

Enfermedades abortigénicas en lecherías de la Provincia de Ñuble: prevalencia y análisis espacial[#]

Abortigenic diseases in dairy farms in the Ñuble Province: prevalence and spatial analysis

P Gädicke^{a*}, T Junod^a, J López-Martin^a, R Ortega^a, G Monti^b

^aDepartamento de Patología y Medicina Preventiva, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

^bInstituto Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

SUMMARY

The bovine abortion syndrome is a multicausal problem, the objectives of this study were to provide information on the magnitude of the seroprevalence of four abortigenic agents and their association with some management practices the farms. A cross-sectional study was performed using 40 farms and 400 dairy cows which were statistically estimated based on a two-stage sampling. Information about management of the dairy farms was collected using a personal questionnaire, to estimate the prevalence of diseases causing abortion in the province of Ñuble, Bio-Bio District. Blood samples were taken to estimate the seroprevalence of brucellosis, bovine viral diarrhoea virus, neosporosis and leptospirosis. Farm-level prevalence for the pathogens analysed was highest for BVD (97.5%), followed by neosporosis (87.4%) and leptospirosis (52.1%), the same trend but at a lower level was found at individual level, being the highest proportion for BVD (62.1%), Neosporosis (22.4%) and leptospirosis. (12.2%). The animal prevalence of DVB and farm prevalence of neosporosis significantly increased in larger herds, Brucellosis seropositivity was not found. Factors related to seroprevalence for each pathogen, are related to biosafety and degree of intensiveness of the production, despite the control measures adopted.

Key words: bovine abortion, prevalence, diseases.

RESUMEN

El síndrome de aborto bovino (SAB) es una entidad multicausal, los objetivos del trabajo fueron aportar antecedentes para la magnitud de la seroprevalencia atribuidos a cuatro agentes patógenos abortigénicos y asociarlo a las características de manejo predial. Se utilizó un estudio transversal con 40 lecherías y 400 vacas que fue calculado mediante un muestreo bietápico, donde se recopilaban antecedentes para estimar la prevalencia de enfermedades que son causa de aborto en la provincia de Ñuble región del Biobío. Se realizó una entrevista en forma personal al encargado de cada lechería para conocer los manejos del rebaño. Junto con esto se tomaron muestras de sangre para analizar la prevalencia de brucelosis (*Brucella abortus*), diarrea viral bovina, neosporosis (*Neospora caninum*) y leptospirosis. La prevalencia predial para las enfermedades analizadas a nivel predial fue mayor para BVD (97,5%), seguido de neosporosis (87,4%) y leptospirosis (52,1%), igual tendencia pero a menor nivel se encontró en las vacas analizadas, siendo la positividad mayor BVD (62,1%), neosporosis (22,4%) y leptospirosis (12,2%). La prevalencia animal de DVB y la prevalencia predial de neosporosis aumentaron significativamente en rebaños de mayor tamaño, no se encontró positividad para brucelosis. Los factores vinculados con la positividad a estas enfermedades se relacionan con bioseguridad y grado de intensidad de la producción, pese a las medidas que se intentan para controlarlos.

Palabras clave: aborto bovino, prevalencia, enfermedades.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de aborto bovino (SAB) es una entidad multicausal. Las enfermedades diagnosticadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) desde el año 1999 muestran como principal origen causas infecciosas como el virus de la diarrea viral bovina (DVB), *Neospora caninum*, *Brucella abortus* y *Leptospira* spp. (Gädicke y Monti 2008). En los rebaños lecheros este síndrome genera limitantes en el desarrollo de los productores debido a las pérdidas económicas que produce (Benavides y col 2010, Gädicke y Monti 2013). El aborto puede presentarse

en forma esporádica, endémica o en forma de brote y puede ser de origen infeccioso o no infeccioso, por lo que resulta difícil establecer cuál es el agente causal (Carpenter y col 2006).

En la provincia de Ñuble los rubros de producción de carne y leche constituyen el 66% del ingreso de las explotaciones (INE 2011). Los problemas de aborto pueden ser una importante causa de eliminación de vacas, pudiendo llegar al 30% o 40% del total de reemplazos, siendo más perjudicial cuando se aplica a animales que tengan vida útil o animales de gran valor genético dentro del rebaño (Gädicke y Monti 2013). Es por ello que se hace de vital importancia el control y seguimiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas en el rebaño que puedan desencadenar el SAB. Algunas de sus consecuencias son la disminución en la producción de leche, el potencial número de reemplazos y fertilidad, además del aumento de

Aceptado: 14.05.2015.

[#] Proyecto FONDECYT 11110090

^{*} Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile; pgadicke@udec.cl

costos de alimentación, tratamientos médicos, número de inseminaciones artificiales y tasas de sacrificios (Gädicke y col 2010).

El virus de la diarrea viral bovina es un virus ARN con envoltura, es un miembro del género Pestivirus, de la familia Flaviviridae (Nettleton y col 1998). Está presente en todo el mundo, y el amplio espectro de los síndromes clínicos que produce lo convierten en uno de los virus patógenos más importantes del ganado y produce importantes pérdidas económicas para los productores de ganado en todo el mundo (Baker 1987). La infección transplacentaria del feto antes del inicio de su madurez inmunológica, hace que los animales persistentemente infectados con el virus (PI), sean la principal fuente de infección para animales susceptibles en el mismo rebaño. Una sobreinfección de PI produce la diarrea viral bovina fatal enfermedad de las mucosas (DVB-MD) (Pizarro-Lucero y col 2006). En cuanto a estudios de prevalencia predial para animales PI en la Región Metropolitana se reporta 65% (Celedón y col 1998), en la IX Región una prevalencia predial de 96% (Felmer y col 2009) y en la X Región se demostró infección activa de la enfermedad en el 79,5% de los planteles analizados (Reinhardt y col 2002).

La neosporosis es una enfermedad producida por *Neospora caninum*, la cual se ha asociado con el aborto en varias especies en todo el mundo (Dubey 1988). La principal vía de transmisión en los bovinos es la transplacentaria; más del 80% de las vacas seropositivas transmiten la infección a su descendencia. La neosporosis también se puede adquirir por exposición posnatal, luego de la ingestión de alimentos contaminados con taquizoitos de abortos, placentas infectadas u ooquistes presentes en las heces de los perros (Wouda 2000). La seroprevalencia de neosporosis en lecherías de la Región de La Araucanía en el año 2000, se ha reportado en 15,7% y 30,2%, siendo el 57,1% de los perros de la primera lechería mencionada positivos a anticuerpos contra *N. caninum* (Patitucci y col 2000).

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Brucella*, siendo la especie específica para el bovino *Brucella abortus*. La fuente de infección son los fetos abortados, descarga uterina, placenta y leche; el rebaño afectado presenta abortos, momificación de fetos o retención de ellos, nacimiento de terneros débiles o muertos, retención de placenta e infertilidad mayor a los niveles normales (Gädicke y Monti 2008). En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) inició el control de la brucelosis bovina en 1975, llevándose a cabo actualmente el Programa de Erradicación de la Brucelosis Bovina en el país¹. Además, Chile se encuentra libre de la brucelosis caprina y ovina causada por *Brucella melitensis*².

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas del género *Leptospira*. La leptospirosis bovina se asocia a importantes pérdidas económicas en la industria ganadera, ya que por ser una enfermedad sistémica es responsable de provocar septicemia, nefritis, abortos, infertilidad, baja producción lechera y muerte. Además, puede mantener portadores, lo que es importante para la epidemiología de la enfermedad (Dehkordi y col 2011). El diagnóstico serológico para Leptospirosis en la Región del Biobío se ha reportado en 50,26% entre los años 1986 y 1988 (López y Poquet 1990).

El objetivo del presente trabajo fue estimar la prevalencia de cuatro enfermedades abortigénicas, analizar su distribución espacial y asociarla a características de manejo predial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal para estimar la prevalencia por infecciones al virus de la diarrea viral bovina (DVB), *Leptospira* spp. (*Lepto*), *B. abortus* (*Bru*) y *N. caninum* (*Neo*) en vacas de lecherías de la Provincia de Ñuble, Región del Biobío. Para el cálculo de la prevalencia se descartaron las vacas con antecedentes de vacunación en el caso de DVB y *Lepto*, no así para *Bru* por ocuparse la cepa oficial RB-51. El tamaño muestral se calculó estadísticamente (Thrusfield 2001), considerando un muestreo aleatorio en forma bietápica. Se consideró la prevalencia individual esperada más conservadora (50%) para todas las enfermedades, 5% de error de muestreo, 95% de confianza, esto implica muestrear a lo menos 385 vacas, que fueron redondeadas a 400. En cuanto a los predios se consideró también una prevalencia del 50% para las enfermedades, 15% de error en la estimación y 95% de confianza, lo que implica muestrear a lo menos 37 predios, que fueron redondeados a 40. De cada uno se seleccionó un número fijo de 10 vacas elegidas en forma aleatoria, de las que tuviesen más de 90 días de cubiertas, esto para que estuvieran en el ciclo reproductivo, alcanzaran a pasar el primer tercio de la gestación o abortaran y además se encontraran en producción de leche. Para los cálculos se consideró el peso de muestreo sobre la base del número de vacas de cada predio, mediante la herramienta *svy* de Stata 12.1. Esto es necesario para estandarizar lo que representa cada individuo de un predio porque el tamaño muestral de cada predio fue fijo y no todos los rebaños tenían el mismo tamaño (StataCorp 2012).

Para la selección aleatoria de predios y vacas en forma bietápica, el marco de muestreo se constituyó por las lecherías de tamaño mediano de la Provincia de Ñuble según la clasificación de ODEPA³, que corresponden, entre otras características, a aquellos predios con más de 12 hectáreas básicas de riego que están incluidas en el

¹ http://www.sag.cl/sites/default/files/INSTRUCTIVO_TECNICO_1_BRUCELOSIS_BOVINA.pdf

² <http://www.oie.int/doc/ged/D12899.PDF>

³ <http://www.odepa.cl/odepaweb/servicios-informacion/Explotaciones/explotaciones.pdf>

“Registro de declaración de ganado” del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) entre los años 2005 y 2010, en el que figuran 172 lecherías y 7.566 vacas. Estas se encuentran en el valle central de la Provincia de Ñuble, Región del Biobío, entre las comunas de San Carlos por el norte, Bulnes por el sur y el oeste, Coihueco por el este. Sus coordenadas son NO: 36° 0,623'S 72° 46,513'W; NE: 36° 29,344'S 71° 1,382'W; SO: 36° 27,234'S 72° 53,463'W; SE 37° 7,206'S 71° 6,718'W. Todos los predios fueron georreferenciados mediante un dispositivo de posicionamiento global (GPS), modelo Garmin Nüvii 1300®.

A cada dueño o encargado de los predios invitados a participar se les explicó los alcances, objetivos y confidencialidad del estudio, y se les solicitó que firmaran un consentimiento informado. Además, se les realizó una encuesta para obtener información de manejo en el predio, de la cual se obtuvieron los principales manejos de bioseguridad, alimentación y reproductivos para relacionarlos con la prevalencia de las enfermedades que producen abortos, la encuesta puede ser puesta a disposición del lector vía solicitud por correo electrónico.

De las 10 vacas seleccionadas en cada predio se obtuvo una muestra individual de suero por punción de la vena coccígea. El suero fue separado en alícuotas y se congeló a -20°C para su posterior análisis. Estas muestras se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Chillán, utilizando las siguientes pruebas:

- MAT con un panel de ocho serovares; para la detección de *Leptospira interrogans* (serovares Canicola, Pomona, Autumnalis y Copenhageni), *L. borgpetersenii* (serovares Hardjo, Ballum, Tarassovi), *L. kirschneri* serovar Grippothyphosa.
- Prueba de Rosa de Bengala para *Brucella abortus*, siguiendo el protocolo indicado por el SAG⁴.

En el Laboratorio de Virología de la Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Chillán, se realizaron los siguientes test de ELISA a las muestras de suero:

- IDEXX BVDV Total Ab® para detectar anticuerpos frente al virus de la diarrea viral bovina
- IDEXX BVDV Ag/Serum Plus Test® para detectar antígenos frente al virus de la diarrea viral bovina
- IDEXX Neospora X2® para detectar anticuerpos frente a *Neospora caninum*

Los protocolos se realizaron según las recomendaciones del fabricante (IDEXX®). La lectura de las placas en ambos casos se realizó utilizando un lector Multiscan EX (Thermo Electron, EEUU®), con una densidad óptica de 450 o 650 nm. En todos los casos, se consideró un predio positivo cuando se detectó al menos una vaca serorreaccionante a las pruebas serológicas aplicadas para cada agente en específico.

Se usó estadística descriptiva para los principales manejos de bioseguridad, alimentación y reproductivos que adoptaron los predios. Las diferencias de proporciones fueron analizadas mediante la prueba de Chi-cuadrado ($P < 0,05$). Se realizó un análisis de agrupaciones espaciales (“Cluster and outlier analysis”) para buscar similitud aparente basado en el Índice de Morán ($P < 0,05$), el análisis espacial se ejecutó con las extensiones geoestadísticas de ArcMap 10 ESRI®, el análisis indica la relación de la prevalencia de cada lechería con la prevalencia de su entorno respectivamente para cada enfermedad. El resultado se interpreta mediante las leyendas: HH lechería de alta Prevalencia en zona de alta Prevalencia, HL lechería de alta Prevalencia en zona de baja Prevalencia, LH lechería de baja Prevalencia en zona de alta Prevalencia y LL lechería de baja Prevalencia en zona de baja Prevalencia.

Para el cálculo de la Prevalencia a nivel de lecherías se consideró como positiva si al menos una vaca resultó positiva al test, ya que cuando un test es usado en animales donde la prevalencia es relativamente alta el valor predictivo positivo aumenta disminuyendo la probabilidad de falsos positivos (Dohoo y col 2003). La Prevalencia verdadera a nivel de animales se calculó según lo indicado por Dohoo y col (2003) y la Prevalencia verdadera a nivel de lechería según lo indicado por Donald (1993) y Wagner y Salman (2004).

Se pueden distinguir cuatro grupos de animales si se clasifican de acuerdo con el estado de la enfermedad y al resultado del test diagnóstico: Verdadero positivo (VP) = enfermo positivo y test positivo, Falso positivo (FP) = enfermo negativo y test positivo, Falso negativo (FN) = enfermo positivo y test negativo, Verdadero negativo (VN) = Enfermo negativo y test negativo. La estimación de estado de enfermedad que se realizó con los resultados del test diagnóstico corresponde a la Prevalencia Aparente (PA) = $(VP + FP)/n$, este valor se corrigió con la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) del test diagnóstico para obtener la Prevalencia Verdadera (PV) mediante la expresión $PV = (PA + Sp - 1) / (Se + Sp - 1)$ (Dohoo y col 2003). En diseños de estudios bietápicos la sensibilidad y especificidad a nivel de rebaño de las pruebas diagnósticas HSe y HSp respectivamente, pueden asumirse similares a las de nivel animal, cuando las prevalencias de la enfermedad a nivel de animal son altas (Wagner y Salman 2004). El ajuste de la Prevalencia Verdadera a nivel de lechería es similar al que se realiza a nivel animal (Donald 1993).

Para el cálculo de la PV la prueba de ELISA DVB anticuerpos se consideró una Se de 93,3%, Sp 99,5%; para ELISA Neo Se 100% y Sp 99,2%, de acuerdo con lo indicado por el fabricante IDEXX⁵. Para MAT se consideró Se 95% y Sp 99% (Cho y col 1989, Lottersberger y col 2002) y para la prueba Rosa de Bengala Se 99% y Sp 97,6% (Martínez y Flores 2012). Se conformaron tres modelos

⁴ http://www.sag.cl/sites/default/files/7_INSTRUCTIVO_TECNICO_ROSA_BENGALA.pdf

⁵ http://www.idexx.co.uk/pdf/en_gb/livestock-poultry/bvdv-ag-serum-plus-test-sheet.pdf

de regresión logística jerárquica con intercepto aleatorio, para relajar el supuesto de independencia condicional entre las respuestas del mismo rebaño. Se calcularon los Odds Ratio (OR) y sus intervalos de confianza para los factores asociados con la probabilidad de que las vacas fueran positivas a cada agente del estudio (DVB, Leptospirosis, Neosporosis). Se utilizaron como variables independientes las características a nivel predial (comuna, presencia de perros, fuente de agua, edad y peso de encaste de vaquillas, sistemas de encaste, sistemas de alimentación) y características a nivel de vacas (número de la lactancia, antecedentes de vacunación). Las unidades de muestreo ($n = 400$ vacas) se encontraban agrupadas jerárquicamente en lecherías ($n = 40$), para considerar así el efecto aleatorio del agrupamiento de los animales. Se utilizó el Módulo de Modelos Lineales Generalizados y Latentes Mixtos (GLLAMM) del programa Stata 12.1 (StataCorp 2012). Se consideraron confusores e interacciones de primer orden; para evaluar el ajuste del modelo se usaron los indicadores AIC y BIC, se interpretaron los Odds Ratio (OR) y sus intervalos de confianza (IC 95%) siguiendo la metodología “paso a paso hacia atrás” (Kleinbaum y Klein 2002, Dohoo y col 2003), se utilizó como valor umbral para considerar las asociaciones significativas un valor de $P < 0,1$. Además se consideró el peso de muestreo según el número de animales del predio (Thrusfield y col 2001).

RESULTADOS

La distribución de las lecherías analizadas por comuna fue: Bulnes 13 (32,5%), Chillán 13 (32,5%), Coihueco seis (15,0%), San Carlos cinco (12,5%) y San Nicolás tres (7,5%). En el análisis espacial del Índice de Morán (Figura 1) se observan zonas diferentes de alta prevalencia predial para cada enfermedad, siendo los predios alrededor de la ciudad de Bulnes aquellos de mayor prevalencia para DVB y leptospirosis. En Chillán se encuentra una zona con prevalencia alta para leptospirosis y neosporosis, mientras que en los alrededores de Coihueco se ubica una zona alta de BVD y neosporosis. Al analizar las lecherías como puntos individuales para DVB se identifica una lechería LH al noroeste de la ciudad de Bulnes y una al norte de la ciudad de Coihueco. Al suroeste de la ciudad de Bulnes se observa una lechería HL para DVB. En cuanto a leptospirosis dos lecherías fueron HH al sureste de Bulnes y una LH al noreste de la ciudad de Chillán. Para neosporosis se clasificaron dos lecherías HH, una al noreste de Chillán y otra al norte de Coihueco (figura 1).

En el cuadro 1 se observa la prevalencia predial y animal aparente, y la prevalencia animal verdadera de brucelosis (*Brucella abortus*), VDVB, leptospirosis (*Leptospira* spp) y neosporosis (*Neospora caninum*). La tendencia se mantiene al ajustar las prevalencias según el peso muestral y el tamaño fijo de muestreo, siendo la PV para DVB 97,5%, neosporosis 87,4% y leptospirosis 52,1%, mientras que a nivel de vacas las PV son un poco más bajas: DVB 62,15%,

neosporosis 22,4% y leptospirosis 12,2%. Además, se encontró una vaca positiva a DVB antígeno (0,2% a nivel animal al ajustarla por el efecto del diseño).

La PV animal para DVB y predial para neosporosis aumenta significativamente en estratos de tamaño de rebaño mayores ($P < 0,05$). Sin embargo, la PV predial de DVB y la PV animal de neosporosis no tuvieron un aumento significativo de acuerdo con el tamaño del rebaño ($P > 0,05$). Al analizar animales seropositivos a serovares de *Leptospira* spp. no se observaron cambios significativos en la PV predial y animal de acuerdo con el tamaño del rebaño ($P > 0,05$). En los predios no vacunados de las lecherías analizadas el serovar Grippotyphosa (5,5%) se encontró en una proporción menor respecto de los serovares Pomona (28,5%), Hardjo (21,4%), Tarassovi (17,8%) y la mezcla de Pomona y Tarassovi (14,2%) ($P < 0,05$). En predios vacunados, los serovares encontrados fueron Pomona (16,6%), Hardjo (8,3%), Tarassovi (8,3%), Grippotyphosa (41,6%) y Canicola (16,6%), no observándose diferencias significativas entre ellos ($P > 0,05$). Por otra parte no hubo reaccionantes a los serovares Ballum, Autumnalis ni Copenhageni.

Sobre la base de los resultados individuales de cada vaca se obtuvo el porcentaje de correaccionantes a los agentes analizados, observándose que el 65,0% de los predios presenta animales con anticuerpos frente al virus de la DVB y a *Neospora caninum*, el 42,5% es positivo para DVB y a serovares de *Leptospira* spp., el 22,5% de los predios es seropositivo a *Leptospira* spp. y *Neospora caninum*, mientras que un 20,0% es seropositivo a DVB, *Neospora caninum* y *Leptospira* spp.

Se realizaron modelos de regresión logística jerárquicos multivariados con intercepto aleatorio para buscar los factores relacionados con la positividad de las vacas a las tres enfermedades. El antecedente de vacunación a nivel de vaca se evaluó como factor de confusión (Dohoo y col 2003).

El modelo de mejor ajuste para DVB considera como factor de confusión la vacunación (OR 125,8 IC 95% 8,00; 1978,14 $P = 0,001$) y también tuvo efecto como factor de riesgo el uso de toro celador en vaquillas (OR 4,68 IC 95% 0,89; 24,57 $P = 0,068$) comparado con el no uso (cuadro 2).

En cuanto a los factores relacionados con neosporosis, destacan con mayor prevalencia las comunas de Chillán (OR 2,68 IC 95% 1,39; 5,20 $P = 0,003$), Coihueco (OR 2,90 IC 95% 1,07; 7,88 $P = 0,036$) y San Carlos (OR 2,19 IC 95% 0,88; 5,44 $P = 0,091$) comparadas con la comuna de Bulnes. También se asociaron a un mayor riesgo los predios que tienen perros en contacto con el rebaño (OR 3,85 IC 95% 1,44; 10,26 $P = 0,007$) comparados con los que no tienen perros. Además, se encontró asociado a un menor riesgo los predios que poseen patio de alimentación en uso todo el año (OR 0,33 IC 95% 0,17; 0,61 $P = 0,001$) comparado con los que no tienen patio de alimentación y los que usan toro celador (OR 0,29 IC 95% 0,12; 0,69 $P = 0,005$) comparados con los que no lo tienen. De igual

Cuadro 1. Prevalencias aparente y verdadera para cuatro agentes (DVB, *Leptospira spp*, *Neospora caninum* y *Brucella Abortus*) productores de enfermedades abortigénicas en vacas de lecherías de la Provincia de Ñuble, Región del Biobío, año 2012.

Apparent and true prevalence for four agents (DVB, *Leptospira spp*, and *Brucella abortus* *Neospora caninum*) causing abortigenic diseases in dairy cows of Ñuble Province, Biobío District, 2012.

Agente	Lecherías			Vacas		
	Nº muestras	PA (%)	PV(%)	Nº muestras	PA (%)	PV(%)
DVB	35	97,1	97,5	350	60	62,1
Neo	40	87,5	87,4	400	23	22,4
Lepto	28	50	52,1	280	12,5	12,2
Bru	40	0	Nd	400	0	0

PA: prevalencia aparente. PV: prevalencia verdadera. DVB: virus de la diarrea viral bovina. Neo: *Neospora caninum*. Lepto: *Leptospira interrogans*. Bru: *Brucella abortus*.

Cuadro 2. Modelo de Regresión logística para las variables relacionadas con la positividad a Diarrea Viral Bovina.

Logistic regression model for variables related to Bovine Diarrhea Virus positivity.

Factor	n	% BVDV	Odds Ratio	Valor P	IC 95%	
Uso vacuna BVDV						
No	350	60,00%	-	-	-	-
Sí	50	98,00%	125,80	0,001	8,00	1.978,14
Uso toro celador vaquillas						
No	35	62,85%	-	-	-	-
Sí	5	80,00%	4,68	0,068	0,89	24,57

manera, el mayor peso de encaste de las vaquillas se asoció a una menor prevalencia de neosporosis (OR 0,99 IC 95% 0,99; 0,99 P < 0,001) (cuadro 3).

Respecto de leptospirosis, la presencia de perros en el predio se asoció a mayor prevalencia (OR 2,99 IC 95% 1,05; 8,52 P = 0,039) que en aquellos que no tienen, el uso de patio de alimentación estacional o todo el año tuvo un efecto protector (OR 0,34 IC 95% 0,12; 0,96 P = 0,042 y 0,32 IC 95% 0,14; 0,74 P = 0,008) comparado con aquellos que no usan patio, los predios que utilizan toro e inseminación artificial tienen mayor riesgo de ser positivos a la enfermedad (OR 3,82 IC 95% 1,20; 12,18 P = 0,023) que aquellos que usan solo toro, el abastecimiento de agua desde pozo abierto también constituyó un factor de riesgo (OR 2,13 IC 95% 0,91; 4,96 P = 0,079) respecto de los que tienen pozos cerrados y el mayor peso de encaste de las vaquillas se asoció a una menor prevalencia de neosporosis (OR 0,99 IC 95% 0,98; 0,99 P < 0,001). Se consideró la vacunación contra leptospirosis como factor de confusión (OR 1,99 IC 95% 0,88; 4,53 P = 0,098) (cuadro 4).

DISCUSIÓN

La mayor prevalencia a nivel predial fue de DVB (PV 97,5%) y también a nivel animal (PV 58,4%), además se encontró una vaca positiva a DVB antígeno (0,2% a nivel animal al ajustarla por el efecto del diseño), esto indica la

circulación del virus dentro de los predios (Celedon y col 1998). El análisis de las agrupaciones espaciales (figura 1) identifica mayor problemática de DVB en las comunas de Bulnes y Coihueco. Las prevalencias obtenidas para DVB de 64,8% (valor ajustado por el diseño de muestreo) son similares a las ya descritas a nivel mundial, que fluctúan de 60% a 80% (Lértora 2003), también en otros estudios en la zona sur de Chile 61% (Reinhardt y col 2002) y en la Provincia de Ñuble 54% (Peralta 2009), además, la presentación de PI encontrada (0,2%) corresponde a lo que se describe de 0,5% a 2% (Houe 1999), los que favorecen la diseminación de la enfermedad, tomando en cuenta que la prevalencia predial aumenta con el tamaño del rebaño, en los que las condiciones de hacinamiento y estrés pueden generar mayor diseminación e infección de este agente (Tan y col 2006, Anderson 2007, Felmer y col 2009). La alta coexistencia reflejada por la seropositividad conjunta a DVB y Neosporosis en el 65% de los predios analizados, también ha sido encontrada por otros autores (Sánchez-Castilleja y col 2012), el efecto de la coinfección con DVB se puede potenciar por su efecto inmunosupresor (Melo y col 2004, Obando y col 2010) y que, además, el uso de vacunas contra DVB no evita el pasaje viral de la madre al feto (Grooms 2004, Sánchez-Castilleja y col 2012). Se señala que el efecto de la vacunación en el control de los problemas de aborto puede tener un efecto aun cuando no se realicen en forma rutinaria pruebas diagnósticas para el agente infeccioso, como se recomienda en programas

Cuadro 3. Modelo de Regresión logística para las variables relacionadas con la positividad a *Neospora caninum*.
Logistic regression model for variables related to *Neospora caninum* positivity.

Factor	n	% Neospora	Odds Ratio	Valor P	IC 95%	
Comuna						
Bulnes	13	13,07%	–	–	–	–
Chillán	13	31,54%	2,68	0,003	1,39	5,20
Coihueco	6	23,33%	2,90	0,036	1,07	7,88
San Carlos	5	22,00%	2,19	0,091	0,88	5,44
San Nicolás	3	33,33%	1,97	0,164	0,76	5,12
Presencia perros						
No	7	10,00%	–	–	–	–
Sí	33	25,76%	3,85	0,007	1,44	10,26
Patio alimentación						
No usa	12	32,50%	–	–	–	–
Estacional	12	20,83%	0,59	0,114	0,31	1,13
Todo el año	16	17,50%	0,33	0,001	0,17	0,61
Toro celador						
No	35	66,86%	–	–	–	–
Sí	5	50,00%	0,29	0,005	0,12	0,69
Peso encaste vaquillas						
	Positivas	Negativas				
Cuartil 1	250	300				
Mediana	350	350	0,99	0,000	0,99	0,99
Cuartil 3	360	360				

Cuadro 4. Modelo de Regresión logística para las variables relacionadas con la positividad a *Leptospira spp.*
Logistic regression model for variables related to *Leptospira spp.* positivity.

Factor	n	% Leptospira	Odds Ratio	Valor P	IC 95%	
Presencia perros						
No	7	7,14%	–	–	–	–
Sí	33	14,84%	2,99	0,039	1,05	8,52
Patio alimentación						
No usa	12	17,5%	–	–	–	–
Estacional	12	10,8%	0,34	0,042	0,12	0,96
Todo el año	16	12,5%	0,32	0,008	0,14	0,74
Vaca cubre						
Toro	10	10,00%	–	–	–	–
Inseminación artificial	23	13,91%	1,95	0,178	0,74	5,15
Ambas	7	17,14%	3,82	0,023	1,20	12,18
Agua pozo abierto						
No	18	6,25%	–	–	–	–
Sí	22	13,63%	2,13	0,079	0,91	4,96
Peso encaste vaquillas						
	Positivas	Negativas				
Cuartil 1	275	300				
Mediana	350	350	0,99	0,000	0,98	0,99
Cuartil 3	360	360				
Uso vacuna Leptospirosis						
No	280	12,50%	–	–	–	–
Sí	120	15,83%	1,99	0,098	0,88	4,53

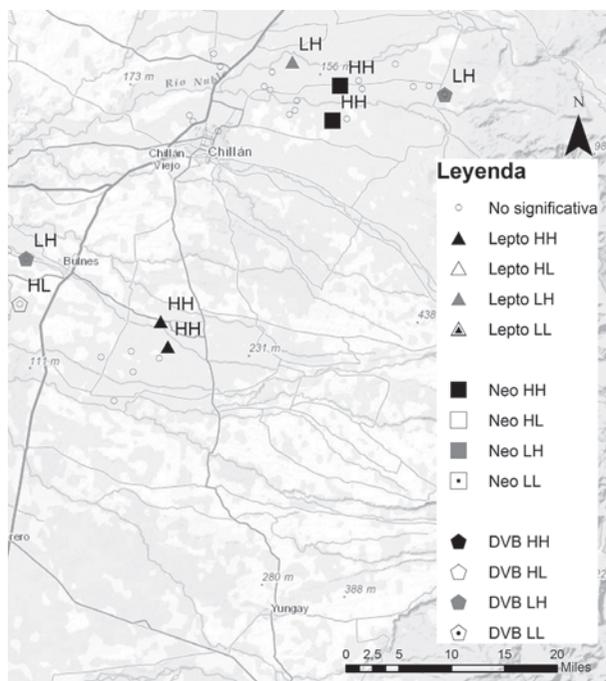


Figura 1. Análisis espacial (“Cluster and outlier”) para *Leptospira* (serie de ▲), *Neospora* (serie de ■) y BVD (serie de ◆), HH predio de alta prevalencia en zona de alta prevalencia, HL predio de alta en zona de baja prevalencia, LH predio de baja en zona de alta prevalencia, LL predio de baja en zona de baja prevalencia, prevalencia no significativamente diferente de las demás al 95% de confianza.

Cluster and outlier spatial analysis for *Leptospira* (series ▲), *Neospora* (series ■) and BVD (series ◆), HH high farm prevalence in high prevalence area, HL high farm prevalence in low prevalence area, LH low farm prevalence in high prevalence area, LL low prevalence farm in low area prevalence, prevalence not significantly different from the other at 95% confidence.

preventivos (Benavides y col 2010). En Chile la DVB no se encuentra dentro de programas de control de enfermedades, sin embargo, se ha demostrado que la vacunación preencaste se relaciona con aumento de las preñeces, de igual manera tienen un efecto protector contra los abortos a nivel poblacional (Wilke y col 2003, Waldner y Guerra 2013), aunque la vacuna no impide la transmisión vertical de esta enfermedad (Sánchez-Castilleja 2012).

Indicadores de condiciones de producción más intensivas como el uso de toro celador para DVB, inseminación artificial más toro para leptospirosis, son condiciones que se relacionan con predios de mayor prevalencia (cuadro 2), lo que es concordante con lo que plantean Waldner y Guerra (2003) y Sheldon y col (2006) acerca de que estas enfermedades se asocian a mayor tecnificación o predios elite.

En cuanto a neosporosis fue la segunda enfermedad más común en las lecherías (PV 87,4%) y en los animales (PV 22,4%), esta diferencia sugiere una alta diseminación entre las lecherías, pero menos dentro de ellas. De acuerdo con el análisis de distribución espacial (figura 1) y a los factores relacionados con la enfermedad (cuadro 3), se

identificaron con mayor prevalencia a las comunas de Chillán, Coihueco y San Carlos. La presencia de perros en contacto con el rebaño tuvo relación con mayor prevalencia para neosporosis (cuadro 3), lo que se puede atribuir a la diseminación de agentes, el estrés que pueden producir en las vacas los perros y el efecto inmunosupresor, lo que facilita los procesos de transmisión y persistencia de agentes (Benavides y col 2010, Sánchez-Castilleja y col 2012). De igual manera, se ha reportado la mayor asociación de la alta prevalencia de neosporosis con la presencia de perros que conviven con los bovinos dentro de los establos y en los predios, lo que se potencia con la falta de medidas de bioseguridad (Granados y col 2014). Esto puede favorecer el consumo de alimento o fuentes de agua contaminado con estos patógenos y las condiciones ambientales favorables para su sobrevivencia (Kurtde 2009). Los predios con menor prevalencia de neosporosis usaban toro celador, y patio de alimentación (cuadro 3), lo que puede ser un reflejo del efecto de la tecnificación predial (Mee y col 2012) y de la bioexclusión que se produce con el uso de patio (Barasona y col 2013). *Neospora caninum* puede ser adquirido por infección congénita, en la que algunas crías sobreviven y cuando llegan a su edad reproductiva lo transmiten verticalmente a su progenie. También se transmite horizontalmente por ingesta de ooquistes, donde además su hospedador definitivo es el perro y otros carnívoros (Cardoso y col 2012). Las vacas infectadas naturalmente pueden tener una tasa de transmisión transplacentaria de hasta 95% durante gestaciones sucesivas y producir repeticiones de aborto, además, las hijas de vacas infectadas tienen mayor riesgo de aborto (Pabón y col 2007). También se observó que los predios con prevalencias más altas encastan a pesos menores las vaquillas, lo que da cuenta del efecto de la enfermedad en la reproducción del rebaño (Waldner y Guerra 2013) y las medidas que intentan los propietarios para mitigarlos, en que los predios positivos comienzan a encastar antes a las vaquillas que los predios negativos (cuadro 3). Los brotes de aborto asociados a este patógeno pueden ser causados por un punto de infección o por reactivación de vacas infectadas crónicas. Niveles bajos de anticuerpos IgG son indicadores de infección reciente o reactivación, mientras que los títulos tienden a aumentar en las infecciones crónicas (Pabón y col 2007, Cardoso y col 2012). Sin embargo, para confirmar a este agente como causa de la enfermedad y mortalidad, es necesaria la detección histológica, inmunohistoquímica y molecular (Lassen y col 2012), esta dificultad genera que el control sea deficiente, junto a las bajas medidas de bioseguridad que se observaron en las lecherías de la provincia de Ñuble.

Respecto de leptospirosis, la distribución entre las lecherías fue menos frecuente que las anteriores enfermedades (PV 52,1%), y en las vacas (PV 13,0%). El análisis de las agrupaciones espaciales (figura 1) identifica mayor problemática en la comuna de Bulnes. A pesar de que la vacunación contra serovares de *Leptospira* sp. es frecuente

(30% de los animales), en los predios no vacunados la diseminación es importante, ya que en ellos los serovares más reaccionantes fueron Pomona (28,5%) y Hardjo (21,4%), los que han sido también los más encontrados en la zona sur de Chile (Salgado y col 2014), Hardjo se puede caracterizar por frecuentes reinfecciones pudiendo subir los títulos de anticuerpos y Pomona con infecciones más esporádicas (Grooms y Bolin 2005), sin embargo para identificar infecciones activas en un rebaño habría que realizar el diagnóstico del antígeno (OIE⁶). Se observó que la presencia de perros en contacto con el rebaño tuvo relación con mayor positividad para leptospirosis (cuadro 4), lo que se puede atribuir a la diseminación de agentes, el estrés que pueden producir en las vacas con el efecto inmunosupresor, lo que facilita los procesos de transmisión y persistencia de agentes (Benavides y col 2010, Sánchez-Castilleja y col 2012). Se encontró menor prevalencia de leptospirosis en predios que utilizan patio de alimentación (cuadro 4), lo que puede ser efecto de la bioexclusión que se produce con esta medida (Barasona y col 2013) además de la preocupación de los predios más tecnificados de implementar medidas para el mejor bienestar animal y control de enfermedades (Mee y col 2012). Sin embargo, para esta enfermedad, el uso en el predio de inseminación artificial más toro son condiciones que se relacionan con predios de mayor prevalencia (cuadro 4), lo que es concordante con lo que plantean Waldner y Guerra (2003) y Sheldon y col (2006) acerca de que esta enfermedad se puede asociar a predios de mayor tecnificación. Concordantemente con la epidemiología de la leptospirosis (Langston y Heuter 2003), se encontró que los predios con abastecimiento de agua desde pozos abiertos tienen más riesgo de tener animales positivos a esta enfermedad (cuadro 4). Al igual que en neosporosis, se observó que los predios con prevalencias más altas de leptospirosis encastan a pesos menores las vaquillas (cuadro 4), lo que da cuenta del efecto en el rendimiento reproductivo del rebaño (Waldner y Guerra 2013).

Cabe destacar que ninguna vaca resultó positiva a la prueba Rosa de bengala para *Brucella*, considerando la alta sensibilidad de la prueba (Martínez y Flores 2012), la probabilidad de falsos negativos sería de 1% (Dohoo y col 2003), mientras que la de falsos positivos 2,4%, esta baja prevalencia es relevante al considerar que en 1998 la provincia de Ñuble presentaba un nivel de 30% (López y Best 1998) y que desde 1996 fue aplicado el Programa de Erradicación de Brucelosis en Chile que se basó en la vacunación e instauración de un sistema de vigilancia por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (Lopetegui 2005).

El análisis realizado de los factores de riesgo en las regresiones logísticas (cuadros 2, 3 y 4), al provenir de un diseño epidemiológico de tipo transversal, no puede asegurar causalidad de los factores encontrados como

de riesgo o protección, sino que son un antecedente más para entender la problemática del SAB en esta región. Sin embargo, al realizar una apreciación conjunta de ellas, destacan medidas de manejo que se relacionan con la intensificación de producción, como es el uso de patio de alimentación y menor presencia de neosporosis y leptospirosis, de manera contraria la presencia de perros se asocia con predios con mayor prevalencia de neosporosis y leptospirosis, el abastecimiento de agua de pozos abiertos se asocia con leptospirosis, estos factores son consistentes con la epidemiología de ambas enfermedades (Kurtde 2009, Langston y Heuter 2003). Una de las medidas de control importantes para controlar las enfermedades abortigénicas analizadas son el monitoreo de las vacas que generarán reemplazos, así como cuidar las condiciones ambientales para disminuir la transmisión horizontal y la coinfección con otros patógenos como el virus de la DVB y serovares de *Leptospira spp.* (Grooms y Bolin 2005, Sánchez-Castilleja y col 2012). Se postula que la transmisión vertical tendría la mayor relevancia en la epidemiología de *Neospora caninum* (Sbruzzi y col 2012).

Se concluye que hubo una alta prevalencia de DVB seguido de neosporosis y leptospirosis, con diferencias en su distribución geográfica y predominio de correacionantes para DVB-neosporosis y DVB-leptospirosis, no se encontraron positivos a brucelosis, con lo que se aprecia el efecto del Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis llevado a cabo por el SAG.

Se asociaron las altas prevalencias de enfermedades abortigénicas, a la presencia de perros en neosporosis y leptospirosis, a la fuente de agua para leptospirosis, así como el efecto protector del uso de patio de alimentación. Esto da cuenta de la importancia del componente ambiental en la epidemiología de estas enfermedades y la necesidad de entenderlo para mejorar su control.

REFERENCIAS

- Anderson M. 2007. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology* 68, 474-486.
- Baker J. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* 190, 1449-1458.
- Barasona J, K VerCauteren, N Saklou, C Gortazar, J Vicente. 2013. Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction. *Prev Vet Med* 111, 42-50.
- Benavides B, C Jurado, D Cedeño. 2010. Factores de riesgo asociados a aborto bovino en la cuenca lechera del departamento de Nariño. *Rev MVZ Córdoba* 15, 2087-2094.
- Cardoso J, M Amaku, A Urias sos Santos, S Gennari. 2012. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. *Vet Parasitol* 187, 553-557.
- Carpenter T, M Chriel, M Anderson, L Wulfson, A Jensen, H Hove. 2006. An epidemiologic study of late term abortions in dairy cattle in Denmark, July 2000-August 2003. *Prev Vet Med* 77, 215-229.
- Celedón M, J Carbonell, L Ibarra, J Pizarro. 1998. Detección de bovinos portadores e inmunotolerantes al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Arch Med Vet* 30, 125-132.

⁶ <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre>

- Cho H, S Gale, S Masri, K Malkin. 1989. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars pomona, sejroe and hardjo in Cattle. *Can J Vet Res* 53, 285-289.
- Dehkordi A, H Shahbazkia, N Ronagh. 2011. Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. *Iranian Journal of Microbiology* 3, 135-139.
- Dohoo I, W Martin, H Stryn. 2003. *Veterinary epidemiology research*. AVC Inc, University of Prince Edward Island, Canada.
- Donald A. 1993. Prevalence estimation using diagnostic test when there are multiple, correlated disease states in the same animal or farm. *Prev Vet Med* 15, 125-145.
- Dubey J, J Carpenter, C Speer, M Topper, A Uggl. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192, 1269-1285.
- Felmer R, J Zúñiga, A López, H Miranda. 2009. Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. *Arch Med Vet* 41, 17-26.
- Gädicke P, G Monti. 2008. Aspectos epidemiológicos y de análisis del síndrome de Aborto Bovino. *Arch Med Vet* 40, 223-234.
- Gädicke P, R Vidal, G Monti. 2010. Economic effect of Bovine Abortion Syndrome in commercial dairy herds in southern Chile. *Prev Vet Med* 97, 9-19.
- Gädicke P, G Monti. 2013. Factors related to the level of occurrence of bovine abortion in Chilean dairy herds. *Prev Vet Med* 110, 183-189.
- Granados S, H Rivera, E Casas, F Suárez, C Arana, A Chávez. 2014. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de cuatro distritos del valle del Mantaro, Junín. *Rev Inv Vet Perú* 25, 58-64.
- Grooms D. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin Food Anim* 20, 5-19.
- Grooms D, C Bolin. 2005. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira spp.* *Vet Clin N Am Food A* 21, 463-472.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64, 89-107.
- INE, Instituto Nacional de Estadísticas, Chile. 2011. *Encuesta de ganado bovino. Regiones de Valparaíso a la de Magallanes y La Antártica Chilena. Julio-Octubre 2011*. INE, Santiago, Chile.
- Kleinbaum D, M Klein. 2002. *Logistic regresion. A self-learning text*. 2nd ed. Springer, New York, USA.
- Kurtdede A, K Ural. 2009. Serological status, epidemiology and prevalence of bovine *Neospora caninum* infection in Turkey: a review of published studies. *Rev Med Vet* 160, 244-251.
- Langston C, K Heuter. 2003. Leptospirosis: A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 791-807.
- Lassen B, T Orro, A Alekseev, K Raaperi, T Jarvis, A Viltrop. 2012. *Neospora caninum* in Estonia dairy herds in relation to herd size, reproduction parameters, bovine virus diarrhoea virus, and bovine herpes virus 1. *Vet Parasitol* 190, 43-50.
- Lértora W. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet* 14, 42-51.
- Lopetegui P. 2005. Avances de la erradicación de brucelosis bovina en Chile. *Boletín Veterinario Oficial* N°3, SAG.
- López J, N Poquet. 1990. Diagnóstico serológico de leptospirosis bovina en la Octava Región. Chile. *Agro-Ciencia* 6, 23-26.
- López J, A Best. 1998. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la Provincia de Ñuble (VIII Región). *Arch Med Vet* 30, 133-138.
- Lotterberger J, R Pauli, N Vanasco. 2002. Desarrollo y validación de un ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de leptospirosis bovina. *Arch Med Vet* 34, 89-95.
- Martínez M, L Flores. 2012. Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con elisa para el diagnóstico de brucelosis bovina. *REDVET* 13, 1-14.
- Mee J, T Geraghty, R O'Neil, S More. 2012. Bioexclusion of diseases from dairy and beef farms: Risk of introducing infectious agents and risk reduction strategies. *Veterinary J* 194, 143-150.
- Melo C, R Leite, Z Lobato. 2004. Infection by *Neospora caninum* associated with Bovine Herpesvirus 1 and Bovine Diarrhoea Virus in cattle from Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 119, 97-105.
- Nettleton P, J Gilray, P Russo, E Dliissi. 1998. Border disease of sheep and goats. *Vet Res* 2, 327-340.
- Obando C, M Bracamonte, A Montoya, V Cadenas. 2010. *Neospora caninum* en un rebaño lechero y su asociación con el aborto. *Revista Científica, FCV-Luz* 20, 235-239.
- Pabón M, F López-Gatius, I García-Ispuerto, G Bech-Sabat, C Nogareda, S Almería. 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. *Vet Parasitol* 147, 40-46.
- Patitucci A, M Pérez, K Israel, M Rozas. 2000. Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. *Arch Med Vet* 32, 209-215.
- Peralta P. 2009. Determinación de la prevalencia e incidencia de la diarrea viral bovina en individuos entre 6-24 meses de cinco predios lecheros de la Provincia de Ñuble, mediante la pesquisa de anticuerpos séricos utilizando la técnica de ELISA. *Memoria de título*, Escuela Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
- Pizarro-Lucero J, M Celedón, M de Calisto. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol* 115, 208-217.
- Reinhardt G, S Riedemann, N Tadich. 2002. Muestreo predial pequeño para predecir una infección activa por virus diarrea viral bovina (VDVB) en planteles lecheros de la X^a Región de Chile. *Arch Med Vet* 34, 97-101.
- Salgado M, B Otto, E Sandoval, G Reinhardt, S Boqvist. 2014. A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira spp* serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Vet Research* 10, 126.
- Sánchez-Castilleja Y, J Rodríguez, M Pedroso, S Cuello. 2012. Simultaneidad serológica de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* y los virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en bovinos pertenecientes al Estado de Hidalgo, México. *Rev Salud Anim* 34, 95-100.
- Sbruzzi J, M Amakua, A Urias dos Santos Araújo, S Gennari. 2012. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. *Vet Parasitol* 187, 553-557.
- Sheldon I, D Wathes, H Dobson. 2006. The management of bovine reproduction in elite herds. *The Vet Journal* 171, 70-78.
- StataCorp. 2012. *Stata Statistical Software/SE 12.0 for Windows*. College Station, StataCorp. LP, TX, USA.
- Tan M, M Karaoglu, N Erol, Y Yildirim. 2006. Serological and virological investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydin Province *Turk. J Vet Anim Sci* 30, 299-304.
- Thrusfield M, C Ortega, I de Blas, JP Noordhuizen, K Frankena. 2001. Win Episcopes 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 148, 567-572.
- Wagner B, M Salman. 2004. Strategies for two-stage sampling designs for estimating herd-level prevalence. *Prev Vet Med* 66, 1-17.
- Waldner C, A Guerra. 2013. Cow attributes, herd management, and reproductive history events associated with the risk of nonpregnancy in cow-calf herds in western Canada. *Theriogenology* 79, 1083-1094.
- Wilke G, I Grummer, B Moennig. 2003. Bovine Viral Diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals* 31, 113-118.
- Wouda W. 2000. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Vet Q* 22, 71-74.

