentan por lo cual no es un factor de descarte.

Sin embargo y en contraste con un cierto dogma que ha prevalecido, el estudio encontró que después de ajustar el riesgo del aborto según el efecto de la edad, este era más bajo en el grupo de vacas con mayor número de gestaciones que en el de las vacas de edades similares con menor número de gestaciones a lo largo de su vida. Algunas posibles explicaciones del porqué las vacas con mayor número de gestaciones tienen un menor riesgo de abortar podrían incluir una predisposición genética a tener mayor fertilidad y fecundidad, en cuyo caso hay un mecanismo común que funciona para mantener la gestación después del día 42. Otra explicación podría ser que las vacas con mayor número de gestaciones y que han sido retenidas en el hato luego de soportar la fuerte presión del descarte, en su mayoría no habían abortado. Así, las vacas de menor riesgo (sin historia de aborto) tenderían a ser sobre-representadas en los grupos de alto número de gestaciones y de vacas retenidas en el hato.

Días abiertos al momento de la concepción: se ha reportado que las vacas que conciben más temprano durante la lactancia (30-60 días) tienen un riesgo más alto de abortar en comparación con las vacas que conciben después del día 60 (3, 36). Aunque se ha encontrado que este fenómeno ha sido estadísticamente significativo, se podría especular que el efecto mismo de la concepción temprana en el hato sobre las tasas totales de aborto es probablemente muy pequeño. De lo contrario, los esfuerzos por incrementar las tasas de preñez después de que el pico de lactancia haya ocurrido en la mayoría de las lecherías, no darían lugar a una disminución perceptible en las tasas de aborto total del hato. Adicionalmente,

un estudio concluyó que el número de días postparto no está asociado con las tasas de pérdida gestacional, pero sí la presentación clínica de mastitis, la cual tiende a suceder temprano durante el postparto (32), lo cual podría de alguna manera explicar el mayor riesgo de pérdida gestacional temprano durante la lactancia.

Abortos anteriores: la historia previa de aborto es probablemente el mayor predictor de si la vaca abortará en el futuro (3, 36). Las vacas que han abortado tienden a tener dos veces más probabilidad de aborto en la gestación subsiguiente en comparación con las vacas que no han abortado. Además, las vacas que abortan después del día 75 tienen un riesgo mucho más alto de abortar en la siguiente preñez comparadas con aquellas que abortaban <75 d, y con las vacas que no han tenido un aborto en sus anteriores gestaciones (3). Las vacas que habían abortado y que fueron infectadas con *N. caninum* tenían adicionalmente un riesgo más alto del tener un aborto subsecuente en comparación con las vacas abortadas y que no estaban infectadas con *N. caninum* (37). En este sentido existe una excepción notable a la “regla” de que un aborto anterior aumenta el riesgo de presentación de un aborto subsecuente. Las vacas que abortaron su gestación temprano (antes de 75 días) tienen un riesgo más bajo de abortar la siguiente gestación incluso al ser comparadas con

las vacas que no abortaron previamente (3). Este efecto protector de la pérdida de la preñez temprana puede estar relacionado con un riesgo más alto de aborto en aquellas vacas que concebían temprano durante la lactancia, según lo discutido anteriormente.

Temperatura medioambiental: una opinión común es que las tasas del aborto aumentan durante el verano probablemente debido al fuerte incremento de la temperatura ambiental. Los esfuerzos por establecer una asociación entre la alta temperatura ambiental y el riesgo creciente del aborto, al menos en el Valle Central de California, han sido infructuosos hasta ahora (32, 38). La explicación más probable para el aumento que se observa en el número de abortos durante el verano es que la variación estacional en la concepción, lleva el número de los fetos de riesgo alto (esos 3-5 meses de la edad) a su más alto riesgo durante la variación estacional típica de los meses de verano (39). La variación típica en los fetos entre 3 y 8 meses en la gestación para las lecherías en el Valle Central se presenta en la figura 2. En la mayoría de las fincas, el número de fetos en el período de alto riesgo de aborto entre 3 y 5 meses de la gestación tiende a alcanzar su máximo durante los meses del verano, aun cuando el número total de fetos a riesgo (vaca-día-preñez a riesgo) puede disminuir por esos meses (figura 3). Así, el aumento que se percibe en

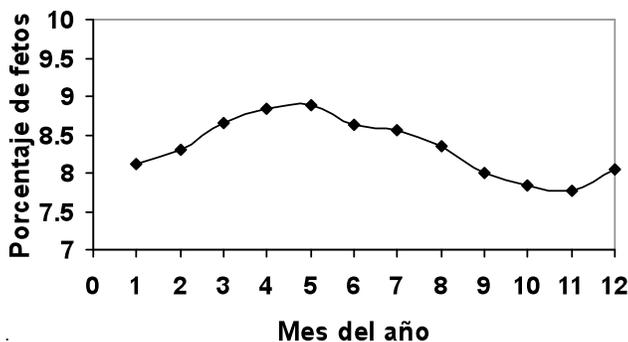


Figura 2. Variación estacional esperada en el porcentaje de fetos entre los 3 y los 8 meses de edad (39).

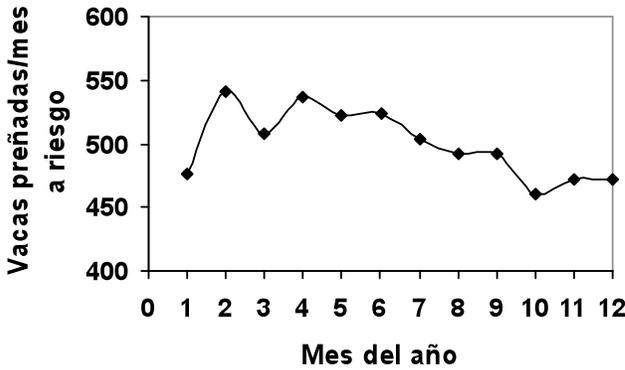


Figura 3. Variación estacional esperada en el número de vacas preñadas/mes a riesgo, en una población hipotética de 1000 vacas (ver también la tabla 2) (39).

el número de abortos puede ser un reflejo del número creciente de fetos con un riesgo alto de ser abortados durante esos meses; en general, las tasas totales de aborto tienden a aumentar durante el verano. Un estudio reciente reportó que la altas temperatura y humedad eran factores de riesgo que podían comprometer la gestación alrededor del día 21-30, pero este modelo no encontró efectos significativos sobre el desarrollo de la gestación luego de este periodo (40).

Otros factores ambientales: existen muy pocos estudios publicados en la literatura que investiguen el nivel de la asociación entre los efectos de las exposiciones medioambientales y el riesgo del aborto. Un

estudio reportó evidencia de la influencia estacional en fetos abortados que fueron infectados con el *N. caninum*, (39) y una asociación entre el mes de la concepción y la mayor presentación de casos de momificación fetal (figura 4) (2).

CONCLUSIONES

La variabilidad en las diferentes formas para calcular las tasas de aborto puede sesgar la habilidad de detectar factores de riesgo o tiempos de riesgo en la presentación de la infección. Por otro lado, los cálculos adecuadamente realizados permiten realizar hipótesis más posibles y por ende orientan más adecuadamente el diagnóstico. Por

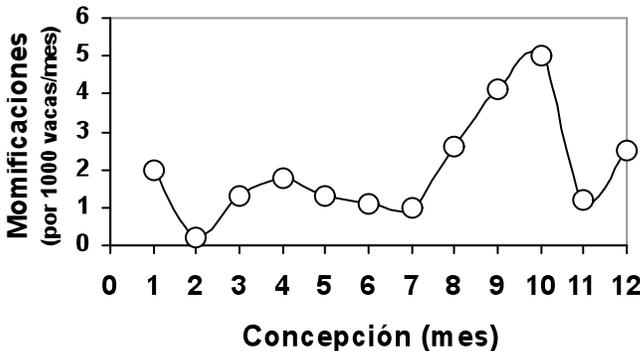


Figura 4. Variación en la tasa de fetos momificados con base en el mes en que ocurrió la concepción (2).

ejemplo, el riesgo elevado de presentación de momificación fetal en vacas que conciben en los meses de septiembre a noviembre en California, podría sugerir que es posible la exposición embrionaria temprana a los agentes frecuentes en aquel momento del año (ej. Virus de la lengua Azul o consumo de alimentos estacionales) (41). La palpación rectal para diagnóstico de preñez no ha podido ser asociada al aborto por lo menos cuando el diagnóstico es realizado por veterinarios experimentados (42, 43), así mismo, un estudio reciente demostró que no había un efecto negativo del diagnóstico de gestación por deslizamiento de la membrana corioalantoidea en bovinos de leche (44). De manera adicional, al utilizar ultrasonido para el diagnóstico temprano de preñez, las tasas de aborto tienden a ser más altas ya que se pueden diagnosticar un mayor número de muertes fetales tempranas (45, 46). También se ha utilizado el diagnóstico ecográfico temprano para estudiar algunos de los factores de riesgo asociados con las pérdidas tempranas de la preñez (47). Los modelos epidemiológicos han resultado de gran utilidad para medir adecuadamente las tasas de aborto, y también para establecer causalidad en los mismos. Estos métodos que han sido utilizados en grandes ganaderías, pueden ser exitosos en nuestro medio, ya que los modelos son flexibles y pueden ser adecuados a cualquier tipo de situación o tamaño de explotación. Se requiere sí de la disciplina en la recolección y organización adecuada de la información, con el objetivo de que los datos analizados sean una correcta representación del problema.

REFERENCIAS

1. Bamber RL, Shook GE, Wiltbank MC, Santos JEP, Fricke PM. Genetic parameters for anovulation and pregnancy loss in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2009; 92: 5739-5753.
2. Forar AL, Gay JM, Hancock DD, Gay CC. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. *Theriogenology* 1996; 45: 1505-1513.
3. Thurmond MC, Branscum AJ, Johnson WO, Bedrick EJ, Hanson TE. Predicting the probability of abortion in dairy cows: a hierarchical Bayesian logistic-survival model using sequential pregnancy data. *Prev Vet Med* 2005; 68: 223-239.
4. Thurmond MC, Picanso JP. A surveillance system for bovine abortion. *Preventive Veterinary Medicine* 1990; 8: 41-53.
5. Thurmond MC, Picanso JP, Hietala SK. Prospective serology and analysis in diagnosis of dairy cow abortion. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2: 274-282.
6. Thurmond MC, Picanso JP, Jameson CM. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 1305-1312.
7. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown: AVC Inc 2004; 183-184.
8. Anon J. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet* 1972; 62: 216-237.
9. Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald LF, Donovan GA. Uterine involution and fertility of holstein cows subsequent to early postpartum PGF2alpha treatment for acute puerperal metritis. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3238-3246.
10. Anderson ML. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology* 2007; 68: 474-486.
11. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 207: 1206-1210.
12. Thurmond MC, Blanchard PC, Anderson ML. An example of selection bias in submissions of aborted bovine fetuses to a diagnosis

- tic laboratory. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 269-271.
13. Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and post-natal transmission. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 44-49.
 14. Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 90-94.
 15. Edmondson MA, Givens MD, Walz PH, Gard JA, Stringfellow DA, Carson RL. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 376-381.
 16. Grooms DL. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 2006; 66: 624-628.
 17. Grooms DL, Bolin CA. Diagnosis of Fetal Loss Caused by Bovine Viral Diarrhoea Virus and *Leptospira* spp. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2005; 21: 463-472.
 18. Guitian J, Thurmond MC, Hietala SK. Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215: 515-518.
 19. Lawman MJ, Thurmond MC, Reis KJ, Gauntlett DR, Boyle MD. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of immunoglobulins against bovine *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1984; 6: 291-305.
 20. Choi YK, Johnson WO, Thurmond MC. Diagnosis using predictive probabilities without cut-offs. *Stat Med* 2006; 25: 699-717.
 21. Greiner M, Gardner IA. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med* 2000; 45: 43-59.
 22. Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000; 45: 3-22.
 23. Johnson WO, Gardner IA, Metoyer CN, Branscum AJ. On the interpretation of test sensitivity in the two-test two-population problem: assumptions matter. *Prev Vet Med* 2009; 91: 116-121.
 24. Pouillot R, Gerbier G, Gardner IA. "TAGS", a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Prev Vet Med* 2002; 53: 67-81.
 25. Su CL, Gardner IA, Johnson WO. Diagnostic test accuracy and prevalence inferences based on joint and sequential testing with finite population sampling. *Stat Med* 2004; 23: 2237-2255.
 26. Doherr MG, Carpenter TE, Wilson WD, Gardner IA. Effect of different sampling techniques on odds ratio estimates using hospital-based cases and controls. *Prev Vet Med* 1997; 32: 77-93.
 27. Thurmond MC, Hietala SK. *Neospora caninum* infection and abortion in Cattle. In: Smith JHaR (ed), *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice 4 Philadelphia*: W.B. Saunders, Co 1999; 425-431.
 28. Hietala SK, Thurmond MC. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol* 1999; 29: 1669-1676.
 29. Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora* infection in dairy cattle. *Vet Rec* 1994; 134: 531-532.
 30. Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res* 1996; 60: 133-139.
 31. Hernandez J, Risco C, Donovan A. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *Jo-*

- urnal of the American Veterinary Medical Association 2002; 221: 1741-1746.
32. Chebel RC, Santos JE, Reynolds JP, Cerri RL, Juchem SO, Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 239-255.
 33. Thurmond MC, Picanso J. Relationship between milk production and abortion. *71st Ann Conf Res Workers Anim Dis*, Chicago, IL, November 5-6, 1990.
 34. Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod* 2005; 73: 45-53.
 35. Starbuck MJ, Dailey RA, Inskeep EK. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 27-39.
 36. Hanson T, Bedrick EJ, Johnson WO, Thurmond MC. A mixture model for bovine abortion and foetal survival. *Stat Med* 2003; 22: 1725-1739.
 37. Thurmond MC, Hietala SK. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* 1997; 58: 1381-1385.
 38. Thurmond MC, Picanso J, Podrasky A. Effect of environmental temperature on risk of fetal loss in dairy cows. *71st Ann Conf Res Workers Anim Dis*, Chicago, IL, November 5-6, 1990.
 39. Thurmond MC, Anderson ML, Blanchard PC. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J Parasitol* 1995; 81: 364-367.
 40. Garcia-Ispierto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Nogareda C, Lopez-Bejar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 799-807.
 41. Uhaa IJ, Riemann HP, Thurmond MC, Franti CE. A seroepidemiological study on bluetongue virus in dairy cattle in the central valley of California. *Vet Res Commun* 1990; 14: 99-112.
 42. Romano JE, Thompson JA, Kraemer DC, Westhusin ME, Forrest DW, Tomaszewski MA. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 2007; 67: 486-493.
 43. Thurmond MC, Picanso JP. Fetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 432-435.
 44. Romano JE, Thompson JA, Kraemer DC. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Effect of number of fetal membrane slips on pregnancy loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2007; 68: 494-495.
 45. Fricke PM, Lamb GC. Potential applications and pitfalls of reproductive ultrasonography in bovine practice. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005; 21: 419-436.
 46. Kolour AK, Batavani RA, Ardabili FF. Preliminary observations on the effect of parity on first day ultrasonic detection of embryo and its organs in bovine. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005; 52: 74-77.
 47. Moore DA, Overton MW, Chebel RC, Truscott ML, BonDurant RH. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1112-1118.