

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Estudos transversais em epidemiologia veterinária: utilização de modelos hierárquicos e revisão de métodos estatísticos para análise de desfechos binários

BRAYAN ALEXANDER FONSECA MARTINEZ

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Estudos transversais em epidemiologia veterinária: utilização de modelos hierárquicos e revisão de métodos estatísticos para análise de desfechos binários

Autor: BRAYAN ALEXANDER FONSECA MARTINEZ

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Veterinárias, especialidade na área de Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia.

Orientador: Dr. Luis Gustavo Corbellini

Co-orientadora: Dra. Vanessa Bielefeldt Leotti Torman

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Fonseca, Brayan

Estudos transversais em epidemiologia veterinária: utilização de modelos hierárquicos e revisão de métodos estatísticos para análise de desfechos binários / Brayan Fonseca. -- 2016.
88 f.

Orientador: Luis Gustavo Corbellini.
Coorientadora: Vanessa Torman.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. prevalência. 2. modelos mistos. 3. dados hierárquicos. 4. razão de prevalências. 5. modelo bayesiano. I. Corbellini, Luis Gustavo, orient. II. Torman, Vanessa, coorient. III. Título.

BRAYAN ALEXANDER FONSECA MARTINEZ

Estudos transversais em epidemiologia veterinária: utilização de modelos hierárquicos e revisão de métodos estatísticos para análise de desfechos binários

Aprovado em 17 de Junho de 2016

Aprovado por:

Prof. Dr. Luis Gustavo Corbellini
Orientador e presidente da comissão

Prof. Dra. Vanessa Bielefeldt Leotti Torman
Co-orientadora

Prof. Dra. Luciana Neves Nunes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mauro Riegert Borba
Membro da Comissão

Prof. Dra. Mari Lourdes Bernardi
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela nossa vida e por mostrar-me sempre o caminho. A minha mãe Rosalba pelos seus esforços, dedicação e amor incondicional. A minhas irmãs Laura e Angie por sua companhia e sorrisos.

Agradeço ao povo do Rio Grande do Sul por seus braços sempre abertos e hospitalidade. A Universidade Federal de Rio Grande do Sul e a Faculdade de Veterinária, obrigado por permitir-me ser parte desta alma mater. Agora posso dizer que sou filho da educação pública sul-americana, na qual creio firmemente ser o poder transformador de nossas sociedades. Que este trabalho, além de contribuir na ciência veterinária, contribua para unir ainda mais os laços de nossos povos.

A todos os professores que tive durante minha passagem pela UFRGS em especial a meus orientadores Luis Gustavo Corbellini, que depositou sua confiança em mim e me deu a oportunidade de ser parte de seu laboratório e a Vanessa Bielefeldt Leotti pelo incalculável apoio e confiança, sem o conselho e contribuições atenciosas deles esta etapa de minha vida não seria possível. Aos colegas do Epilab e Preventiva, Diego, Waldemir, Gustavo, Tati, Gabi, Claudia, Antônio, Eduardo, Ana, Heber e Mauro. Obrigado por suas valiosas amizades.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Estudos transversais em epidemiologia veterinária: utilização de modelos hierárquicos e revisão de métodos estatísticos para análise de desfechos binários

Autor: Brayan Alexander Fonseca Martinez

Orientador: Luis Gustavo Corbellini

Co-Orientadora: Vanessa B. Torman

RESUMO

Um dos estudos observacionais mais difundidos e usados em epidemiologia veterinária é o estudo do tipo transversal. Sua popularidade ocorre por fatores como baixo custo e rapidez comparados com outros tipos de estudos, além de ajudar a estimar a prevalência de uma doença (desfecho) e postular fatores associados com o desfecho, que poderão ser confirmados como fatores causais em outros tipos de estudos epidemiológicos. Porém, este tipo de estudo apresenta dois importantes desafios: a dependência dos dados, muito frequente dada a típica estrutura populacional de animais dentro do mesmo rebanho ou fazenda e a escolha da medida de associação para desfechos binários, tão frequentes neste modelo de estudo. Com o objetivo de contribuir com a compreensão global da epidemiologia do aborto bovino associado à *Neospora caninum* tendo em conta a estrutura populacional, construiu-se um modelo misto com os dados de um estudo transversal realizado em duas regiões do Rio Grande do Sul. Usaram-se dados de 60 propriedades amostradas em duas regiões (noroeste e sudeste) e 1256 bovinos. A porcentagem de aborto dentro de cada rebanho variou entre 1% e 30%. Vacas soropositivas tiveram 6,63 vezes mais chances de ter histórico de aborto (IC 95%: 4,41-13,20). As chances de uma vaca ter histórico de aborto foram 5,18 vezes maiores na região noroeste em relação à região sudeste (IC 95%: 1,83-20,80). Um coeficiente de correlação intraclasse de 16% foi estimado, indicando que 16% da variação da ocorrência de abortamentos não explicados pelos efeitos fixos foram devido as fazendas. Já na segunda parte deste trabalho, uma revisão sistemática foi realizada considerando um conjunto diverso de revistas e jornais com o objetivo de verificar os métodos estatísticos usados e a adequação das interpretações das medidas de associação estimadas em estudos transversais na área de medicina veterinária. Um total de 62 artigos foi avaliado. A revisão mostrou que, independentemente do nível de prevalência relatado no artigo, 96% deles empregou regressão logística e, portanto, estimaram razão de chances (RC). Nos artigos com prevalência superior a 10%, 23 deles fizeram uma interpretação adequada da RC como uma “razão de chances” ou simplesmente não fizeram uma interpretação direta da RC, enquanto 23 artigos interpretaram de forma inadequada a RC, considerando-a como risco ou probabilidade. Entre os artigos com prevalência inferior a 10%, apenas três interpretaram a RC como uma “razão de chances”, cinco interpretaram como risco ou probabilidade e em um, apesar de ter estimado a razão de prevalências (RP), foi interpretado de forma inadequada. Paralelamente, com o objetivo de exemplificar o uso de métodos estatísticos que estimam diretamente a razão de prevalências (RP), medida mais adequada para os estudos transversais, um conjunto de dados obtidos a partir

de um estudo transversal sobre a ocorrência de anticorpos (AC) contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) foi usado. Os AC foram medidos em amostras de tanque de leite de rebanhos leiteiros localizados no estado do Rio Grande do Sul, em que os possíveis fatores associados puderam ser avaliados. Entre os métodos utilizados, as maiores discrepâncias nas medidas de associação estimadas foram observadas com a regressão logística tomando-se como referência a regressão log-binomial. Finalmente, é importante que este tipo de desafio seja atendido pelos pesquisadores que realizam estudos transversais, ou seja, considerar a estrutura das populações nas análises, cuidado ao escolher o tipo de modelo estatístico empregado para desfecho binário e interpretação dos estimadores.

Palavras-chave: prevalência, modelos mistos, aborto, neosporose, dados hierárquicos, razão de prevalência, estudo transversal, razão de chances, modelo bayesiano.

Cross-sectional studies in veterinary epidemiology: use of hierarchical models and review of statistical methods for binary outcomes

Author: Brayan Alexander Fonseca Martinez

Advisor: Luis Gustavo Corbellini

Co-Advisor: Vanessa B. Torman

ABSTRACT

The commonest study design used in veterinary epidemiology is the cross-sectional study. Its popularity lies on the fact of the short time needed and low costs compared with other types of studies; moreover, this type of study estimates prevalence and associated factors, which may be elucidated as causal in another type of epidemiological studies. However, this type of study presents two major challenges: a very common dependence between data given the typical structure of the animal population, i.e., animals within herds or farms and the choice of measure of association for binary outcomes, frequently used in this type of study. In order to contribute to the understanding of the epidemiology of bovine abortion associated with *Neospora caninum*, a mixed model accounting for the hierarchical structure of cattle population using data from a cross-sectional study conducted in two regions (northwest and southeast) of Rio Grande do Sul was made. Data from 60 dairy herds and 1256 sampled cattle were used. The percentage of abortions in each herd ranged between 1% and 30%. Seropositive cows were 6.63 times more likely to have a history of abortion (95% CI: 4.41 to 13.20). The chances of a cow have a history of abortion were 5.18 times higher in the northwest comparing with the southeast region (95% CI: 1.83 to 20.80). An intraclass correlation coefficient (ICC) of 16% was estimated which means that 16% of the variation in abortion occurrence not explained by the fixed effects is due to farms. In the second part of this work, a systematic review was conducted considering a range of journals and newspapers in order to verify the statistical methods used and the adequacy of the interpretations of the measures of association estimated in cross-sectional studies from the veterinary medicine field. A total of 62 articles were revised. The review showed that, regardless of the reported prevalence, 96% of them employed logistic regression, therefore estimating odds ratio (OR). From the articles that reported prevalence rates above 10%, 23 of them did a proper interpretation of OR as an odds ratio, or simply did not make a direct interpretation of the OR, while 23 articles interpreted improperly the OR as a risk or probability. Among the articles that reported prevalence rates lower than 10%, only three interpreted the OR as an odds ratio, five interpreted as a risk or probability and only one, despite the estimated prevalence ratio (PR), it was improperly

interpreted. Meanwhile, in order to exemplify the use of statistical methods to estimate directly the PR, the more appropriate measure of association in cross-sectional studies, a data set obtained from a cross-sectional study to estimate the occurrence of antibodies (AB) against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in milk was used; AB were measured in bulk tank samples from dairy herds located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and also possible associated factors were estimated. Among the methods used, major discrepancies in the measures of association estimated were observed with the logistic regression, comparing with the log-binomial regression. Finally, it is important that such challenges are met by the researchers that undertake cross-sectional studies.

Keywords: prevalence, mixed models, abortion, neosporosis, hierarchical data, prevalence ratio, cross-sectional studies, odds ratio, Bayesian model.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 Frequências de exposição ao fator de risco e presença da doença..... 29

ARTIGO 1

Tabela 1 Results of *N. caninum* serology and history of abortions in animals, over 15 months of age, in 60 dairy farms in Rio Grande do Sul State, Brazil. 47

Tabela 2 Results of the mixed logistic regression with random intercepts, using data from 1256 adult cows in 60 dairy farms. 47

Tabela 3 Some of the predicted probabilities of a cow having a history of a previous abortion estimated for cows with the same status for *Neospora caninum* and age and distinct location in farms using the mixed logistic regression. 48

ARTIGO 2

Tabela 1 Peer-reviewed journals deemed among the veterinary science field presented on the SCImago Journal Rank (SJR)..... 70

Tabela 2 Studies selected in a strategic literature review including articles published from January 1st, 2013 to July 1st, 2016..... 71

Tabela 3 Results for the three variables associated to the presence of antibodies against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using different statistical methods. 73

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Estrutura típica populacional em medicina veterinária.....	16
Figura 2 Ciclo de vida <i>Neospora caninum</i> . Adaptado de DUBEY (1999).....	20
Figura 3 Relação entre a quantidade de estudos realizados por desenho e sua capacidade para demonstrar causalidade. Adaptado de FRONTEIRA (2013).....	26
Figura 4 Relação entre RC/RR e p_1 para distintos valores de p_0 (TORMAN, 2013).....	32

ARTIGO 1

Figura 1 ROC curve to compare two models.	49
---	----

ARTIGO 2

Figura 1 Results strategic review literature..	74
--	----

ABREVIATURAS E SIGLAS

NC: *Neopsoa caninum*

MCMC: do inglês Markov Chain Monte Carlo (Monte Carlo via Cadeias de Markov)

ICC: do inglês Intraclass Correlation Coefficient (Coeficiente de Correlação Intraclasse)

RC: Razão de Chances

RP: Razão de Prevalências

RR: Risco Relativo

GEE: do inglês Generalized Estimating Equations (Equações de Estimação Generalizadas)

DEFF: do inglês Design Effect (Efeito do delineamento)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.	MODELOS HIERÁRQUICOS E ABORTO BOVINO CAUSADO POR <i>NEOSPORA CANINUM</i>	16
2.1.1.	ESTRUTURAS POPULACIONAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA	16
2.1.2.	MODELOS ESTATÍSTICOS PARA DESFECHOS BINÁRIOS E DADOS DEPENDENTES. 16	
2.1.3.	NEOSPOROSE.....	18
2.1.4.	NEOSPOROSE BOVINA.....	19
2.1.4.1.	CICLO DE VIDA	19
2.1.4.2.	TRANSMISSÃO E ABORTO ASSOCIADO À <i>NEOSPORA CANINUM</i>	20
2.1.4.3.	FATORES ASSOCIADOS AO ABORTO PROVOCADO POR <i>NEOSPORA CANINUM</i> 21	
2.1.4.4.	FATORES RELACIONADOS À INFECÇÃO POR <i>NEOSPORA CANINUM</i>	22
2.1.4.5.	DETECÇÃO DA RELAÇÃO DE INFECÇÃO E DE ABORTO	23
2.2.	TIPOS DE ESTUDOS E MEDIDAS DE ASSOCIAÇÃO PARA DESFECHOS BINÁRIOS EM EPIDEMIOLOGIA	25
2.2.1.	ESTUDOS DESCRITIVOS E ANALÍTICOS	25
2.2.2.	ESTUDOS OBSERVACIONAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA	25
2.2.2.1.	ESTUDO DE COORTE.....	26
2.2.2.2.	CASO-CONTROLE	27
2.2.2.3.	ESTUDOS TRANSVERSAIS.....	28
2.2.3.	MEDIDAS DE ASSOCIAÇÃO	28
2.2.4.	MODELOS ESTATÍSTICOS PARA DESFECHOS BINÁRIOS E DADOS INDEPENDENTES 33	
3.	ARTIGO 1	36
4.	ARTIGO 2	50
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7.	APÊNDICE A. Comandos do modelo misto do artigo 1 no SAS ®	85
8.	APÊNDICE B. Comandos dos quatro modelos usados no artigo 2 no SAS ®	85
9.	APÊNDICE C. Comandos do modelo log-binomial bayesiano do artigo 2 no R.....	87

1. INTRODUÇÃO

Os estudos transversais são um tipo de estudo observacional onde a exposição e o desfecho são determinados simultaneamente para cada sujeito. Na medicina veterinária este tipo de estudo tem sido amplamente utilizado por razões tais como rapidez, menor tempo de execução e possibilidade de estimar a prevalência do desfecho na população. Uma característica importante das populações estudadas em veterinária é que os animais, dependendo de sua espécie, são mantidos em grupos como rebanhos, baias, refúgios etc. que, por sua vez, podem-se agrupar em regiões, fazendas, etc. Da mesma forma, é importante usar o modelo adequado para estimar corretamente a associação entre exposição e desfecho em estudos aplicados nas mais diversas estruturas populacionais além de realizar uma adequada interpretação das mesmas.

Na literatura é comum encontrar estudos que exploram a relação entre a ocorrência de aborto e a infecção por *N. caninum* em bovinos, mas só alguns consideram ou ajustam suas análises para levar em conta a estrutura hierárquica dos dados, ou seja, do agrupamento dos animais em fazendas. Contudo, é possível encontrar estudos que consideram este tipo de estrutura, mas as possíveis variações da probabilidade predita de aborto devido a infecção por *N. caninum* não foram interpretadas. Portanto, é importante ter mais estudos que tenham em conta esta estrutura populacional tão comum em medicina veterinária, pois isto permitirá avaliar o impacto da variação quando se inclui os agrupamentos assim como explorar a sua interpretação. A utilização de modelos hierárquicos, também conhecidos como modelos mistos ou modelos multiníveis, permite a análise de estruturas de dados em *cluster* ou aninhadas. Este tipo de modelo é usado principalmente nos seguintes casos: 1) para levar em conta a estrutura hierárquica dos dados e avaliar efeitos fixos de variáveis independentes e/ou efeitos aleatórios (efeitos que podem variar entre os níveis mais elevados de agrupamento) e 2) estimar a contribuição de vários níveis de organização para a variação total do desfecho de interesse (DOHOO *et al.*, 2009; STRYHN *et al.*, 2014). Neste caso específico, os efeitos das fazendas sobre a variação das prevalências de aborto intra-rebanho podem ser avaliados, e esta informação pode ajudar na compreensão da associação entre aborto e infecção por *N. caninum*.

Por outro lado, nos estudos transversais em que os desfechos binários (doente/ não doente, verdadeiro/falso, positivo/negativo) são frequentes, é comum encontrar a razão de chances (RC) como medida de associação entre exposição e desfecho. Para o delineamento transversal, a medida de associação é a razão de prevalências (RP), que é a comparação entre a prevalência do desfecho no grupo de expostos e não expostos (DOHOO *et al.*, 2009). Isso não significa que a RC não possa ser usada, mas deve ser interpretada de forma adequada. Desta forma, na literatura são comumente encontradas frases como “maior risco” ou “mais prováveis” para interpretar a RC. Estas frases são para descrever risco, não para descrever chance, e é importante não usá-las quando RC é a medida de associação utilizada na análise (O’CONNOR, 2013). Portanto, o uso da RC serve apenas para estudos de caso-controle e alguns autores incentivam o uso de RP para estudos transversais (ZOCCHETTI *et al.*, 1997; DEEKS, 1998; THOMPSON *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 2003).

O risco relativo (RR) apesar de ser matematicamente idêntico à RP pode ser utilizado apenas em ensaios clínicos e estudos de coorte (HOLCOMB *et al.*, 2001), devido ao fato de que os estudos transversais medem prevalência em vez do risco. É inadequado falar de risco nos delineamentos transversais já que o estabelecimento de uma relação causal entre a exposição e o desfecho não é possível dado que ambos são medidos simultaneamente, ou seja, não dá nenhuma indicação se a exposição ocorreu antes, depois ou durante o início da doença (LEVIN, 2006; CARLSON *et al.*, 2009). A RC pode ser interpretada como RP apenas para os desfechos raros. Quando o desfecho binário é comum (prevalência superior a 10%), a RC é distante do valor da RP levando a superestimação se RP é maior que um ou subestimação caso contrário (BARROS *et al.*, 2003; MCNUTT *et al.*, 2003; BEHRENS *et al.*, 2004; GREENLAND, 2004).

Uma razão para a popularidade da RC é que ela é estimada diretamente pela regressão logística (BARROS *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2009). No entanto, alternativas para estimar diretamente a RP têm sido propostas. Uma opção é o modelo log-binomial, um modelo linear generalizado, com distribuição binomial e função de ligação logarítmica (WACHOLDER, 1986; BARROS *et al.*, 2003; MCNUTT *et al.*, 2003; DEDDENS *et al.*, 2008). Outras opções são a regressão de Poisson e regressão de Poisson com variância robusta (BARROS *et al.*, 2003; NIJEM *et al.*, 2005). Porém, problemas de convergência têm sido descritos com a regressão log-binomial, especialmente quando existem variáveis independentes contínuas e, nesse caso, a regressão de Poisson com variância robusta deve ser utilizada (SPIEGELMAN *et al.*, 2005; BLIZZARD *et al.*, 2006; YELLAND *et al.*, 2011). A abordagem bayesiana para o modelo log-binomial foi proposta como uma alternativa quando o modelo log-binomial frequentista apresenta problemas de convergência (CHU & COLE, 2010). Além disso, a abordagem Bayesiana foi descrita como uma alternativa interessante quando os dados têm dependência (modelos mistos), o que é comum na medicina veterinária, além dos desfechos politômicos (TORMAN & CAMEY, 2015).

O presente trabalho foi dividido em duas partes com objetivos próprios: a primeira leva em conta a estrutura hierárquica nas análises, para contribuir com o entendimento da associação entre aborto bovino e *Neospora caninum* nos sistemas de produção de leite no estado de Rio Grande do Sul; a segunda parte, com base em uma revisão sistemática de estudos transversais publicados em revistas internacionais na veterinária, buscou-se identificar os métodos estatísticos utilizados e a adequação das interpretações dadas à medida de associação estimada. Adicionalmente se propôs ilustrar o uso de métodos que estimassem diretamente a razão de prevalências considerando-se os dados de um estudo transversal realizado no estado de Rio Grande do Sul. Como resultados deste trabalho foram desenvolvidos dois artigos mostrando e avaliando as problemáticas antes expostas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão de literatura deste trabalho será dívida em duas partes. Na primeira serão abordadas as estruturas populacionais típicas em medicina veterinária, os métodos estatísticos para desfechos binários e dados dependentes e aspectos epidemiológicos de neosporose bovina.

Já na segunda parte serão abordados os principais tipos de estudos descritivos e analíticos, medidas de associação em epidemiologia e sua estimação através de modelos estatísticos para desfechos binários e dados independentes.

MODELOS HIERÁRQUICOS E ABORTO BOVINO CAUSADO POR NEOSPORA CANINUM

2.0.1. ESTRUTURAS POPULACIONAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA

A maioria dos animais domésticos ao redor do mundo são mantidos em grupos, por exemplo, uma estrutura típica é mostrada na Figura 1 onde vacas podem estar agrupadas em fazendas que por sua vez podem estar agrupadas em regiões. Os dados originários deste tipo de estrutura são chamados de hierárquicos ou multiníveis (DOHOO *et al.*, 2001; STRYHN *et al.*, 2014). A estrutura apresentada na Figura 1 é uma estrutura de três níveis, sendo o mais baixo o nível dos bovinos (nível 1). Geralmente em veterinária encontra-se estruturas de dois ou três níveis. Num sentido formal a definição de estrutura hierárquica implica que unidades agrupadas em algum nível inferior também devem estar agrupadas em todos os níveis superiores (DOHOO, 2009).

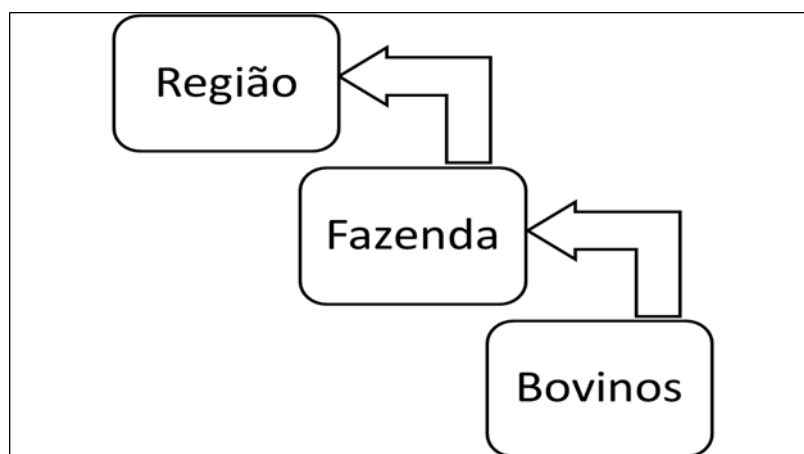


Figura 1 Estrutura típica populacional em medicina veterinária

2.0.2. MODELOS ESTATÍSTICOS PARA DESFECHOS BINÁRIOS E DADOS DEPENDENTES

A independência é uma suposição de muitos dos modelos estatísticos usados comumente em epidemiologia, como a regressão logística. Na medicina veterinária é comum que os dados analisados apresentem uma estrutura tipicamente hierárquica onde animais são mantidos em grupos, ou *clusters*. Outra forma de dependência acontece quando várias medidas de um desfecho

são tomadas no mesmo sujeito durante um período de tempo. A violação mais óbvia da suposição de independência ocorre quando rebanhos são amostrados e respostas individuais dos animais são avaliadas (MCDERMOTT *et al.*, 1994). O uso de modelos estatísticos que assumem que os desfechos são independentes quando esta suposição é violada pode levar a estimativas ineficientes dos parâmetros e seus erros padrão (ZEGER *et al.*, 1992).

A magnitude do efeito do agrupamento na estimativa da variância depende do coeficiente da correlação intraclassa (ICC, do inglês *intra-class correlation*) e do tamanho do *cluster*. O ICC é definido como a correlação que existe entre duas observações dentro do mesmo *cluster* (DOHOO *et al.*, 2009), mas também pode ser visto como a quantidade de variação no desfecho que não é explicada pelos efeitos fixos e sim pelo agrupamento (SNIJDERS *et al.*, 2012). Os métodos para estimar o ICC dependem do tipo de desfecho e modelo usado para a análise. Se o valor do ICC é o mesmo para todos os rebanhos ou fazendas, então a variância da média amostral do desfecho, por exemplo, a produção média de leite (\bar{Y}), para rebanhos de tamanho m é:

$$var(\bar{Y}) = \frac{\sigma^2}{m} [1 + (m - 1) * ICC] \quad (1)$$

onde σ^2 é a variância entre os indivíduos e $[1 + (m - 1) * ICC]$ é chamado de efeito do delineamento ou *deff* (do inglês, *design effect*). Este termo é a razão entre a variância da média em uma estrutura de dados agrupada e uma estrutura de dados com independência. Com a equação do *deff* é possível estimar quanto o tamanho amostral de um estudo precisa ser inflacionado para levar em conta adequadamente o agrupamento (DOHOO *et al.*, 2009).

Os métodos estatísticos para lidar com dados dependentes são classificados em dois grupos: os modelos GEE (do inglês, *generalized estimating equations*) e os modelos mistos. Os modelos GEE foram introduzidos pela primeira vez por Zeger e Liang (1986) e foram originalmente usados para levar em conta as medidas repetidas em sujeitos. As equações estimadas envolvem a média do desfecho através dos *clusters*, portanto, GEE produz estimativas com interpretação para a média da população (DIEZ, 2002), por isso é denominado de modelo marginal. Este método tem sido descrito para modelar medidas repetidas discretas e dados espaciais, além de ser um modelo teórico com poucas suposições (DOHOO *et al.*, 2009).

Na literatura os modelos mistos podem ser encontrados com outros nomes tais como modelos hierárquicos, modelos de efeitos aleatórios ou modelos multiníveis (MCDERMOTT *et al.*, 1994; STRYHN *et al.*, 2014). Como regra geral, nos modelos mistos, cada nível hierárquico acima do nível mais baixo (observação do desfecho) deve ser representado por um conjunto de efeitos aleatórios. Os efeitos aleatórios são variáveis latentes (não observadas) com distribuições próprias. Como os efeitos aleatórios são compartilhados por todas as observações dentro da mesma unidade de um nível hierárquico (por exemplo, todos os animais dentro de uma fazenda), eles induzem dependência entre as observações. Em resumo, os efeitos aleatórios são aqueles coeficientes da regressão que variam aleatoriamente entre sujeitos, enquanto os efeitos fixos não variam e são interpretados condicionalmente ao efeito aleatório (DIEZ, 2002). Os modelos de efeitos aleatórios remetem-se aos modelos lineares para dados normais, pelo menos na década de

1940, em trabalhos em genética e melhoramento animal, enquanto os modelos de efeitos aleatórios para dados não-normais começaram a aparecer na teoria e em aplicações na década de 1980. Este desenvolvimento foi feito usando os avanços na formulação de um modelo linear generalizado (STRYHN *et al.*, 2014), gerando a classe dos modelos lineares generalizados mistos.

Para desfechos binários em dados dependentes, a estimativa da RC pode ser feita usando regressão logística mista ou regressão logística com GEE. A representação da regressão logística mista é dada por:

$$\text{logit}(P(Y_{ij} = 1|X_{1ij}, \dots, X_{kij}, u_j)) = \beta_0 + \beta_1 X_{1ij} + \dots + \beta_k X_{kij} + u_j \quad (2)$$

Onde Y_{ij} é variável desfecho binário; β_0 é o intercepto; β_1, \dots, β_k são os parâmetros associados com os efeitos fixos; X_{1ij}, \dots, X_{kij} os k preditores do sujeito i no *cluster* j ; e u_j é o efeito aleatório do *cluster* j , com a suposição de que $u_j \sim N(0, \sigma_u^2)$, de modo que σ_u^2 é a variação entre *clusters*.

Para a interpretação da RC, obtida pela exponencial dos β , é necessário levar em conta que esta se refere à comparação de sujeitos com e sem a exposição num rebanho em particular. Os modelos com as características antes descritas são chamados de *subject-specific* ou *cluster-specific*, em contraste com o modelo GEE onde a RC compara sujeitos com e sem a exposição para qualquer *cluster* na população de *clusters*, sendo por isso chamados de *population-averaged* (DOHOO *et al.*, 2009; STRYHN *et al.*, 2014).

Já no cálculo do ICC para este modelo, o uso de variável latente é uma alternativa. Em resumo e sem perda de generalidade, o enfoque da variável latente para a regressão logística mista permite interpretar as variâncias em termos de componentes e o ICC fixando a variância do erro em $\frac{\pi^2}{3}$. Assim, a variância estimada do efeito aleatório (σ_u^2) na escala logit é usada para calcular o ICC usando a seguinte fórmula:

$$ICC = \frac{\sigma_u^2}{\sigma_u^2 + \frac{\pi^2}{3}} \quad (3)$$

Esta expressão é obtida considerando que o desfecho binário vem a partir da dicotomização de uma variável latente contínua, que pode ser explicada por um modelo com resíduos com distribuição logística padrão (SNIJDERS *et al.*, 2012).

2.0.3. NEOSPOROSE

Neospora caninum é um parasito coccídeo considerado uma das causas infecciosas de aborto mais importantes nos bovinos de leite e corte, além de ter sido reconhecido como um importante patógeno em cães (DUBEY *et al.*, 2011; SALEHI *et al.*, 2015). Este parasito com distribuição cosmopolita também já foi isolado em outras espécies de animais como equinos, caprinos, ovinos, cervos, raposas e vários outros canídeos (DUBEY, 2003). Quanto aos níveis de prevalência, existem

diferenças consideráveis entre os países, dentro dos países, entre regiões e entre bovinos de corte e de leite (KOIWAI *et al.*, 2005; BARTELS *et al.*, 2006).

A primeira observação deste agente foi feita na Noruega em cães (BJERKAS *et al.*, 1984) e a sua descrição como um novo gênero e espécie foi realizada no século passado (DUBEY *et al.*, 1988). Tendo em conta suas importantes consequências na produção bovina, isto tem motivado pesquisas ao redor do mundo para entender desde o mecanismo para desencadear aborto até fatores associados para diminuir seu impacto. Perdas de produtividade diretas devido à *N. caninum* incluem, além de abortos, outros problemas reprodutivos. Outros custos diretos associados com *N. caninum* incluem a perda de produção de leite em vacas com histórico de aborto, aumento do abate de vacas (DUBEY *et al.*, 2007).

O cão foi o primeiro hospedeiro definitivo de *N. caninum* descrito na literatura (MCALLISTER *et al.*, 1998) e estudos evidenciaram que os coiotes também eliminam oocistos pelas fezes (GONDIM *et al.*, 2004) sendo os primeiros canídeos selvagens confirmados como hospedeiros definitivos.

2.0.4. NEOSPOROSE BOVINA

2.0.4.1. CICLO DE VIDA

Para entender a dinâmica desta doença é necessário compreender seu ciclo de vida, que consta de três etapas infecciosas, sendo que as primeiras duas, os taquizoítos e os cistos teciduais contendo bradizoítos podem ser encontrados em hospedeiros intermediários como equinos, bovinos, caprinos e ovinos (ver **Figura 2**). Os cistos são localizados em tecido nervoso e eventualmente em tecido muscular. A forma que pode ser encontrada nas fezes de cães e coiotes no meio ambiente é o oocisto não esporulado. Este esporula no ambiente 24 horas após a eliminação. Os carnívoros provavelmente infectam-se pela ingestão de tecido contaminado (DUBEY, 1999). Assim, os cães infectados podem eliminar milhares de oocistos nas fezes, contaminar o ambiente, ração, água que servirão de fonte de infecção para os hospedeiros intermediários (GONDIM *et al.*, 2002). Quando os oocistos são ingeridos pelos hospedeiros intermediários ocorre a liberação dos esporozoítos no intestino, que penetram no epitélio e transformam-se em taquizoítos. Os taquizoítos penetram em diversas células do hospedeiro e se dividem rapidamente, causando lesões necróticas não supurativas de distribuição multifocal em diversos órgãos. Os taquizoítos eventualmente podem se transformar em bradizoítos organizados dentro de um cisto no interior das células, podendo permanecer latentes por um longo período (MCALLISTER *et al.*, 1998).

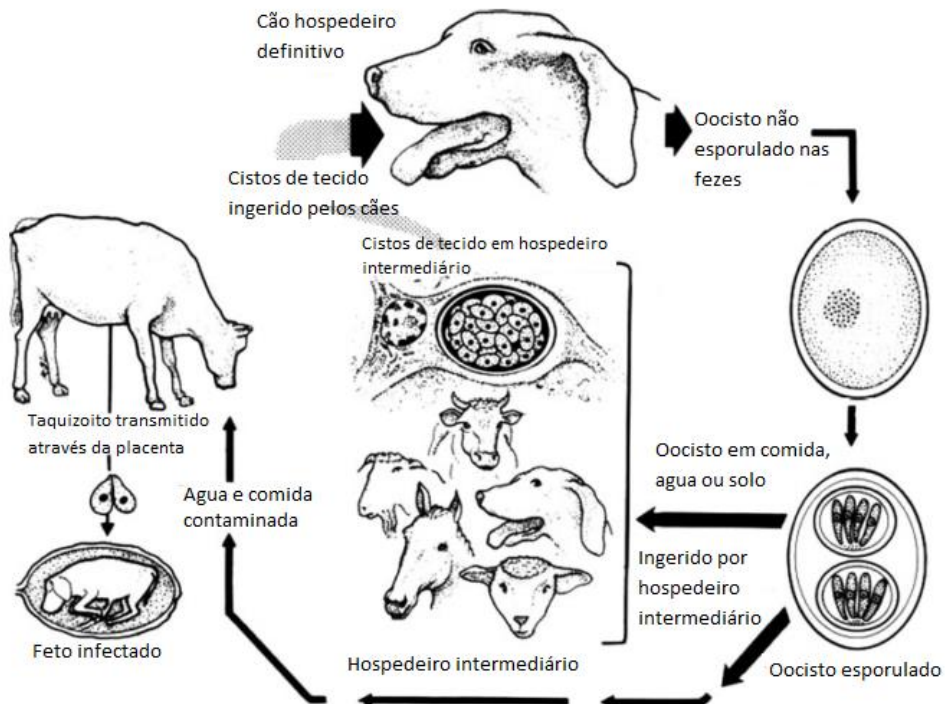


Figura 2 Ciclo de vida *Neospora caninum*. Adaptado de DUBEY (1999)

2.0.4.2. TRANSMISSÃO E ABORTO ASSOCIADO À *NEOSPORA CANINUM*

N. caninum é um dos parasitos mais eficientemente transmitidos via transplacentária entre todos os agentes infecciosos conhecidos em bovinos. Em certos rebanhos, praticamente todos os terneiros filhos de vacas soropositivas nascem infectados, mas assintomáticos (BERGERON *et al.*, 2000; HEIN *et al.*, 2012). A ocorrência de aborto associado a *N. caninum* pode apresentar dois tipos de padrões: endêmico ou epidêmico. Este último tipo de padrão de ocorrência de aborto tem sido reportado como o mais devastador e com grande impacto econômico, afetando 10% ou mais das vacas em risco de abortar num curto período de tempo (DUBEY *et al.*, 2007; REICHEL *et al.*, 2013). Se a epidemia de aborto é causada por uma exposição a alimentos ou água contaminados com oocistos, a variabilidade observada em relação ao risco de aborto nas vacas pode ser explicada por fatores tais como a dose de infecção, a patogenicidade da cepa do parasito no qual os animais foram infectados, e pela suscetibilidade das vacas prenhas (por exemplo, estado imunitário ou estado gestacional) (GONDIM *et al.*, 2004). Em contraste, um problema de aborto é considerado endêmico se persiste no rebanho por vários meses ou anos de uma forma constante (BERGERON *et al.*, 2000). Também tem sido reportado o padrão endêmico como causador de alto impacto econômico (HALL *et al.*, 2005). Descreve-se que nos anos após um surto epidêmico, o rebanho afetado pode sofrer abortos endêmicos (BJORKMAN *et al.*, 2003). Em muitos rebanhos com aborto endêmico, muitas vezes há uma associação positiva entre o estado sorológico das mães e seus descendentes, mostrando que há evidências de que a principal via de transmissão nestes rebanhos é vertical (BJORKMAN *et al.*, 1996; DIJKSTRA *et al.*, 2001).

Ambos os tipos de padrões, tanto endêmico como epidêmico, poderiam estar relacionados com as duas vias de transmissão de *N. caninum*, isto é, verticais ou horizontais (TREES *et al.*, 2005). A transmissão vertical ocorre quando taquizoitos a partir de uma vaca infectada atravessam a placenta e entram na circulação fetal (DUBEY *et al.*, 2007), enquanto que a transmissão horizontal pode ocorrer como resultado de ingerir água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados eliminados por cães infectados (BERGERON *et al.*, 2000; DUBEY *et al.*, 2007). Este último modo de transmissão é considerado como causa de abortos epidêmicos (MCALLISTER *et al.*, 2000).

Estudos têm mostrado que a transmissão da vaca aos seus descendentes pode ser altamente eficiente, variando de 75% a 100% (PARE *et al.*, 1997; SCHARES *et al.*, 1998; HEIN *et al.*, 2012). No entanto, a transmissão pós-natal ou horizontal, tem sido descrita afetando 10 de cada 100 animais, ou menos (DAVISON *et al.*, 1999). A associação entre aborto e infecção por *N. caninum* já tem sido mostrada, por exemplo, por estudos que estimaram que a razão de chances e o risco relativo podem variar de 1,7 a 18,9 (MOEN *et al.*, 1998; REICHEL *et al.*, 2013). Não tem sido observada transmissão vaca-vaca, mas há estudos experimentais mostrando que terneiros recém-nascidos poderiam infectar-se após a ingestão de leite contaminado com taquizoitos (UGGLA *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2001). No entanto, não existe evidência conclusiva de que a transmissão lactogênica de *N. caninum* ocorre na natureza (DIJKSTRA *et al.*, 2001). Outra forma de transmissão é a venérea, que pode ser possível, mas pouco provável, como evidenciado em novilhas infectadas experimentalmente por inoculação intra-uterina do sêmen contaminado com taquizoítos (SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007).

Na literatura é possível encontrar termos como "transmissão transplacentária exógena" e "transmissão transplacentária endógena" para descrever com mais precisão a origem da infecção transplacentária do feto. A primeira ocorre depois que um oocisto infecta uma vaca prenha, enquanto a transmissão transplacentária endógena ocorre em uma vaca infectada persistentemente após a reativação da infecção durante as prenhas. Independentemente da origem da infecção, nem todos os fetos infectados congenitamente morrem ou ficam doentes (TREES *et al.*, 2005).

2.0.4.3. FATORES ASSOCIADOS AO ABORTO PROVOCADO POR NEOSPORA CANINUM

Fatores que têm um efeito sobre a ocorrência de aborto epidêmico podem ser completamente diferentes daqueles que influenciam o risco de abortos endêmicos. Análises de fatores associados muitas vezes têm a desvantagem de que não há informação sobre o contexto (epidemia ou endemia), em que os abortos ocorreram (BARTELS *et al.*, 1999; WOUDA *et al.*, 1999). De fato, Dubey *et al.* (2007) aponta que a maioria das análises é baseada em estudos de caso-controlado limitada a rebanhos com surtos epidêmicos; portanto, os fatores de risco identificados em tais estudos podem ser relacionados apenas com a ocorrência de abortos epidêmicos. Entre os

fatores mais comumente citados encontram-se a soropositividade de animais individuais e soropositividade de rebanho.

SOROPOSITIVIDADE DE ANIMAIS INDIVIDUAIS

Vacas soropositivas têm maior chance de abortar que vacas soronegativas (DAVISON *et al.*, 1999a; CORBELLINI *et al.*, 2002;). Por exemplo, Corbellini *et al.* (2002) acharam que vacas soropositivas tiveram 2,3 maior chance de abortar que vacas soronegativas. A força da associação entre soropositividade e aborto em um único grupo de animais pode variar consideravelmente se diferentes provas sorológicas são utilizadas ou se, para o mesmo ensaio, diferentes valores de pontos de corte são aplicados. Consequentemente, as estimativas de razão de chances ou riscos relativos podem variar em relação ao teste sorológico aplicado (WALDNER *et al.*, 1998). Assim, a chance de aborto aumenta com níveis crescentes de anticorpos específicos nos animais (KASHIWAZAKI *et al.*, 2004). Estudos sugerem que os níveis individuais de títulos de anticorpos para *N. caninum* podem ser utilizados como uma ferramenta preditiva para a identificação dos animais com um alto risco de aborto em fazendas com uma alta soroprevalência de *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 2007).

SEROPOSITIVIDADE DE REBANHO

Estudos caso-controles e estudos transversais têm descrito que uma alta soroprevalência de *N. caninum* em rebanhos está associada positivamente com a ocorrência de aborto em nível de rebanho (HOBSON *et al.*, 2005). No entanto, nem todos os rebanhos com alta soroprevalência sofrem de aborto associado a *N. caninum* (BERGERON *et al.*, 2000; SCHARES *et al.*, 2004). Estudos de longo prazo em fazendas que tinham experimentado surtos de aborto revelaram ligeiro aumento nas taxas de aborto nos anos após o surto (PFEIFFER *et al.*, 2002). Uma recente exposição à infecção por *N. caninum* não resulta necessariamente em um aumento da taxa de aborto (PARE *et al.*, 1998; DIJKSTRA *et al.*, 2002). Isso colabora com a hipótese de que, afora a infecção, outros fatores podem estar associados ao aborto. Por exemplo, práticas como um sistema de torneira potável para as vacas, um rebanho fechado, o uso exclusivo de pasto para as vacas, a densidade animal, o tempo que um bezerro permanece com sua mãe e raça, foram associados com maiores chances de aborto (GADICKE *et al.*, 2013). Além disso, vários agentes etiológicos capazes de causar aborto em conjunto com *N. caninum* também poderiam estar envolvidos (WESTON *et al.*, 2012).

2.0.4.4. FATORES RELACIONADOS À INFECÇÃO POR NEOSPORA CANINUM

Certo número de fatores identificados como associados à infecção por *N. caninum* também parece influenciar no risco de aborto associado a *N. caninum*, em outras palavras são fatores de

confusão (DUBEY *et al.*, 2007). Entre os mais comumente citados na literatura encontram-se número de lactações, presença de cães e clima.

NÚMERO DE LACTAÇÕES

Alguns estudos em rebanhos com epidemia de aborto associados a *N. caninum* relataram um aumento de aborto com o aumento do número de lactações (WOUDA *et al.*, 1999). No entanto, em rebanhos com aborto endêmico associado a *N. caninum*, a associação com número de lactações parece ser invertida. Por exemplo, em um estudo de aborto em vacas leiteiras soropositivas para *N. caninum* o maior número de lactação foi identificado como um fator de proteção (LOPEZ-GATIUS *et al.*, 2005).

PRESENÇA DE CÃES

A presença de cães na fazenda e a frequência de observação de cães defecando nas pastagens foram associadas com um aumento do risco de aborto no nível de rebanho (HOBSON *et al.*, 2005). No entanto, devido ao fato que o aborto associado com *N. caninum* não está sempre ligado à transmissão horizontal, pois também ocorre em vacas infectadas cronicamente, não se pode esperar sempre uma associação positiva entre a presença ou o número de cães e o aborto bovino. Wouda *et al.* (1999) encontraram uma correlação positiva entre a soropositividade de cães e a soroprevalência em bovinos, indicando uma relação entre as infecções nos cães e bovinos.

CLIMA

Thurmond *et al.* (1995) observaram um padrão sazonal altamente significativo em relação ao número de fetos abortados submetidos à histopatologia na Califórnia. O maior número de casos positivos foi encontrado durante o inverno que, na Califórnia, é suave e úmido, em contraste com o verão, que é quente e seco. Nesse estudo, tomando em conta que existe sazonalidade do número de animais susceptíveis, este fator pode ser considerado como um confundidor.

As análises de fatores de risco para aborto em vacas soropositivas em dois rebanhos leiteiros espanhóis sugeriram que há uma relação significativa entre a precipitação pluviométrica e o aborto. O aumento das chuvas pode representar direta e indiretamente um estresse para o gado, seja por aumento na temperatura corporal em resposta a temperaturas baixas, ou estresse comportamental, ou menor qualidade dos alimentos dados ou, simplesmente, diminuição da higiene (LOPEZ-GATIUS *et al.*, 2005).

2.0.4.5. DETECÇÃO DA RELAÇÃO DE INFECÇÃO E DE ABORTO

Em fazendas com problemas de aborto, a sorologia materna e exames de fetos abortados devem ser efetuados. Nos rebanhos leiteiros, testes em tanque de leite podem ser utilizados como uma ferramenta de baixo custo para monitorar soroprevalência em vacas em lactação. Esta técnica pode detectar adequadamente soroprevalências de 15% ou mais em vacas em lactação

(FROSSLING *et al.*, 2006). No nível individual, soropositividade da vaca denota que um animal está infectado, embora a presença de anticorpos não dê a informação que a infecção está causando o aborto (DUBEY *et al.*, 2007).

Além disso, em uma percentagem relativamente elevada de rebanhos com neosporose endêmica, os níveis de anticorpos podem diminuir para abaixo do ponto de corte após o aborto (JENKINS *et al.*, 2002). Uma vez que a infecção por *N. caninum* e/ou aborto em um rebanho tenha sido demonstrada, a estimativa da soroprevalência e a investigação do padrão de aborto no rebanho são altamente recomendadas (DUBEY *et al.*, 2007). No entanto, o conhecimento da taxa de soropositividade entre as vacas que abortam é essencial para estabelecer a relação entre infecção por *N. caninum* e abortos. Esta taxa deve ser significativamente maior em vacas que abortam do que em vacas que não abortam (DUBEY *et al.*, 2011). Além disso, para investigar o padrão de aborto produzido por *N. caninum* no rebanho, é necessário estimar a razão de chances, que é um parâmetro indicativo do padrão de aborto (endêmico ou epidêmico). Um padrão endêmico do aborto é muitas vezes, mas nem sempre, relacionado com uma razão de chances menor que 10, enquanto que uma razão de chances maior que 10 pode ser um indicativo de um padrão de aborto epidêmico (SCHARES *et al.*, 2002).

A análise de amostras pareadas das vacas e suas filhas, amostras pré-colostrais e a distribuição etária dos animais soropositivos contribui para determinar se a transmissão vertical ou a horizontal, é predominante no rebanho. Se a transmissão é predominantemente vertical, as vacas e seus descendentes são soropositivos e há uma distribuição uniforme dos animais soropositivos em todos os grupos etários. Na transmissão horizontal da infecção, os animais soropositivos estão em diferentes grupos etários e não existe associação entre o diagnóstico sorológico das vacas e de seus descendentes (DIJKSTRA *et al.*, 2001).

Em adição à identificação da principal via de transmissão da infecção em um rebanho, técnicas sorológicas também podem ajudar a adotar algumas medidas básicas relativas às substituições de animais infectados. Em casos como compra ou venda, um estudo de infecção por *N. caninum* em animais que não abortaram é necessário. Deve ser levado em consideração que os anticorpos podem variar substancialmente e até mesmo podem cair abaixo do valor do ponto de corte do teste sorológico utilizado (CONRAD *et al.*, 1993). Em alguns casos, a amostragem depois de um período de 4 a 6 semanas é recomendada para amostras duvidosas. A utilização de um método a posteriori tal como *immunoblotting* também é útil (ALVAREZ-GARCIA *et al.*, 2003).

O exame de amostras pareadas da vaca e sua cria poderiam ajudar a definir falsos positivos e negativos onde a transmissão é predominante. A detecção de anticorpos também pode ser utilizada para determinar se um recém-nascido é infectado congenitamente. Em tais casos, uma amostra de soro deve ser tomada antes de mamar ou seis meses após o nascimento já que os anticorpos do colostro podem causar falsos positivos, pois os anticorpos maternos podem persistir por vários meses (WOUDA *et al.*, 1998).

TIPOS DE ESTUDOS E MEDIDAS DE ASSOCIAÇÃO PARA DESFECHOS BINÁRIOS EM EPIDEMIOLOGIA

Um dos aspectos centrais nas pesquisas epidemiológicas é identificar fatores causais que possam ajudar a prevenir ou controlar doenças. Para escolher o tipo de estudo, fatores como os objetivos da pesquisa, o contexto no qual será desenvolvida a pesquisa, fatores econômicos e os pontos fortes e fracos de cada delineamento devem ser levados em conta.

2.1.1. ESTUDOS DESCRITIVOS E ANALÍTICOS

Na literatura podem ser encontrados mais de um tipo de classificação para os estudos epidemiológicos, por exemplo, DOHOO *et al.* (2009) dividem os estudos em duas categorias: descritivos e analíticos. Estudos descritivos são utilizados unicamente para descrever a natureza e distribuição do desfecho. Apesar de que esses tipos de estudos não avaliam associação entre exposição e desfecho, eles são muitas vezes a primeira incursão sobre uma nova doença ou área de investigação e, portanto podem ser úteis para criar hipóteses que servirão para pesquisas em estudos analíticos (GRIMES *et al.*, 2002a).

Os estudos analíticos são usados para fazer comparações entre subgrupos de unidades de estudo baseados na condição de exposição ou desfecho e, assim, estes estudos permitem identificar associação estatística entre desfecho e exposição. Outras classificações utilizadas são baseadas em relação ao tipo de alocação da exposição ou variável de estudo, o número de medições efetuadas em cada unidade de estudo para verificar a ocorrência do evento e o momento do início da exposição ou da ocorrência do evento (ROTHMAN *et al.*, 2008).

Os estudos analíticos podem ser divididos em experimentais, pseudo-experimentais e observacionais. No primeiro caso, estudos experimentais, o pesquisador controla a exposição e utiliza alocação aleatória dos sujeitos. Em estudos pseudo-experimentais, o pesquisador controla a exposição, mas não utiliza um método aleatório para alocar os sujeitos. Finalmente, os observacionais ocorrem quando a exposição ocorre sem participação do pesquisador e de acordo com variáveis fora do controle do investigador (THRUSFIELD, 2007). A respeito do número de medições, os estudos podem ser classificados em longitudinais, quando se realizam mais de uma medição, ou transversais, quando se realiza somente uma medida sobre as unidades e se avalia a exposição e o desfecho ao mesmo tempo. Também podem ser classificados temporalmente, em prospectivos, se a ocorrência do evento é registrada durante o estudo, ou seja, se sujeitos do estudo estão livres do evento de interesse no início do estudo, ou retrospectivos, quando o evento investigado já ocorreu e planeja-se reconstruir a sua ocorrência no passado usando registros ou entrevistas (ROTHMAN *et al.*, 2008).

2.1.2. ESTUDOS OBSERVACIONAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA

Os estudos observacionais são amplamente utilizados em veterinária para direcionar e dar resposta a perguntas de pesquisa (THRUSFIELD, 2007; SARGEANT *et al.*, 2014). São utilizados para estimar a prevalência ou a incidência de uma doença, avaliar a precisão e validade de um teste

diagnóstico ou identificar e avaliar fatores de risco. É importante salientar que os resultados e conclusões deste tipo de estudos são utilizados para futuras pesquisas ou como insumo de revisões sistemáticas ou análises de risco (SARGEANT *et al.*, 2014).

A figura 3 mostra que a grande maioria de estudos observacionais usados em epidemiologia é de tipo transversal e por isso se localizam na base da pirâmide, ao mesmo tempo, também é possível observar que na escala de causalidade este tipo de estudo apresenta baixa capacidade. A seguir serão descritas brevemente, as características de cada estudo, com especial ênfase aos estudos transversais.



Figura 3 Relação entre a quantidade de estudos realizados por desenho e sua capacidade para demonstrar causalidade. Adaptado de FRONTEIRA (2013)

2.1.2.1. ESTUDO DE COORTE

Este tipo de delineamento é o mais próximo de um desenho experimental, além de ter um importante valor na escala de causalidade, uma vez que é possível verificar a relação causa e efeito corretamente no tempo (LEVIN, 2006). No entanto, uma vez que são estudos de observação, possuem importantes limitações, sendo uma delas a atribuição da exposição não controlada pelo pesquisador, de modo que não é possível controlar completamente possíveis diferenças entre grupos expostos e não expostos em relação a outros fatores associados com a ocorrência do desfecho (GRIMES *et al.*, 2002).

Neste tipo de estudo, a população estudada é definida a partir da exposição e deve ser composta de indivíduos em risco de desenvolver a doença estudada. Assim, a população inicial ou coorte é composta por expostos e não expostos, mas todos sem o desfecho. Uma vez formada esta população de estudo, ela é observada ao longo do tempo em que se registra a ocorrência do evento de interesse ou variável resposta (desfecho) (GREENLAND, 2004).

Este tipo de estudo pode ser prospectivo ou retrospectivo, assim, o caso descrito anteriormente é prospectivo. Já no segundo caso, se inicia definindo o grupo de expostos e não expostos em algum ponto prévio, em seguida, a experiência da coorte é reconstruída ao longo do tempo, identificando os sujeitos e avaliando-se até a data atual em que já desenvolveram o evento de interesse (GRIMES *et al.*, 2002).

A validade da comparação dependerá de não haver diferença (além da exposição) entre grupos expostos e não expostos. Qualquer diferença em relação a uma terceira variável entre o grupo exposto e não exposto que esteja relacionada com a ocorrência do evento poderia distorcer os resultados sobre a real associação entre a exposição e o evento (DOHOO *et al.*, 2009). O caso anterior é conhecido como confundimento e deve ser controlado através de estratégias no delineamento do estudo ou com técnicas durante as análises como estratificação ou análises de regressão múltipla (HOSMER *et al.*, 2000).

Os estudos de coorte são difíceis de executar e caros. Considera-se que este tipo de desenho é ineficiente para o estudo de doenças raras porque o número adequado de unidades necessárias para registrar casos seria muito grande e o tempo de acompanhamento deveria ser longo (MANN, 2003). Neste tipo de estudo, a medida de ocorrência relativa indicada é o risco. O risco é um termo frequentemente utilizado na medicina para indicar a probabilidade que um resultado adverso, tal como um efeito colateral, desenvolvimento de uma doença ou morte, aconteça durante um determinado período de tempo. Na maioria das vezes, um pesquisador estima o risco de uma determinada população tomando uma amostra aleatória representativa, contando aqueles que experimentaram o resultado adverso durante um determinado período de tempo. Ou seja, dividindo o número de resultados adversos pelo tamanho da amostra (SISTROM *et al.*, 2004).

2.1.2.2. CASO-CONTROLE

A principal característica do delineamento caso-controle é que os critérios de seleção da população do estudo são baseados na presença (casos) ou ausência (controles) do evento em estudo. O pesquisador é quem determina o número de eventos para estudar (casos) e o número de indivíduos sem evento (controles) para ser incluído como população de referência (ROTHMAN *et al.*, 2008). Deste modo, os grupos de indivíduos com o evento (casos) e sem o evento (controles) são comparados em termos de exposição que eles tiveram ao fator causal em estudo (SCHULZ *et al.*, 2002).

Entre as condições para este tipo de estudo os grupos devem ser selecionados da mesma população alvo, ou seja, os controles representam a população em risco de se tornar casos (WACHOLDER *et al.*, 1992; GRIMES *et al.*, 2005). Os estudos de caso-controle não têm uma relação causal perfeita, pois o evento é avaliado depois da causa e nem sempre pode-se inferir que a causa precedeu o evento (KNOL *et al.*, 2008). A natureza retrospectiva de estudos de caso e controle faz com que este tipo de estudo seja particularmente vulnerável à introdução de erros em processos de seleção ou à coleta de dados, mas são frequentemente utilizados para estudos

com desfechos raros (THRUSFIELD, 2007; DOHOO *et al.*, 2009). A medida de frequência do desfecho neste tipo de estudos é a chance, a qual é igual probabilidade que o evento ocorra dividida pela probabilidade que o evento não ocorra (ZOCCHETTI *et al.*, 1997; GRIMES & SCHULZ, 2008).

2.1.2.3. ESTUDOS TRANSVERSAIS

Este tipo de desenho é um dos estudos observacionais mais frequentemente utilizados em epidemiologia veterinária, talvez por razões tais como rapidez, baixo custo e dificuldade moderada. A medida de frequência do desfecho é a prevalência, baseada no número de casos que já existem na população de estudo (DOHOO *et al.*, 2009).

As características principais deste tipo de estudo são: a presença da exposição e a ocorrência do evento são avaliadas ao mesmo tempo, pois uma vez formadas a população de estudo apenas uma medição é feita em cada objeto de análise; o número de eventos e a proporção de indivíduos com a exposição são determinados pela frequência com que aqueles ocorrem na população elegível, estando, portanto, fora do controle do pesquisador (LEVIN, 2006; GRIMES *et al.*, 2008). Isto contrasta com estudos de coortes ou estudos de caso-controle, no qual o pesquisador pode previamente definir a proporção de expostos (estudo de coorte) ou a proporção de casos (estudo de caso-controle) (GRIMES *et al.*, 2002). Uma desvantagem deste desenho é que não se pode fazer inferência causal. Nesse sentido não se pode falar em risco, dado que a exposição e o desfecho são medidos simultaneamente (DOHOO *et al.*, 2009).

2.1.3. MEDIDAS DE ASSOCIAÇÃO

A relação entre um fator de exposição e um desfecho pode ser expressa através de medidas que quantificam a magnitude dessa associação. Por outro lado, é importante lucidar que medidas de significância estatística não podem ser usadas para mostrar a magnitude da associação, pois são altamente dependentes do tamanho amostral (DOHOO *et al.*, 2009). O delineamento do estudo e o tipo das variáveis estudadas são aspectos que definem qual medida de associação é a mais adequada para aferir esta relação (GRIMES *et al.*, 2002). A seguir será demonstrada a descrição de risco relativo, razão de chances, razão de prevalências.

No caso em que o delineamento é coorte ou experimental, a medida de associação indicada é o risco relativo (RR), chamado também de razão de riscos. O RR expressa a razão das probabilidades de ocorrência do desfecho entre os expostos em relação aos não expostos, isto é, representa o risco relativo de desenvolver o desfecho nos expostos em relação aos não expostos (OSPINA *et al.*, 2012). A relação entre um fator de exposição e um desfecho dicotômico (presença ou ausência de doença) na população está representada na Tabela 1.

Tabela 1 Frequências de exposição ao fator de risco e presença da doença.

Exposição	Desfecho		Total
	Doente	Não doente	
Exposto	a_1	b_1	n_1
Não exposto	a_0	b_0	n_0
Total	m_1	m_0	n

Na Tabela 1, temos que:

a_1 Número de sujeitos expostos que têm a doença

a_0 Número de sujeitos não expostos e que têm a doença

b_1 Número de sujeitos expostos sem doença

b_0 Número de sujeitos não expostos e sem doença

Mediante o uso da Tabela 1, podemos definir o risco relativo como:

$$RR = p(D + | E+) / p(D + | E-) = (a_1/n_1) / (a_0/n_0) \quad (4)$$

Onde D+ indica que o sujeito é doente, E+ que o sujeito esteve exposto e E- que não esteve exposto ao fator estudado. Assim, esta notação indica que o RR é a probabilidade de estar doente dado que o sujeito esteve exposto dividida pela probabilidade de estar doente dado que o sujeito não este exposto.

O valor de RR varia de zero até infinito. A seguir algumas interpretações:

RR <1 exposição é protetiva;

RR =1 exposição não tem associação com o desfecho;

RR >1 exposição é de risco.

Já nos estudos de tipo transversal, essas mesmas probabilidades são chamadas de prevalências e a razão entre elas é chamada de razão de prevalências (RP). Visto que matematicamente ela é igual a RR, pode ser calculada da mesma forma que o RR. Usando a tabela 1, temos:

$$RP = \frac{(a_1/n_1)}{(a_0/n_0)} \quad (5)$$

O RR não pode ser usado em estudos de caso-controle, pois a probabilidade de um animal ser doente é um valor arbitrário determinado pelo número de casos e controles incluídos no estudo (RUMEL, 1986; DOHOO *et al.*, 2009). Assim, a medida de associação indicada entre fator de exposição e desfecho é a razão de chances (RC).

A RC é definida como a razão das chances de desfecho entre o grupo exposto e o não exposto. A chance do desfecho no grupo exposto é igual à probabilidade que a doença ocorra dividida pela probabilidade que a doença não ocorra nesse grupo. Usando a Tabela 1, temos:

$$Chance_{\text{expostos}} = (a_1/n_1)/(b_1/n_1) = \frac{a_1}{b_1} \quad (6)$$

No entanto, a chance do desfecho no grupo de não expostos é igual à probabilidade de que a doença ocorra dividida pela probabilidade de que a doença não ocorra nesse grupo:

$$Chance_{\text{Não expostos}} = (a_0/n_0)/(b_0/n_0) = \frac{a_0}{b_0} \quad (7)$$

A razão dessas duas chances é o valor da RC que pode ser definida com base na Tabela 1, como:

$$RC = \frac{Chance_{\text{expostos}}}{Chance_{\text{Não expostos}}} = \frac{\frac{a_1}{b_1}}{\frac{a_0}{b_0}} = \frac{a_1 b_0}{b_1 a_0} \quad (8)$$

Dado que a RC é a medida de eleição em estudos de caso-controle, não tem sentido estimar a RC do desfecho porque a proporção de casos está fixada e, no seu lugar, estima-se a RC da exposição nos grupos de doentes e não doentes. Com base na Tabela 1, temos:

$$RC = \frac{Chance_{\text{Doentes}}}{Chance_{\text{Não doentes}}} = \frac{\frac{a_1}{a_0}}{\frac{b_1}{b_0}} = \frac{a_1 b_0}{b_1 a_0} \quad (9)$$

Observa-se que (8) e (9) são equivalentes, portanto RC é a única medida de associação que mostra simetria e que permite trocar os papéis da exposição e do desfecho (HOSMER *et al.*, 2000; CUMMINGS, 2009). Os pontos de corte para interpretação da RC são os mesmos que RR. Um valor RC igual a 1 indica inexistência de associação, <1 e >1 indicam fator de proteção e fator de risco, respectivamente.

Neste ponto, é importante salientar que RR ou RP utilizam como insumo para seu cálculo a probabilidade, enquanto que a RC utiliza a chance. Como já mencionado, a chance de um

resultado é igual à probabilidade de que o resultado ocorra dividido pela probabilidade de que o resultado não ocorra. Assim, a chance pode ser um valor maior que 1 (CUMMINGS, 2009; SISTROM E & GARVAN, 2004). Existe uma relação entre chance e probabilidade, por exemplo, se as chances de um animal sobreviver após uma cirurgia são 5:2, ou equivalentemente 5/2 ou 2,5, indicando que a cada dois animais submetidos à cirurgia que não sobrevivem cinco conseguem sobreviver. Então, a probabilidade de o animal sobreviver pode ser calculada com base na relação determinística existente entre chance e probabilidade:

$$Chance = \frac{P(\text{Sobreviver}|\text{Cirurgia})}{1-P(\text{Sobreviver}|\text{Cirurgia})} \quad (10)$$

Assim no exemplo anterior, a probabilidade de sobreviver seria igual a $5/7=0,71$ ou 71%.

Na literatura podem ser encontradas fórmulas que relacionam RC e RR, assim, é possível chegar à expressão:

$$RC = RR * \frac{1-p_0}{1-p_1} \quad (11)$$

Onde p_0 é a probabilidade de o desfecho acontecer no grupo não exposto e p_1 a probabilidade de o desfecho acontecer no grupo exposto. Pela equação (11) é possível observar que se p_0 e p_1 forem próximas de zero, a RC será próxima de RR. O segundo fator na equação (11) é o viés responsável pelas discrepâncias entre RC e RR. Se a relação entre exposição e desfecho é positiva, então, $p_0 < p_1$ assim $1-p_0 > 1-p_1$ e, portanto $(1-p_0)/(1-p_1)$ é maior que 1, e assim a RC superestimar o RR. Por analogia, se o fator é protetivo, a RC subestimar o RR (THOMPSON *et al.*, 1998; GRIMES *et al.*, 2008).

Através da Figura 2, que ilustra a razão entre RC/RR em função de p_1 para vários valores de p_0 , é possível observar que RC e RR são próximas quando não há associação do fator de exposição com o desfecho.

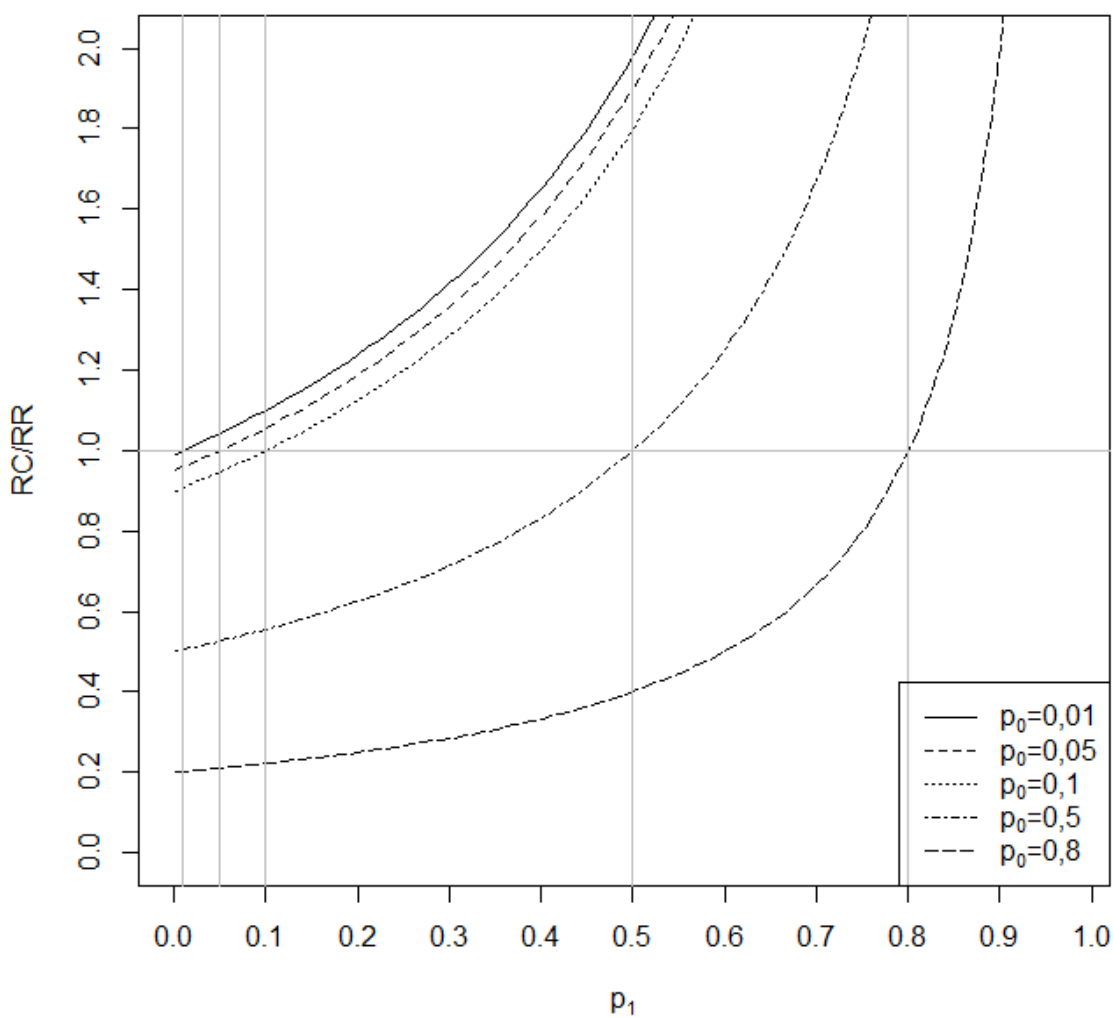


Figura 4 Relação entre RC/RR e p_1 para distintos valores de p_0 (TORMAN, 2013)

Portanto, só é recomendável interpretar a RC como RR, e vice-versa, quando o desfecho é raro em cada estrato de exposição (TORMAN & CAMEY, 2015). Não há unanimidade na definição de evento raro, podendo variar a probabilidade limite de 5% até 30% (MCNUTT *et al.*, 2003). No entanto, em várias publicações, define-se desfecho raro quando a probabilidade for menor de 10% (ZOCCHETTI *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1998; MCNUTT *et al.*, 2003; NIJEM *et al.*, 2005). Por exemplo, MCNUTT *et al.* (2003) e ZOCCHETTI *et al.* (1997) focaram seus trabalhos em casos em que p_1 ou p_0 eram maiores que 10%. Este problema na interpretação da RC tem sido amplamente discutido na literatura. Autores descrevem a RC como incompreensível, pouco intuitiva e, muitas

vezes, é erroneamente interpretada (LEE, 1994; SACKETT *et al.*, 1996; GRIMES *et al.*,2008; SCHMIDT *et al.*, 2008).

Em conclusão, vários autores recomendam RR para coorte, RP para transversais e RC apenas para caso-controle, apesar que RC pode ser calculada em todos (ZOCCHETTI *et al.*, 1997; THOMPSON *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 2003). Especificamente em veterinária, alguns autores tem questionado o uso da RC em estudos experimentais e de coortes e em seu lugar indicam para estes casos o RR (BEAUDEAU *et al.* 1998; OSPINA *et al.* 2012; O'CONNOR, 2013;).

2.1.4. MODELOS ESTATÍSTICOS PARA DESFECHOS BINÁRIOS E DADOS INDEPENDENTES

Uma razão para a popularidade da utilização da RC é que ela é diretamente estimada pela regressão logística, modelo estatístico para um desfecho que assume valor 1 se o evento de interesse ocorre e 0 se o evento de interesse não ocorre, isto é, binário. Uma das suposições da regressão logística é que as observações sejam independentes uma das outras. Por exemplo, se os animais são mantidos em grupos ou várias observações são feitas no mesmo animal, a suposição de independência seria violada. Se grupos de animais são mantidos em diferentes rebanhos ou fazendas haveria duas fontes de variação: a variação entre animais e a variação devida às diferenças entre rebanhos ou fazendas (DOHOO *et al.*, 2001). A partir de agora serão colocadas notações no contexto de estudos transversais, isto é, apenas a RP será mencionada, mas os métodos também se aplicam para o RR já que estas medidas são matematicamente iguais como foi explicado anteriormente.

Para estimar diretamente a RP, foram propostos outros métodos que utilizam as abordagens estatísticas clássica ou bayesiana. A diferença entre as duas abordagens é que a primeira assume os parâmetros desconhecidos do modelo analisado como constantes, enquanto a segunda os considera aleatórios e com distribuições de probabilidade correspondentes.

A primeira opção é um método proposto por ZHANG *et al.* (1998) que converte a RC obtida pela regressão logística. Sua fórmula é:

$$RP = \frac{RC}{(1-p_o)+(p_o*RC)} \quad (12)$$

Onde p_o é a prevalência no grupo de não expostos. A mesma fórmula pode ser aplicada para obter o limite inferior e superior do intervalo de confiança. Estudos de simulação mostraram que a correção de Zhang e Yu produz estimativas superestimadas da RP e intervalos de confiança com baixa cobertura, pois a fórmula considera apenas a prevalência nos não expostos (MCNUTT *et al.*, 2003) e por tanto seu uso nos artigos recentes é pouco frequente.

A análise estratificada de Mantel-Haenszel também foi proposta como alternativa. Este método estima uma medida de associação entre uma exposição e um desfecho considerando

possíveis variáveis de confusão, onde todas as variáveis devem ser categóricas, sendo isto um grande limitante (GIMENO *et al.*, 1995). Outra limitação deste método é a quantidade de categorias e de variáveis de confusão a ser considerada no estudo, pois quanto maior o número de estratificações, maior deve ser o tamanho da amostra para que todas as tabelas tenham uma quantidade aceitável de indivíduos (ZHANG *et al.*, 1998). O procedimento permite resumir em uma única medida de associação informações de diferentes tabelas de contingência.

A regressão de Poisson e sua versão com variância robusta foram propostas (BARROS *et al.*, 2003; MCNUTT *et al.*, 2003; ZOU, 2004). Os dois modelos podem, eventualmente, estimar probabilidades superiores a 1 dado que a distribuição do desfecho é de Poisson ao invés de ser Binomial que é a distribuição natural para desfechos binários (NIJEM *et al.*, 2005).

Para definir o modelo usando regressão de Poisson, considere-se um desfecho binário:

$$\ln(\lambda_i) = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \dots + \beta_k X_{ki} \quad (13)$$

Onde λ_i é média para a i -ésima observação (neste caso, esta média aproxima a prevalência do desfecho), condicional aos preditores; β_0 é o intercepto; $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ são os coeficientes dos k preditores; e $\exp(\beta_1), \dots, \exp(\beta_k)$ são as RP associadas para cada um dos preditores.

A regressão de Poisson pode estimar intervalos de confiança muito amplos. Isto porque, quando a regressão de Poisson é aplicada a dados binomiais, as variâncias dos estimadores são superestimadas, pois a variância da distribuição de Poisson aumenta progressivamente, enquanto a variância da distribuição binomial tem seu valor máximo quando a prevalência é 50% (COUTINHO *et al.*, 2008). Isto produz um intervalo de confiança para a RP menos preciso do que o verdadeiro no caso do desfecho ser comum (>10%) (BARROS *et al.*, 2003). Por essa razão, a regressão de Poisson robusta foi proposta como alternativa (LIN *et al.*, 1989; BARROS *et al.*, 2003; ZOU, 2004).

O modelo log-binomial é um modelo linear generalizado com distribuição binomial e função de ligação logarítmica (WACHOLDER *et al.*, 1986; BARROS *et al.*, 2003; PETERSEN *et al.*, 2008). Este modelo foi proposto em 1986, e sua equação é a seguinte:

$$\theta_i = P(Y_i = 1 | X_{1i}, X_{2i}, \dots, X_{ki}) = \exp(\beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} \dots + \beta_k X_{ki}) \quad (14)$$

$$i = 1, 2, \dots, n$$

Onde n é o tamanho da amostra; Y_i assume valor 0 ou 1 para a i -ésima observação com Y_i e Y_j independentes para todo i ; β_0 é o intercepto; $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ são os coeficientes dos k preditores, e $\exp(\beta_1), \dots, \exp(\beta_k)$ são as RP associadas a cada um. Note que, em estudos transversais, θ_i são as prevalências condicionais aos valores dos preditores. Para que estas sejam válidas, devem estar no intervalo [0,1] para todo i . Isto implica que $\beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} \dots + \beta_k X_{ki} \leq 0$ para todo i . Portanto, devido ao espaço paramétrico restrito, problemas de convergência do método estatístico de obtenção das estimativas podem ocorrer. Esse problema de convergência ocorre

especialmente quando há variáveis independentes contínuas e quando o desfecho é muito comum (COUTINHO *et al.*, 2008). Em tal situação, além da regressão de Poisson com variância robusta como alternativa, a abordagem bayesiana para o modelo log-binomial foi proposta (CHU & COLE, 2010). Outro problema reportado neste método é que o intervalo de confiança calculado para a RP ajustada pode ser mais estreito do que é verdadeiramente (SKOV *et al.*, 1998; MCNUTT *et al.*, 2003). CHU *et al.*, (2010) propuseram a análise bayesiana para o modelo log-binomial. Nesta abordagem deve-se especificar a distribuição *a priori* para os parâmetros, que podem ter informações prévias ao estudo ou serem definidas de forma a não alterar a informação dos dados amostrais. Depois de observada a amostra, combina-se a informação da mesma, representada pela função de verossimilhança, com a *priori*, gerando a distribuição *a posteriori*. É a partir da distribuição *a posteriori* que todas as inferências são feitas sob a abordagem bayesiana, ou seja, média, mediana, moda e intervalo de credibilidade (homólogo ao intervalo de confiança clássico) (CHRISTENSEN *et al.*, 2010).

A forma de combinar as informações da amostra e da *priori* é por meio do teorema de Bayes, que permite obter uma distribuição *a posteriori*. Um problema que surge, agora na abordagem bayesiana, é que a distribuição *a posteriori* às vezes não consegue ser derivada analiticamente na maioria dos modelos com mais de um parâmetro (ZHANG *et al.*, 1998; TORMAN & CAMEY, 2015). Nestes casos, a distribuição *a posteriori* pode ser aproximada numericamente através dos métodos *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC). Os métodos de simulação por MCMC permitem simular distribuições de probabilidade mesmo sem ter a função densidade (GILKS *et al.*, 1998). Por meio de algoritmos, geram-se valores que, após certo número de iterações, podem ser considerados como provenientes da distribuição de interesse. Assim, estimam-se as medidas de interesse: média, mediana, variância e até a densidade. Nesta abordagem estima-se o intervalo de credibilidade ao invés do tradicional intervalo de confiança. Este intervalo é calculado através do intervalo de caudas iguais onde temos a mesma probabilidade nas duas caudas da distribuição *a posteriori*, usualmente o percentil 2,5 e 97,5 para intervalos de 95% de credibilidade (GELMAN, 2004).

Existem softwares disponíveis para facilitar a aplicação do MCMC, onde apenas é necessário informar o modelo a ser ajustado, as *prioris* e os dados observados. Exemplos são o OpenBUGS (disponível em: www.openbugs.net) e o JAGS (disponível em: www.mcmc-jags.sourceforge.net). No caso do modelo log-binomial, Chu *et al.* (2010) disponibilizaram um código em OpenBUGS usando como distribuições *a priori* para os coeficientes da regressão a distribuição normal com média zero e variância 10^6 (para deixá-las com pouca informação) (CHU & COLE, 2010).

3. ARTIGO 1

ARTIGO SUBMETIDO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA “VETERINARY PARASITOLOGY”

A formatação do artigo segue as normas da revista “VETERINARY PARASITOLOGY”

CAN HIERARCHICAL MODELING IMPROVE OUR UNDERSTANDING OF BOVINE ABORTION DUE TO *Neospora caninum* INFECTION?

Brayan Alexander Fonseca Martinez^a, Vanessa Bielefeldt Leotti Torman^b, Mauro Riegert Borba^a, Gustavo de Sousa e Silva^a, Luís Gustavo Corbellini^{a*}

^a Laboratory of Veterinary Epidemiology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Department of Statistics, Institute of Mathematics and Statistics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

The purpose of this study was to use mixed logistic regression to evaluate the association between *Neospora caninum* serostatus and abortion, accounting for the effects of farms. The main subject is describing the interpretation of this model and discusses the contribution of this analysis to our understanding of the disease's epidemiology. A mixed-effects logistic model using farms as a random effect and the serostatus for *N. caninum*, age of cattle and farm location as fixed effects was performed. The data from 1256 cows over 15 months of age from 60 farms were used, and the abortion information was obtained from farm records. A significant association between *N. caninum* serostatus and abortion was found ($p < 0.0001$). Seropositive cows had 6.63 times greater odds of having a history of previous abortion (95% CI: 4.35-13.37). There was remarkable variability across farms in the probability of a cow having a history of an abortion. Including the effects of the farms in the regression, it was possible to estimate an intraclass correlation coefficient (ICC) of 16%. That means that 16% of the variation in abortion occurrence that was not explained by the fixed effects was due to farms. In practical terms, this variation means that while there are farms with several seropositive cows and no/few abortion cases, the opposite is also true, with a high number of abortions in farms with low/medium seroprevalence. The remaining variability (84%) was not explained by the effect of *N. caninum*, age, region, and the effect of farms, i.e., it is due to unknown factors that are causing abortions. The results of this study reinforce the importance of *N. caninum* as a cause of abortions and demonstrate the significant heterogeneity in the probability of a cow having a history of an abortion that cannot be explained completely by *N. caninum* serostatus, age or location. Including the hierarchical structure of the population along with correct interpretation of the model estimates helps us understand the effect of the farms, i.e., the probability of a cow abortion conditional to the farms, which also contributes to our understanding of the epidemiology of abortions caused by neosporosis. The use of hierarchical models and reporting the ICC should be encouraged.

Keywords: Mixed models; hierarchical data; bovine abortion; *Neospora caninum*; dairy cattle, epidemiology.

INTRODUCTION

Neospora caninum is recognized around the world as an important cause of abortions in cattle. The consequences of *N. caninum* infection for the livestock industry have been motivating researchers to learn more about the epidemiology of neosporosis in order to set control measures. The association between bovine abortion and *N. caninum* infection has been demonstrated; studies have reported *N. caninum*-specific abortion risk or odds ratios varying from 1.7 to 18.6 (Reichel et al., 2013). The pattern of abortion occurrence in farms caused by *N. caninum* infection can be sporadic, endemic or epidemic (Dubey et al., 2007). There are reports describing that after years of episodes of epidemic abortion, the affected herd might experience endemic abortions (Bjorkman et al., 2003). These patterns of *N. caninum* associated with abortion in herds could be related to the two routes of *N. caninum* transmission, i.e., vertical or horizontal (Trees and Williams, 2005). Vertical transmission occurs when tachyzoites from an infected cow cross the placenta and enter the fetal circulation, while horizontal transmission can occur as a result of drinking water or food contaminated with sporulated oocysts shed by infected dogs (De Marez et al., 1999; Gondim et al., 2004). Dogs are the definitive hosts and are infected after ingestion of infected tissues with tachyzoites, thus playing an important role in the horizontal transmission to cattle (McAllister et al., 2000).

Several studies have demonstrated a strong association between abortion and *N. caninum* infection (Anderson et al., 1995; Schares et al., 1999; Weston et al., 2005; Wouda et al., 1998). However, of the 25 articles utilized in an extensive review to identify the strength of this relationship (Dubey et al., 2007), we found only 2 articles that adjusted for clustering (Jensen et al., 1999; Waldner, 2005). In addition, in a separate review of 99 articles (Reichel et al., 2013), only two studies adjusted for clustering (Brickell et al., 2010; Waldner, 2005). Although these studies did consider that cattle are clustered into farms, typically in a hierarchical structure, the potential variations of the predicted probability of abortion due to *N. caninum* were either not interpreted or simply unexplored.

The assumption of independence might prove incorrect once farms are sampled and individual animal responses are assessed, and failing to adjust for clustering can result in low estimated variances (McDermott and Schukken, 1994). The use of hierarchical models, also known as mixed models or multilevel models, allows for analyzing clustered or nested data structures. These types of models are primarily used in the following two cases: 1) to take the hierarchical structure of the data into account and to evaluate whether the effects of independent variables are fixed or whether they may vary across higher levels of clustering and 2) to estimate the contribution of the various levels of organization to the total variance of the outcome of interest (Dohoo et al., 2001). In this specific case, the effects of farms on the variability of abortion

occurrence can be assessed, and this information can aid the understanding of the epidemiology of abortion caused by *N. caninum* infection.

The aims of this study were to evaluate the association between *N. caninum* serostatus and abortion while considering the effects of farms using mixed logistic regression. The main subject is describing the interpretation of this model and discusses the contribution of this analysis to our understanding of the disease's epidemiology.

MATERIALS AND METHODS

Source of data

The dataset was obtained from a cross-sectional study of *N. caninum* infection made in 60 dairy herds in Rio Grande do Sul, Southern Brazil (Corbellini et al., 2006). Briefly, the objective of that study was to identify potential herd-level factors associated with the seroprevalence to *N. caninum*. The principal farm's characteristics found were: the mean number of animals of 64.5 (ranging from 20 to 280 females); all females were Holstein raised on pasture over a farm area that varied from 4 to 100 ha.

The study was carried out in two regions of Rio Grande do Sul, located in the northwest and southeastern parts of the state, where 30 farms from each region were randomly selected from a total of 800 and 150, respectively. These farms were chosen by drawing names of the farm owner, which were provided by the dairy cooperatives, from a hat. This calculation was based on 80 % power to distinguish a difference in the mean herd seroprevalence between regions of 4% (Corbellini et al., 2006).

A total of 1,549 animals were collected from 3,872 cows in 60 farms. In each farm 40% of the females older than 6 months were sampled. This strategy allowed 95% confidence to estimate an expected prevalence of 14% with 10% precision (Corbellini et al., 2006). For this study, females aged less than 15 months were removed from the original study's dataset because these animals had a very low probability of having had an abortion; therefore, we ultimately used data from a sample size of 1,256 animals. After picking the animals in the farms, the owner was asked about the history of previous abortions around 3 to 9 months among the sampled cows; we obtained this information from farm's records. Furthermore, records of abortions occurring in the past 30 days in the farms were also obtained. This data were used to estimate the abortion rate per 100 cows/previous month.

The immunofluorescence antibody test (IFAT) was the test conducted to detect antibodies against *N. caninum* in serum samples. Samples were diluted at 1:200 before performing IFAT to detect antibodies. A cut-off titer of 1:200 was used. More detail about farm's characteristics, milk production, study area, and study design can be obtained in Corbellini et al. (2006).

In this study, the outcome (i.e., abortion) occurred in the past, and the explanatory variable (i.e., *N. caninum* infection) was obtained by IFAT test during the cross-sectional study.

Because vertical transmission is a very common mode of *N. caninum* transmission in cattle (Dubey et al., 2007) and an analysis of the same dataset found strong evidence of vertical transmission (Hein et al., 2012), it was assumed that in most of the cases, *N. caninum* infection took place before the abortion occurred.

Statistical procedure

All descriptive statistics were weighted in consideration of the sampling design, in which the animals were chosen after the farms were first selected from a frame list. For this, we used the PROC SURVEYFREQ and PROC SURVEYMEANS in SAS software (version 9.2, Cary, NC, USA).

The most commonly used method to account for the dependence derived from hierarchical data structures entails the inclusion of random effects in the statistical model. In this case, cows within farms represent the first level because the lowest level corresponds to the unit of observation; the second level corresponds to the dairy farms (Stryhn and Christensen, 2014). We used a logistic model given the binary outcome variable (history of previous abortion, yes/no). A representation of the mixed logistic regression performed to account for the above outlined data structure is given by:

$$\text{logit}(P(Y_{ij} = 1 | X_{1ij}, X_{2ij}, X_{3j}, u_j)) = \beta_0 + \beta_1 X_{1ij} + \beta_2 X_{2ij} + \beta_3 X_{3j} + u_j \quad (1)$$

where Y_{ij} is the binary variable indicating a history of a previous abortion of a cow i in farm j ; β_0 is the intercept; β_1 , β_2 and β_3 are the parameters associated with the fixed effects; X_{1ij} is a dummy variable for the *N. caninum* serostatus of the cow i in farm j ; X_{2ij} is the age of the cow i in farm j ; X_{3j} is a dummy variable indicating the region of farm j (southeastern as the reference region); and u is the random intercept with the assumption that $u_j \sim N(0, \sigma_u^2)$, so that σ_u^2 is the variation between farms.

This model was adjusted in PROC GLIMMIX in SAS. Because the sample was taken with a two-stage design, survey weights must be incorporated. The weights for the first stage were equal to 800/30 for farms in the northwest region and 150/30 for those in the southeast region. These weights were then incorporated into the RANDOM statement in PROC GLIMMIX. For the second stage, it has been recommended that the weights be scaled for the observation units (Pfeffermann et al., 1998; Rabe-Hesketh and Skrondal, 2006). Because the same sample fraction (40% of cows) was used in all farms, all scaled weights were equal to 1 for all cows and were incorporated into the MODEL statement in PROC GLIMMIX. The predicted probability conditional to every farm was obtained for each animal in the dataset using the PRED statement in PROC GLIMMIX.

The age of the cows was kept in the model as a confounding variable and to minimize the effect of evaluating exposure to *N. caninum* that had occurred at a different time from the outcome. The number of animals in the farm was also analyzed as a potential confounding variable, and it changed estimates in only 10% of cases and was not significantly associated with the outcome; therefore, it was not included in the model.

The estimated variance of the random effect (σ_u^2) on the logit scale given by the mixed logistic regression was used to calculate the intraclass correlation coefficient (ICC) using the following formula:

$$ICC = \frac{\sigma_u^2}{\sigma_u^2 + \frac{\pi^2}{3}} \quad (2)$$

This expression is obtained by considering that the binary outcome comes from a continuous latent variable, and this one conforms to a model with residuals following the standard logistic distribution (Snijders and Bosker, 2012).

For comparison purposes, fixed-effects logistic regression including the same response variable and predictors was run. We evaluated the models' accuracy in predicting abortion probabilities using ROC analysis (Receiver Operating Characteristic), in which the area under the ROC curve gives us the AUC score. This analysis was carried out with R version 3.1.1, using pROC package (Robin et al., 2011).

RESULTS

Table 1 shows the weighted percentages of *N. caninum* serology (IFAT) and the history of previous abortions in adult cows in the 60 dairy herds. Farm-level and animal-level seroprevalence for *N. caninum* were 91.6% (55/60) and 17.7% (223/1,256), respectively. A history of an abortion in at least one sampled cow was observed in 33% of the farms (20/60). The within-herd percentage of abortion, defined as the number of animals with a history of an abortion over the sampled cows, varied between 1% and 30%. The abortion rate per 100 cows in the previous month ranged from 0 to 7.1 and 0 to 3.8 in the northwest and southeast regions, respectively.

Table 2 shows the results of the logistic mixed model fit. A significant association between *N. caninum* serostatus and abortion was found ($p < 0.0001$). Seropositive cows had 6.63 times greater odds of having a history of previous abortion (95% CI: 4.35 - 13.37). The odds of a cow having a history of a previous abortion were 5.18 times greater in the northwest relative to the southeast region (95% CI: 1.79 - 21.34).

Some of the predicted probabilities of having a history of an abortion estimated by the mixed logistic regression and its variations between farms (random effects) are shown in Table 3. For example, for one seropositive cow 9.4 years of age, located in the northwest and housed in farm #20, the predicted probability of having a history of an abortion was 42.7%. In contrast, the predicted probability of another seropositive cow with the same age and region but housed in farm #12 was 26.0%. The AUC for the mixed logistic regression was 89% (95% CI: 0.84 – 0.93), while for the fixed-effects logistic regression was 81% (95% CI: 0.75 – 0.87), indicating that the first model was more accurate ($p < 0.002$) (Figure 1).

DISCUSSION

Several serological studies have reported *N. caninum*-specific abortion risks or odds ratios varying from 1.7 to 18.6 (Reichel et al., 2013), which are consistent with our findings. In our study, the odds of abortion increase mainly due to *N. caninum* serostatus and location. However, including the effects of the farms in the regression, it was possible to observe the variability in the probability of cows having an abortion history conditional to farms. An intraclass correlation coefficient of 16% was estimated, meaning that 84% of the variability not explained by the effect of *N. caninum*, age, and region was also not due to the effect of farms, but rather, to unknown factors that are causing abortions.

In other words, 16% of the variation in abortion occurrence not explained by the fixed effects is due to farms. In practical terms, this variation means that while there are farms with several seropositive cows and no/few abortion cases in a given region, the opposite is true as well, with a high number of abortions in farms with low/medium seroprevalence. The importance to include the hierarchical structure in the model to evaluate the variation between farms in the effect of *N. caninum* infection on bovine abortion relies on the fact that the predictive value for risk of abortion in seropositive cows might not be true at least in some farms. Pare et al. (1998) and Schares et al. (2004) reported that not all herds with high seroprevalence had suffered *N. caninum*-associated abortions, supporting the hypothesis that other factors may trigger the occurrence of abortion caused by *N. caninum* infection. This contrasts with some studies that have reported that a high *N. caninum* seroprevalence in herds is associated with increased risk or odds of abortion at the farm level (Bartels, et al., 1999; Wouda et al., 1999; Sager et al. 2001). Additionally, the mixed logistic regression performed better than the logistic regression, as observed in the area under the ROC curve (Figure 1).

Another important issue regarding to the analysis of hierarchical data is that it allows evaluate variance components and use them to identify levels in which there are substantial opportunities for interventions to be productive (Dohoo, 2008). Hence, if we want to change the occurrence of abortion due to *N. caninum* in these farms, we need to look at factors that work at the farm-level or factors that vary among farms. This would include factors that appear to increase the risk of abortion in *Neospora*-infected animals such as environmental factors, farm management practices, stressful agents, immunosuppressive effects such as those induced by ingesting moldy maize-silage (Lopez-Gatius et al., 2004; Almeria and Lopez-Gatius, 2013). For example, some authors have noted that management practices have not received much attention in the literature. Practices such as a tap drinking system for cows, a closed herd, the exclusive use of pasture for cows, animal density, the time that a calf stays with its dam and breed type were associated with greater odds of abortion (Gadicke and Monti, 2013). Moreover, multiple infectious etiologies capable of causing abortions in conjunction with *N. caninum* could also be involved (Weston et al., 2012).

In contrast to the ICC we found, Bartels et al. 2006 reported an ICC of 5%; however, this difference might be attributed to the type of *N. caninum*-associated abortion pattern present on the studied farms. The studied population included in Bartels et al. (2006) comprised cows from farms experiencing *N. caninum*-associated abortion epidemics. In this situation, it is reasonable to

assume that the farm effects were weaker because the main cause of abortion was primarily due to *N. caninum* infection. In this sense, in an endemic situation, sometimes we can observe farms with medium/high *N. caninum* prevalence with low cases of abortion because it has multifactorial causes. In contrast, most of the farms included in our study seem to have an endemic abortion pattern, thus resulting in a higher ICC.

The wide range of predicted probabilities of a cow having a history of an abortion observed among farms having the same status of *N. caninum* infection, age and location observed supports the idea that consideration of the hierarchical structure of data, such as cows housed in farms, is important. Doing so avoids violating the assumption of independence involved in traditional statistical models, and the random effects, shared by all animals in a given farm, induce dependence among such observations (Stryhn and Christensen, 2014). The advantages of using mixed models in this type of population, besides obtaining a more accurate variance estimation, is that the effect of the farm on the association between *N. caninum* infection and abortion can be easily observed by obtaining the conditional probabilities. Few studies that explored bovine abortion in dairy cattle and focused on *N. caninum* as a cause of abortion have used mixed models to account for the random effect of farms; additionally, they haven't delved in the understanding of variance estimates (Hobson et al., 2005; Romero et al., 2005). These issues already have been identified in the veterinary literature by some authors who pointed out that, although mixed models are encountered, the herd effects or variance estimates are treated as nuisance parameters or even are unmentioned (Dohoo, 2008; Stryhn and Christensen, 2014). Therefore, the use of this type of analysis should be better explored as well as the presentation of the information inherent in data with a hierarchical structure (Stryhn and Christensen, 2014).

Given that the information of previous abortion in the animals sampled was obtained by farm's records, this may have introduced some information bias arising from missing records. However, in small dairy farms typical of the studied population, the farmers have close contact with animals and they usually know this information, especially because aborted fetuses from 5-7 months of gestation, the main gestational period of bovine abortion caused by neosporosis, are prone to be promptly identified. The other important factor in including the hierarchical structure in the model and presenting the ICC estimate is to provide the means to future researchers to correctly calculate their sample sizes, which must be inflated to avoid underpowered studies.

CONCLUSION

The results of this study reinforce the importance of *N. caninum* as a cause of abortion and demonstrate the high heterogeneity in the probability of a cow having a history of an abortion that cannot be explained completely by *N. caninum* serostatus, age or location. Including the hierarchical structure of the population along with the correct interpretation of the model estimates enhances our understanding of farm effects, i.e., the probability of a cow abortion conditional to the farms, which also contributes to our knowledge of the epidemiology of

abortions caused by neosporosis. The use of hierarchical models and reporting the ICC should be encouraged.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for the financial support provided for one author of this study.

REFERENCES

- Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C., Picanso, J.P., Blanchard, P.C., Breitmeyer, R.E., Layton, A.W., McAllister, M., Daft, B., Kinde, H., 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1206–1210.
- Bartels, C.J., Wouda, W., Schukken, Y.H., 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52, 247–257. doi:10.1016/S0093-691X(99)00126-0
- Bjorkman, C., McAllister, M.M., Frossling, J., Naslund, K., Leung, F., Uggla, A., 2003. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 3–7.
- Brickell, J.S., McGowan, M.M., Wathes, D.C., 2010. Association between *Neospora caninum* seropositivity and perinatal mortality in dairy heifers at first calving. *Vet. Rec.* 167, 82–85. doi:10.1136/vr.c3583
- Corbellini, L.G., Smith, D.R., Pescador, C.A., Schmitz, M., Correa, A., Steffen, D.J., Driemeier, D., 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 74, 130–141. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.11.004
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L., 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29, 1647–1657. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00154-X
- Dohoo, I., Tillard, E., Stryhn, H., Faye, B., 2001. The use of multilevel models to evaluate sources of variation in reproductive performance in dairy cattle in Reunion Island. *Prev. Vet. Med.* 50, 127–144. doi:10.1016/S0167-5877(01)00191-X
- Dohoo, I.R., 2008. Quantitative epidemiology: Progress and challenges. *Prev. Vet. Med.* 86, 260–269. doi:10.1016/j.prevetmed.2008.02.012
- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 323–367. doi:10.1128/CMR.00031-06

- Gadicke, P., Monti, G., 2013. Factors related to the level of occurrence of bovine abortion in Chilean dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 110, 183–189. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.022
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Anderson-Sprecher, R.C., Bjorkman, C., Lock, T.F., Firkins, L.D., Gao, L., Fischer, W.R., 2004. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J. Parasitol.* 90, 1394–1400. doi:10.1645/GE-359R
- Hein, H.E., Machado, G., Miranda, I.C.S., Costa, E.F., Pellegrini, D.C.P., Driemeier, D., Corbellini, L.G., 2012. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesqui. Veterinária Bras.* .
- Hobson, J.C., Duffield, T.F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S.K., Leslie, K.E., McEwen, B., Peregrine, A.S., 2005. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet. Parasitol.* 127, 177–188. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.025
- Jensen, A.M., Bjorkman, C., Kjeldsen, A.M., Wedderkopp, A., Willadsen, C., Uggla, A., Lind, P., 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 40, 151–163.
- Lopez-Gatius, F., Pabon, M., Almeria, S., 2004. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 606–613. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.11.002
- McAllister, M.M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 881–887.
- McDermott, J.J., Schukken, Y.H., 1994. A review of methods used to adjust for cluster effects in explanatory epidemiological studies of animal populations. *Prev. Vet. Med.* 18, 155–173. doi:10.1016/0167-5877(94)90073-6
- Pfeffermann, D., Skinner, C.J., Holmes, D.J., Goldstein, H., Rasbash, J., 1998. Weighting for unequal selection probabilities in multilevel models. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Statistical Methodol.)* 60, 23–40. doi:10.1111/1467-9868.00106
- Rabe-Hesketh, S., Skrondal, A., 2006. Multilevel modelling of complex survey data. *J. R. Stat. Soc. Ser. A Stat. Soc.* 169, 805–827. doi:10.1111/j.1467-985X.2006.00426.x
- Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L.F.P., Ellis, J.T., 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43, 133–42. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.022
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C., Müller, M., 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12, 1–8. doi:10.1186/1471-2105-12-77

- Romero, J.J., Breda, S. Van, Vargas, B., Dolz, G., Frankena, K., 2005. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology* 64, 1928–1939. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.03.023
- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, a, Boerlin, P., Audige, L., Gottstein, B., 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.* 102, 1–15. doi:10.1016/S0304-4017(01)00524-6
- Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J.P., de Graaf, D.C., Edelhofer, R., Mertens, C., Hess, G., Conraths, F.J., 1999. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J. Parasitol.* 85, 688–694.
- Snijders, T.A.B., Bosker, R.J., 2012. *Multilevel Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Multilevel Modeling*, Second edi. ed. Sage Publishers, London.
- Stryhn, H., Christensen, J., 2014. The analysis-Hierarchical models: Past, present and future. *Prev. Vet. Med.* 113, 304–312. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.10.001
- Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21, 558–561. doi:10.1016/j.pt.2005.09.005
- Waldner, C.L., 2005. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds 90, 219–242. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.03.017
- Weston, J.F., Heuer, C., Parkinson, T.J., Williamson, N.B., 2012. Causes of abortion on New Zealand dairy farms with a history of abortion associated with *Neospora caninum*. *N. Z. Vet. J.* 60, 27–34. doi:10.1080/00480169.2011.631171
- Weston, J.F., Williamson, N.B., Pomroy, W.E., 2005. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *N. Z. Vet. J.* 53, 142–148. doi:10.1080/00480169.2005.36492
- Wouda, W., Moen, A.R., Schukken, Y.H., 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311–1316. doi:10.1016/S0093-691X(98)00078-8

Tabela 1 Results of *N. caninum* serology and history of abortions in animals, over 15 months of age, in 60 dairy farms in Rio Grande do Sul State, Brazil.

<i>N. caninum</i> serology	History of abortion				Total (observed n)
	Yes (observed n)	Weighted row %	No (observed n)	Weighted row %	
Positive	24	15.3	199	84.7	223
Negative	17	2.4	1,016	97.6	1,033
Total	41	4.5	1,215	95.5	1,256

Tabela 2 Results of the mixed logistic regression¹ with random intercepts, using data from 1256 adult cows in 60 dairy farms.

Random effect (farms)			Fixed Effects		
Parameter	Estimate (logit)	ICC (%)	Variable	OR	95% CI ²
Between-farms variance	0.61	16%	<i>N. caninum</i> serostatus	7.63	4.35 - 13.37
			Age	1.17	0.99 - 1.37
			Northwest region	6.18	1.79 - 21.34

¹ Model Fit (Chi-Square/DF value = 0.6).

² CI: Confidence Interval.

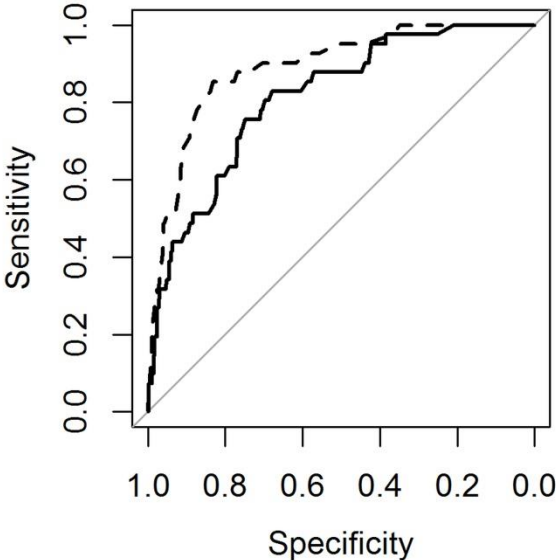
Tabela 3 Some of the predicted probabilities of a cow having a history of a previous abortion estimated for cows with the same status for *Neospora caninum* and age and distinct location in farms using the mixed logistic regression.

Farm-level				Animal-level				
Farm	Region	<i>Neospora</i> Prevalence ¹	% of Abortion ²	Previous Abortion	<i>Neospora</i> Status	Age (Years)	Estimate (u_j)	Predicted Probability
27	1	7.7%	0%	No	Neg	8	0.4	2.3%
30	1	10%	20%	No	Neg	8	0.6	6.7%
49	2	10.5%	0%	No	Neg	11	-0.1	0.8%
22	1	0%	4.5%	No	Neg	11	0.2	7%
45	2	47.4%	0%	No	Pos	3	-0.1	1.7%
11	1	23.8%	23.8%	No	Pos	3	1.3	32.1%
25	1	15.3%	2.8%	Yes	Neg	6.7	-0.2	2.4%
11	1	23.8%	23.8%	Yes	Neg	6.7	1.3	9.9%
31	2	13.5%	10.8%	Yes	Pos	5	1.67	13.1%
47	2	54%	18.2%	Yes	Pos	8	0.9	10.1%
12	1	38.5%	7.7%	Yes	Pos	9.4	0.02	26%
20	1	33.3%	16.7%	Yes	Pos	9.4	0.7	42.7%

¹ Number of seropositive cows from the total number of cows sampled.

² Cows with an abortion out of the total number sampled.

Figura 1 ROC curve to compare two models. The dashed line represents the predicted probabilities from the mixed model whilst continuous line represents the fixed-effects logistic model.



4. ARTIGO 2

ARTIGO A SER SUBMETIDO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA “PREVENTIVE
VETERINARY MEDICINE”

A formatação do artigo segue as normas da revista “PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE”

ODDS RATIO OR PREVALENCE RATIO? A REVIEW OF REPORTED STATISTICAL METHODS AND APPROPRIATENESS OF INTERPRETATIONS IN CROSS-SECTIONAL STUDIES WITH DICHOTOMOUS OUTCOMES IN VETERINARY MEDICINE

Brayan Alexander Fonseca Martinez^{a*}, Vanessa Bielefeldt Leotti Torman^b, Luciana Neves Nunes^b
Gustavo de Sousa e Silva^a, Gustavo Machado^a, Luís Gustavo Corbellini^{a*}

^a Laboratory of Veterinary Epidemiology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Department of Statistics, Institute of Mathematics and Statistics and Post-Graduate Program of Epidemiology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

From all the observational designs currently used in the veterinary epidemiology one of the most employed is the cross-sectional study and binary outcomes are commonly found in these studies. To measure its association with the exposure the use of prevalence ratio (PR) or odds ratio (OR) is possible. However, the latter have been pointed as difficult to interpret and hence the use of PR is preferable. Therefore, the aims of this study were (1) to review articles with cross-sectional design in order to assess the used statistical method and the appropriateness of interpretation of the estimated measure of association, and (2) to illustrate the use of statistical methods that estimate PR directly. A systematic literature review including a diverse set of peer-reviewed journals among the veterinary science field was conducted. A total of 62 articles were reviewed and information about the prevalence of the disease, interpretation given to the measure of association and statistical method employed was recorded. The review showed that independently of the level of prevalence reported in the article, 96% of them employed logistic regression, thus, estimating OR. Misinterpretation of the OR was observed in 51% of the studies. For the second aim, a dataset obtained from a cross-sectional study about antibodies against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk (BTM) and possible associated factors in dairy herds located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, was used. The Robust Poisson regression resulted in routine use of rectal examination for pregnancy, direct contact over fences among cattle of neighboring farms and farms that did not use artificial insemination as associated factors. The same model was adjusted

by log-binomial regression, logistic regression, Poisson regression and Bayesian approach for log-binomial regression. Logistic regression was the method that most overestimated the PR. The findings of this study indicate that, although there are methods that directly estimate PR, many studies in veterinary science literature do not make use of these and misinterpreted the OR estimated by the logistic regression. This may lead to errors in estimating the relationship between a disease and exposure, what could cause imprecisions in medical decision making and even adverse public policy implications.

Key words: Odds ratio, prevalence ratio, veterinary epidemiology, Log-binomial model, binary outcome, Bayesian model, cross-sectional study

INTRODUCTION

Cross-sectional studies are one of the most frequently designed observational studies in veterinary epidemiology (Dohoo et al., 2010), perhaps for reasons such as quickness, inexpensiveness and moderate difficulty. This type of design has been widely used in veterinary medicine to address a variety of research inquiries. Establish a cause-effect relationship between the exposure and the outcome is not possible in these studies given that both are measured simultaneously hence, to speak of risk is inadequate (Carlson and Morrison, 2009; Levin, 2006). In this design, where binary outcomes (e.g. disease/not disease, positive/negative) are frequent, the odds ratio (OR) or prevalence ratio (PR) can be used as measure of association. However, some authors suggest the use of PR because its interpretation is easier than the interpretation of OR (Grimes and Schulz, 2008; Zocchetti et al., 1997).

Phrases including words such as “risk”, “more likely”, “likely” or “probability” are commonly found in the literature to interpret OR. These phrases are a risk-language, not odds-language and it is important not to use them when the odds is the measure of disease frequency (O’Connor, 2013). In human epidemiology much has been discussed about the use of OR just for case-control studies and some authors encourage the use of PR for cross-sectional design because the precise interpretation of OR is difficult and often mistakenly interpreted as PR (Barros and Hirakata, 2003; Deeks, 1998; Thompson et al., 1998; Zocchetti et al., 1997). Despite being mathematically identical to relative risk (RR), PR can only be used in cross sectional studies and not in clinical trials or cohorts since the former measure prevalence instead of risk (Holcomb et al., 2001). It is noteworthy that leading journals in human health field like New England Journal of Medicine and the American Journal of Epidemiology have officially discouraged the use of OR for any study in which other measure of association is ascertainable (Spiegelman and Hertzmark, 2005).

The OR can be interpreted as PR for rare outcomes, even some authors indicate that OR is a good approximation of PR and can be interpreted as such only when the outcome is rare along the two strata of exposure (Torman and Camey, 2015). When the binary outcome is common, usually with prevalence greater than 10%, PR can be overestimated by OR whether PR is greater

than 1 or underestimated whether PR is less than 1 (Barros and Hirakata, 2003; Behrens et al., 2004; Greenland, 2004; McNutt et al., 2003; Nijem et al., 2005; Thompson et al., 1998). Additionally, it has been reported that interpreting the OR as if it was a PR is inadequate not only in terms of the possible bias, but also because confounding may not be appropriately controlled (Barros and Hirakata, 2003).

One reason for the popularity of OR is that it is directly estimated by the logistic regression, one of the statistical methods widely employed in the epidemiological literature (Barros and Hirakata, 2003; Lee et al., 2009). Nevertheless others alternatives methods to logistic regression that can estimate directly PR have been reported. One option is the log-binomial model, that is a generalized linear model with binomial distribution and logarithmic link function (Barros and Hirakata, 2003; Deddens and Petersen, 2008; McNutt et al., 2003; Wacholder, 1986). Other options proposed are Poisson regression and Poisson regression with robust variance (Barros and Hirakata, 2003; Nijem et al., 2005). Poisson regression can estimate wide confidence intervals and for that reason Robust Poisson regression was proposed (Barros and Hirakata, 2003; Zou, 2004). Both models can eventually estimate probabilities greater than one, which is unrealistic (Nijem et al., 2005). Problems of convergence have been described with log-binomial regression, especially when there are continuous independent variables and in this case Poisson regression with robust variance should be used (Blizzard and Hosmer, 2006; Spiegelman and Hertzmark, 2005; Yelland et al., 2011). The Bayesian approach for the log-binomial model has been proposed as an alternative when the frequentist log-binomial model presents convergence problems (Chu and Cole, 2010). Additionally, the Bayesian approach has been described as an interesting alternative when the data is correlated (i.e., has an hierarchical structure), which is common in veterinary medicine, and also when the outcome is polytomous (Torman and Camey, 2015).

Although the issues exposed above have been widely discussed and identified in the literature, primary in human epidemiology, it is interesting to know if many observational studies in veterinary medicine are still using logistic regression and its OR estimation to interpret PR even when there are statistical packages models that estimates PR directly. To our knowledge, few authors in veterinary science have explored and exemplified the issue about the interpretation of OR in randomized trials and cohort studies (Beaudeau and Fourichon, 1998; O'Connor, 2013; Ospina et al., 2012).

The aims of this study were: 1) review articles that uses cross-sectional studies among a range of peer-reviewed journals in veterinary science to assess both the statistical method employed and the appropriateness of the interpretation of the measure of association; 2) illustrates the use of statistical methods that directly estimate PR (log-binomial, Poisson, Poisson regression with robust variance and Bayesian approach for the log-binomial regression) using the results of a cross-sectional study carried out in our laboratory.

MATERIALS AND METHODS

SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW

A systematic literature review was conducted using PubMed as the search engine and included articles that used cross-sectional design from January 1st, 2013 to July 1st, 2016. This review deemed a diverse set of peer-reviewed journals among the veterinary science field presented on the SCImago Journal Rank (SJR). Ten journals were selected when their scope considers aspects such as methods and approaches in veterinary epidemiology, veterinary public health, prevention and management of infectious animal diseases (Table 1).

The search strategy identified only articles published in English language literature. Search syntax was designed considering Boolean operators, name of the journal, keywords and year of publication for selecting items of specific interest. It was decided a priori to exclude letters to editor, comments and review papers. When we seek articles only by the abstract and keywords (described in the syntax for "Word Text"), the research is limited because of a specific issue could not be written in the abstract and keywords. For that reason, "MeSH terms" was also used as it has the functionality of selecting articles sorted by terms; it is a set of terms naming descriptors in a hierarchical structure that enables the search at various levels of specificity. The syntax used can be found in the appendix 1.

From each article yielded by the search strategy, information about the prevalence of the disease, measure of association and statistical method employed was recorded. Two authors (B.A.F.M and G.S.S) independently assessed the appropriateness of the methods according to the following criteria: 1) the interpretation of the measure of association estimated by the statistical method employed and 2) the statistical method used according with the prevalence level. The interpretation of OR and PR was assumed as inappropriate when it was interpreted as a risk or probability of the event while it was assumed as appropriate when it was interpreted as the ratio between odds for OR or prevalence for PR. The cut off for prevalence values was set in 10%; in the situation where the prevalence is greater than 10%, the OR estimated in logistic regression can overestimate the PR, as explained before. Therefore, other models are considered more appropriated than logistic regression. On the other hand, when the prevalence is less than 10% the OR can be interpreted as PR. The full length articles were reviewed in detail if the information needed was not enough or clear in the abstracts.

Following the review, disagreements between the reviewers about the interpretations were solved through an evaluation of a biostatistician (V.B.L.T.) and a veterinarian epidemiologist (L.G.C.). Inter-observer agreement between the reviewers about the number of articles with inconsistent interpretations of the measure of association estimated was quantified using the *kappa* statistic. It was calculated using an Excel spreadsheet (Aviva and Watson, 2006).

ILLUSTRATION OF MODELS THAT DIRECTLY ESTIMATE PREVALENCE RATIO IN A CROSS-SECTIONAL STUDY

Description of the dataset used

The dataset used to exemplify methods that directly estimate PR comes from a cross-sectional study performed to estimate the herd prevalence of antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in bulk tank milk (BTM) in southern Brazil. Samples were randomly selected from a population of 81,307 dairy herds in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, wherein 388 herds were collected. More details about the sample design and bulk tank milk collection can be found elsewhere (Machado et al., 2015). A questionnaire was designed to gather information about the potential factors associated with BVDV transmission and/or its maintenance within a herd. It was applied during visits to the 388 selected herds in November 2013.

Univariable analysis

A univariable analysis was initially used to explore the association between positivity in BTM samples and 36 independent variables using Poisson regression with robust variance. A crude PR was applied to assess the impact of individual factors on the outcome. All variables with $p \leq 0.20$ were selected for inclusion in the multivariate analysis. Variance inflation factors (VIF) were estimated to check for potential collinearity, in which a value greater than 2.50 was considered high; when a high VIF was found, the variable with the lower p -value were considered for the multivariable model.

Multivariable analysis

A robust Poisson multivariable model was built. Firstly, we assessed all the combinations of predictors identified in the univariable analysis by adding variables recursively and selecting the best model according to Akaike Information Criterion (AIC). The final model was adjusted using backwards elimination to remove non-significant ($P > 0.05$) variables from the combination that presented the best fit according with the AIC. Confounding effects were investigated by checking changes in the point estimates of the variables that remained in the model. Changes in parameter estimate greater than 25% were considered to be a confounder and were retained in the model; finally, two-way interaction terms between variables with biological plausibility were investigated. We used deviance performance for goodness of fit assessment of the overall model.

The variables identified as significantly associated with BVDV ($p < 0.05$) in the main multivariable model were also used in four other models: log-binomial regression, logistic regression, Poisson regression, and Bayesian approach for log-binomial regression.

Denoting Y_i as the dichotomous outcome indicating the BVDV serostatus of the i -th farm (1 for positive samples and 0 otherwise), and assuming that this outcome follows a Binomial distribution, the model formulation to log-binomial regression is written as follows:

$$\ln(\pi_i) = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} \dots + \beta_k X_{ki} \quad (1)$$

where π_i is the probability for the i -th farm being seropositive for BVDV, conditional on the independent variables X_1, \dots, X_k , β_0 is the intercept, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ are the coefficients for each independent variable. The model using Poisson regression is formulated as follow:

$$\ln(\lambda_i) = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} \dots + \beta_k X_{ki} \quad (2)$$

where λ_i is the mean for the i -th farm (in this case, the mean approximates the probability of being seropositive for BVDV) conditional on the independent variables X_1, \dots, X_k , β_0 is the intercept, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ are the coefficients for each independent variable. And finally, the logistic regression is written as:

$$\ln\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} \dots + \beta_k X_{ki} \quad (3)$$

where π_i is the probability for the i -th farm being seropositive for BVDV, conditional on the independent variables X_1, \dots, X_k , β_0 is the intercept, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ are the coefficients for each independent variable.

All models were fitted to this dataset using SAS version 9.3 (SAS Institute, Cary NC) with PROC GENMOD, except Bayesian approach for the log-binomial regression. The link function for logistic regression is *logit* and for Poisson regression and log-binomial regression is *log*. To specify the use of the robust variance estimator for the Robust Poisson regression, the REPEATED statement was used (Spiegelman and Hertzmark, 2005). Both logistic and log-binomial regressions have the same binomial distribution for the outcome while Poisson regression assumes Poisson distribution for the outcome. Predicted probabilities were obtained for each farm in the dataset using the PRED statement in order to check probabilities greater than one for the Poisson regression methods. The exponential of each regression coefficient and its confidence intervals were used as point and interval estimates for OR and PR.

The Bayesian approach for the log-binomial model, with posterior distributions estimated by employing Markov Chain Monte Carlo (MCMC), was performed using OpenBugs 3.2.2 (Thomas et al., 2006) together with the R 3.1.1 (R Core Team, 2014) and *BRugs* package (Thomas et al., 2006). The *CODA* package (Martyn et al., 2006) was used for summarizing and plotting the output from Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations. The prior distributions assigned to the model coefficients were normal with zero mean and variance 10^6 with the addition of a restriction to prevent simulation of probabilities outside the interval [0,1] (Chu and Cole, 2010). To choose the numbers of interactions, burn-in period and thin for MCMC, graphical analysis and Gelman and Rubin statistic were used (Gelman and Rubin, 1992). The model was run with 50,000 iterations with the first 5,000 discarded as burn-in using three sample chains. The mode and the equal tails credible interval were used as Bayesian point and interval estimators, respectively.

For all methods, point estimates and 95% confidence/credible interval estimates were shown. For comparisons purposes between methods, the ranges of the confidence/credible intervals and the relative changes in point estimates were calculated ($\Delta\%$). For the point estimates, log-binomial regression was used as reference and the relative change with the other methods employed was calculated as follow:

$$\Delta\% = 100 \times \frac{(\text{point estimate by the method} - \text{Log-binomial point estimate})}{\text{Log-binomial point estimate}} \quad (4)$$

The point estimate in log-binomial regression was chosen as reference value to compare the estimates produced by the other methods since some studies using simulated and observed

data concluded that its estimates are more precise and accurate and therefore it would be the method of choice between the frequentist alternatives (Blizzard and Hosmer, 2006; Carter et al., 2005; McNutt et al., 2003; Yelland et al., 2011).

RESULTS

SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW

The initial search strategy yielded 62 articles (Table 2). Upon review of these abstracts, six articles were excluded for reasons outlined in Figure 1, and therefore 56 studies were used for the overall analysis. Once the biostatistician and the veterinarian epidemiologist resolved differences about interpretation and the statistical method used in the studies, the review showed that 83.9% of the studies (47/56) reported prevalence values greater than 10% in the level of the outcome modeled (i.e. animal or herd level), 16.1% (9/56) had prevalence smaller than 10%. Irrespective of the prevalence reported in the articles, logistic regression was described as the method for modeling the binary outcome in 96.4% (54/56) of them and only two described other method, specifically robust Poisson regression (Figure 1).

Regarding the interpretation of the measure of association, from the 47 articles with prevalence greater than 10%, 23 of them made an appropriate interpretation of OR as a ratio of *odds* or simply not did a direct interpretation of OR, whilst 23 articles interpreted OR inappropriately, as risk or probability. One article, despite reporting the PR estimated by robust Poisson regression, presented an inappropriate interpretation of PR as risk. Among the 9 articles with prevalence smaller than 10%, only 3 correctly interpreted OR as a ratio of *odds*. Inappropriateness was found in the 6 articles, since 5 interpreted OR as risk or probability and one, despite of having estimated the PR, it was interpreted inappropriately.

The two authors who reviewed the studies agreed on the appropriateness of the interpretation of OR as ratio of odds in 18 studies and agreed in 26 studies that did an inappropriate interpretation of the measure estimate by the method used. The inter-observed agreement, as measured by the kappa statistics, was 0.6 showing a moderate agreement (Aviva and Watson, 2006).

RESULTS FROM THE DATA SET USED AS EXAMPLE

The estimated prevalence of BVDV in the dataset used was 24% (CI 95%: 19.8 - 28.1). The final multiple robust Poisson regression identified three variables significantly associated with BVDV seropositivity ($p < 0.05$, Table 3). Results of the analyses using logistic, log-binomial, Poisson and Bayesian log-binomial methods are also shown in Table 3. Regarding the relative changes observed between the methods used against the log-binomial regression, it can be observed that the point estimates in the logistic regression presented the largest differences ranging from 25.7% to 69.9% whereas Poisson and Poisson regression with robust variance, which yielded the same point estimate as expected, had a difference ranging from 1.4% to 16.2%. The Bayesian approach for log-binomial regression had the lowest difference ranging from 3.5% to 6.8%. For all the

methods, logistic regression had the wider intervals ranging from 2.19 to 4.97 (Table 3). As expected, range of the intervals of the robust Poisson regression was less than those calculated by the Poisson regression. Except by the variable “Use of Artificial Insemination”, the log-binomial regression had the narrowest intervals from all the methods. In terms of statistical decision no differences were found because the confidence intervals does not include the value 1, that is, all variables have a significant association with BVDV.

Discussion

From the review performed in this study, only 3.5% (2/56) of the articles used some statistical method to directly estimate the measure of association indicated in cross-sectional studies, i.e., the PR, and all of them misinterpreted this measure of association. Meanwhile, the remaining 96.5% of the articles reported logistic regression to estimate the measure of association between the exposure and the binary outcome. This proportion contrast with a similar search carried out online in 2003 that included highly reputable international journals of human epidemiology, in which logistic regression was used in 37 (34%) of the 110 cross-sectional studies (Barros and Hirakata, 2003). This vast majority of studies using logistic regression could lead to problems. The first is related with the interpretation given to OR and the second with the overestimation/underestimation of the measure of association.

Actually, it is not inherently incorrect to report the OR in cross-sectional studies (Wilber and Fu, 2010) and its use does not incur in any problem if the authors interpret OR as the ratio between *odds*, but nearly half of the papers ($n=28$) reviewed interpreted OR using sentences as “Animals located on the farm A, have two times higher *probability* or *risk* of illness than other-farm animals”. Sentences like the latter are incorrect in cross sectional studies for two reasons: the *odds* is not a ratio of *probabilities* or *risks* and the cross sectional design cannot evaluate risks, since the outcome and exposure are measured simultaneously. Maybe, the concepts of risk or likelihood are easier to understand than odds and probably for that reason it is common that the terms OR and RR/PR are treated interchangeable. Thus, there is no guarantee that readers interpret OR in the right way. This complexity with the interpretation of OR was also evidenced by the moderate agreement between two authors about appropriateness of the interpretation given to OR. We attribute these differences to the use of confusing phrases like “more likely” to describe the OR. In fact, some authors pointed OR as difficult to understand and unintuitive (Grimes and Schulz, 2008; Lee, 1994; Sackett et al., 1996; Schmidt and Kohlmann, 2008).

For example, a reasonable interpretation of PR obtained for the variable “Direct contact over the fences” provided by log-binomial regression in our example would be “Farms in which bovines have contact over fences with bovines from other farms had prevalence for BVDV 0.62 times greater than farms in which bovines have no contact over fences with animals from other farms”. On the other hand, a good interpretation of the OR estimated by logistic regression for the same variable would be “Farms in which bovines have contact over fences with bovines from other farms had 1.04 times greater odds for BVDV than farms in which bovines have no contact over fences with animals from other farms.

To overcome this problem of misinterpretation, it would be necessary and suitable to establish a pattern to prevent readers from making wrong interpretations. In order to create homogeneity in observational studies reported in human health research a guideline to report studies, STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) (Vandenbroucke et al., 2007) was designed. These guides should be used or adapted to report studies in veterinary medicine.

The second problem is related with the overestimation or underestimation of the true association between exposition and outcome, as it could be observed in the example used in this study. In our review, 47 (83.9%) articles reported prevalence greater than 10%, and thus, the OR that were reported could have overestimated or underestimated the PR. On the other hand, in 5 articles wherein OR was estimated it could be approximated to PR since the prevalence was lower than 10% (Schiaffino et al., 2003). Regarding the example used as illustration, the intervals produced by log-binomial regression were the narrowest, except for one variable; a simulation study has pointed that its confidence interval may be narrower than is true (McNutt et al., 2003). As expected, the point estimates produced by the Poisson regression with and without robust variance were the same, and distinct from the log-binomial regression, although some studies reported that robust Poisson and log-binomial regression had similar results (Zou, 2004). It was expected that the confidence intervals obtained in Poisson regression were wider than for log-binomial regression. This situation has been reported when the binary outcome is common (>10%), such as in our example, as a consequence of the fact that Poisson distribution can have larger variance than the binomial distribution (Barros and Hirakata, 2003; Nijem et al., 2005). Moreover, the precision observed in the confidence intervals obtained by Poisson regression with robust variance was greater than Poisson regression due to the use of sandwich estimator for the variances of the regression coefficients (Zou, 2004).

The well-recognized convergence problem using log-binomial regression when explanatory continuous variables are introduced (Barros and Hirakata, 2003; Skov et al., 1998) was not observed here. In order to induce these problems, one continuous variable “total area of the farm dedicated to bovines” was added to the model and convergence was not achieved (data not shown). The Bayesian approach was used to illustrate an alternative in cases where the convergence is a problem for the log-binomial method. The differences observed between Bayesian and frequentist approach for log-binomial regression were little, with relative change in point estimation ranging from 3.51% to 6.8%. Chu and Cole (2010) reported that the inferences obtained by Bayesian and frequentist methods agree when the sample sizes are large and when a weak priori distribution with respect to the information contained in the probability of observed data is used. Therefore, taking into account that prior distributions with minimal information were used, the slight differences observed could be attributed to the sample size and the MCMC simulation. Despite some studies using Poisson with variance robust regression reported probabilities greater than one (Petersen and Deddens, 2008), all the predicted probabilities by this method in the example presented here were bounded between 0 and 1.

The point estimates obtained by the logistic regression showed the greatest differences from all the methods. Schiaffino et al (2003) reported that logistic regression overestimated the true measure of association, especially when the prevalence is greater than 10%, like the one used

here (23.9%). The same study also reported that the confidence intervals provided by logistic regression were the widest in relation to others methods, as observed in our example. Therefore, this result reinforces the idea that logistic regression and its measure of association (OR) is only suitable for case-control studies and could be an approximation to PR only when the prevalence is smaller than 10%.

This study has a number of pertinent strengths and limitations. Initially, to our knowledge, this is the first study that assessed and reinforced the importance of the interpretation given to the measure of association estimated and the suitability of the statistical method used in cross-sectional studies published within the veterinary medicine. Given that the results of studies and their interpretation are used as “raw material” for other processes such as systematic review, meta-analyses and quantitative risk assessment (Sargeant and O’Connor, 2014), it is important to provide reliable estimates and correct interpretation to avoid errors in medical decision making and even adverse public policy implications. One limitation of this study is that the journals selected represent only a portion of existing in a determined time period. Therefore, these findings represent only the selected journals in the time period selected and should not be extended to the whole universe of journals.

CONCLUSION

In order to avoid possible inappropriate estimates and interpretations, it must be reinforced the use of the proper statistical techniques when conducting a cross-sectional study. Furthermore, it is important to standardize the interpretations of the measure of association, given the great confusion observed in the interpretations of OR and PR. The use of prevalence ratio in cross-sectional studies should be encouraged since it is easier to interpret, implying stop using logistic regression when the prevalence is high and instead of it, use log-binomial regression (frequentist or Bayesian approach) or robust Poisson regression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* for the financial support provided for two authors of this study.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

No conflict of interest exists for any of the authors.

REFERENCES

- Angwech, H., Nyeko, J.H.P., Opiyo, E.A., Okello-Onen, J., Opiro, R., Echodu, R., Malinga, G.M., Njahira, M.N., Skilton, R.A., 2015. Heterogeneity in the prevalence and intensity of bovine trypanosomiasis in the districts of Amuru and Nwoya, Northern Uganda. *BMC Vet. Res.* 11, 1–8. doi:10.1186/s12917-015-0567-6
- Asmare, K., Megersa, B., Denbarga, Y., Abebe, G., Taye, A., Bekele, J., Bekele, T., Gelaye, E., Zewdu, E., Agonafir, A., Ayelet, G., Skjerve, E., 2013. A study on seroprevalence of caprine brucellosis under three livestock production systems in southern and central Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 555–560. doi:10.1007/s11250-012-0258-2
- Aviva, P., Watson, P., 2006. *Statistics for Veterinary and Animal Science*, Second. ed. London.
- Barros, A.J.D., Hirakata, V.N., 2003. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med. Res. Methodol.* 3, 21. doi:10.1186/1471-2288-3-21
- Beaudeau, F., Fourichon, C., 1998. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic regression when the disease is not rare. *Prev. Vet. Med.* 36, 243–256. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00095-6
- Behrens, T., Taeger, D., Wellmann, J., Keil, U., 2004. Different methods to calculate effect estimates in cross-sectional studies. A comparison between prevalence odds ratio and prevalence ratio. *Methods Inf. Med.* 43, 505–509. doi:10.1267/METH04050505
- Blizzard, L., Hosmer, D.W., 2006. Parameter estimation and goodness-of-fit in log binomial regression. *Biom. J.* 48, 5–22.
- Borba, M.R., Stevenson, M.A., Goncalves, V.S.P., Neto, J.S.F., Ferreira, F., Amaku, M., Telles, E.O., Santana, S.S., Ferreira, J.C.A., Lobo, J.R., Figueiredo, V.C.F., Dias, R.A., 2013. Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhao State, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 110, 169–176. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.013
- Bruhn, F.R.P., Daher, D.O., Lopes, E., Barbieri, J.M., da Rocha, C.M.B.M., Guimaraes, A.M., 2013. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1093–1098. doi:10.1007/s11250-012-0330-y
- Carlson, M.D.A., Morrison, R.S., 2009. Study Design, Precision, and Validity in Observational Studies. *J. Palliat. Med.* 12, 77–82. doi:10.1089/jpm.2008.9690
- Carter, R.E., Lipsitz, S.R., Tilley, B.C., 2005. Quasi-likelihood estimation for relative risk regression models. *Biostatistics* 6, 39–44. doi:10.1093/biostatistics/kxh016
- Casais, R., Goyena, E., Martinez-Carrasco, C., Ruiz de Ybanez, R., Alonso de Vega, F., Ramis, G., Prieto, J.M., Berriatua, E., 2013. Variable performance of a human derived *Sarcoptes scabiei*

- recombinant antigen ELISA in swine mange diagnosis. *Vet. Parasitol.* 197, 397–403. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.030
- Castillo-Neyra, R., Chou Chu, L., Quispe-Machaca, V., Ancca-Juarez, J., Malaga Chavez, F.S., Bastos Mazuelos, M., Naquira, C., Bern, C., Gilman, R.H., Levy, M.Z., 2015. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev. Vet. Med.* 120, 349–356. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.04.014
- Chaka, H., Goutard, F., Roger, F., Bisschop, S.P.R., Thompson, P.N., 2013. Household-level risk factors for Newcastle disease seropositivity and incidence of Newcastle disease virus exposure in backyard chicken flocks in Eastern Shewa zone, Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 109, 312–320. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.10.003
- Chu, H., Cole, S.R., 2010. Estimation of risk ratios in cohort studies with common outcomes: a Bayesian approach. *Epidemiology* 21, 855–862. doi:10.1097/EDE.0b013e3181f2012b
- Correa-Valencia, N.M., Ramirez, N.F., Olivera, M., Fernandez-Silva, J.A., 2016. Milk yield and lactation stage are associated with positive results to ELISA for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cows from Northern Antioquia, Colombia: a preliminary study. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 1191–1200. doi:10.1007/s11250-016-1074-x
- Davlin, S., Lapid, S.M., Miranda, M.E., Murray, K., 2013. Factors associated with dog rabies vaccination in Bhol, Philippines: results of a cross-sectional cluster survey conducted following the island-wide rabies elimination campaign. *Zoonoses Public Health* 60, 494–503. doi:10.1111/zph.12026
- Deddens, J.A., Petersen, M.R., 2008. Approaches for estimating prevalence ratios. *Occup. Environ. Med.* 65, 481,501–506. doi:10.1136/oem.2007.034777
- Deeks, J., 1998. When can odds ratios mislead? Odds ratios should be used only in case-control studies and logistic regression analyses. *BMJ*.
- Delgado, A.H., Norby, B., Scott, H.M., Dean, W., McIntosh, W.A., Bush, E., 2014. Distribution of cow-calf producers' beliefs about reporting cattle with clinical signs of foot-and-mouth disease to a veterinarian before or during a hypothetical outbreak. *Prev. Vet. Med.* 117, 505–517. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.09.011
- Dias, J.A., Alfieri, A.A., Ferreira-Neto, J.S., Goncalves, V.S.P., Muller, E.E., 2013. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the state of Parana, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 39–47. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01316.x
- Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiology Research*. 2nd edition. Atlantic Veterinary College Prince Edward Island (2010)
- Fablet, C., Simon, G., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Gorin, S., Queguiner, S., Madec, F., Rose, N., 2013. Different herd level factors associated with H1N1 or H1N2 influenza virus infections in fattening pigs. *Prev. Vet. Med.* 112, 257–265. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.006

- Fasina, F.O., Connell, D.R., Talabi, O.A., Lazarus, D.D., Adeleke, G.A., Olusanya, T.P., Hernandez, J.A., 2013. Foot-and-mouth disease virus strains and examination of exposure factors associated with seropositivity of cattle herds in Nigeria during 2007-2009. *Prev. Vet. Med.* 109, 334–342. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.10.004
- Gates, M.C., Woolhouse, M.E.J., Gunn, G.J., Humphry, R.W., 2013. Relative associations of cattle movements, local spread, and biosecurity with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) seropositivity in beef and dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 112, 285–295. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.017
- Gebremedhin, E.Z., Agonafir, A., Tessema, T.S., Tilahun, G., Medhin, G., Vitale, M., Di Marco, V., Cox, E., Vercruyssen, J., Dorny, P., 2013. Seroepidemiological study of ovine toxoplasmosis in East and West Shewa Zones of Oromia Regional State, Central Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 9, 117. doi:10.1186/1746-6148-9-117
- Gebremedhin, E.Z., Kebeta, M.M., Asaye, M., Ashenafi, H., Di Marco, V., Vitale, M., 2015. First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 11, 59. doi:10.1186/s12917-015-0384-y
- Gebremedhin, E.Z., Yunus, H.A., Tesfamariam, G., Tessema, T.S., Dawo, F., Terefe, G., Di Marco, V., Vitale, M., 2014. First report of *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Ethiopia: bioassay and seroepidemiological investigation. *BMC Vet. Res.* 10, 222. doi:10.1186/s12917-014-0222-7
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Stat. Sci.* 7, 457–472.
- Greenland, S., 2004. Model-based estimation of relative risks and other epidemiologic measures in studies of common outcomes and in case-control studies. *Am. J. Epidemiol.* 160, 301–305. doi:10.1093/aje/kwh221
- Grimes, D.A., Schulz, K.F., 2008. Making sense of odds and odds ratios. *Obstet. Gynecol.* 111, 423–426. doi:10.1097/01.AOG.0000297304.32187.5d
- Gunawardana, S., Thilakarathne, D., Abegunawardana, I.S., Abeynayake, P., Robertson, C., Stephen, C., 2014. Risk factors for bovine mastitis in the Central Province of Sri Lanka. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1105–1112. doi:10.1007/s11250-014-0602-9
- Halova, D., Mulcahy, G., Rafter, P., Turcekova, L., Grant, T., de Waal, T., 2013. *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses Public Health* 60, 168–173. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01514.x
- Hering, J., Hille, K., Fromke, C., von Munchhausen, C., Hartmann, M., Schneider, B., Friese, A., Roesler, U., Merle, R., Kreienbrock, L., 2014. Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms--a cross-sectional study. *Prev. Vet. Med.* 116, 129–137. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.06.014

- Hireche, S., Bouaziz, O., Djenna, D., Boussena, S., Aimeur, R., Kabouia, R., Bererhi, E.H., 2014. Seroprevalence and risk factors associated with *Chlamydomydia* spp. infection in ewes in the northeast of Algeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 467–473. doi:10.1007/s11250-013-0515-z
- Holcomb, W.L.J., Chaiworapongsa, T., Luke, D.A., Burgdorf, K.D., 2001. An odd measure of risk: use and misuse of the odds ratio. *Obstet. Gynecol.* 98, 685–688.
- Hussain, M.H., Saqib, M., Raza, F., Muhammad, G., Asi, M.N., Mansoor, M.K., Saleem, M., Jabbar, A., 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. *Vet. Parasitol.* 202, 248–256. doi:10.1016/j.vetpar.2014.01.026
- Jackson, D.S., Nydam, D. V, Altier, C., 2014. Prevalence and risk factors for brucellosis in domestic yak *Bos grunniens* and their herders in a transhumant pastoralist system of Dolpo, Nepal. *Prev. Vet. Med.* 113, 47–58.
- Jiang, Q., Zhou, J., Jiang, Z., Xu, B., 2014. Identifying risk factors of avian infectious diseases at household level in Poyang Lake region, China. *Prev. Vet. Med.* 116, 151–160. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.04.016
- Kardjadj, M., Kouidri, B., Metref, D., Luka, P.D., Ben-Mahdi, M.H., 2015. Seroprevalence, distribution and risk factor for peste des petits ruminants (PPR) in Algeria. *Prev. Vet. Med.* 122, 205–210. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.002
- Kazoora, H.B., Majalija, S., Kiwanuka, N., Kaneene, J.B., 2014. Prevalence of *Mycobacterium bovis* skin positivity and associated risk factors in cattle from western Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1383–1390. doi:10.1007/s11250-014-0650-1
- Kirunda, H., Erima, B., Tumushabe, A., Kiconco, J., Tugume, T., Mulei, S., Mimbe, D., Mworosi, E., Bwogi, J., Luswa, L., Kibuuka, H., Millard, M., Byaruhanga, A., Ducatez, M.F., Krauss, S., Webby, R.J., Webster, R.G., Wurapa, K., Byarugaba, D.K., Wabwire-Mangen, F., 2014. Prevalence of influenza A viruses in livestock and free-living waterfowl in Uganda. *BMC Vet. Res.* 10, 50. doi:10.1186/1746-6148-10-50
- Larska, M., Krzysiak, M.K., Kesik-Maliszewska, J., Rola, J., 2014. Cross-sectional study of Schmallenberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at the end of the vector season of 2013. *BMC Vet. Res.* 10, 967. doi:10.1186/s12917-014-0307-3
- Lee, J., 1994. Odds ratio or relative risk for cross-sectional data? *Int. J. Epidemiol.*
- Lee, J., Tan, C.S., Chia, K.S., n.d. *A Practical Guide for Multivariate Analysis of Dichotomous Outcomes* 714–719.
- Levin, K.A., n.d. Study design III: Cross-sectional studies. *Evid-based Dent* 7, 24–25.

- Lindahl, E., Sattorov, N., Boqvist, S., Sattori, I., Magnusson, U., 2014. Seropositivity and risk factors for *Brucella* in dairy cows in urban and peri-urban small-scale farming in Tajikistan. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 563–569. doi:10.1007/s11250-013-0534-9
- Lolli, C., Marenzoni, M.L., Strona, P., Lappo, P.G., Etiang, P., Diverio, S., 2016. Infections and risk factors for livestock with species of *Anaplasma*, *Babesia* and *Brucella* under semi-nomadic rearing in Karamoja Region, Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 603–611. doi:10.1007/s11250-016-1005-x
- Machado, G., Mendoza, M.R., Corbellini, L.G., 2015. What variables are important in predicting bovine viral diarrhoea virus? A random forest approach. *Vet. Res.* 46, 85. doi:10.1186/s13567-015-0219-7
- Mai, H.M., Irons, P.C., Kabir, J., Thompson, P.N., 2013. Herd-level risk factors for *Campylobacter* fetus infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. *Prev. Vet. Med.* 111, 256–267. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.05.016
- Marks, F.S., Rodenbusch, C.R., Okino, C.H., Hein, H.E., Costa, E.F., Machado, G., Canal, C.W., Brentano, L., Corbellini, L.G., 2014. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 116, 197–202. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.06.001
- Martyn Plummer, Nicky Best, Kate Cowles and Karen Vines., 2006. CODA: Convergence Diagnosis and Output Analysis for MCMC, *R News*, vol 6, 7-11
- Mazeri, S., Scolamacchia, F., Handel, I.G., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvoort, B.M. deC., 2013. Risk factor analysis for antibodies to *Brucella*, *Leptospira* and *C. burnetii* among cattle in the Adamawa Region of Cameroon: a cross-sectional study. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 617–623. doi:10.1007/s11250-012-0268-0
- McNutt, L.-A., Wu, C., Xue, X., Hafner, J.P., 2003. Estimating the relative risk in cohort studies and clinical trials of common outcomes. *Am. J. Epidemiol.* 157, 940–943.
- Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Jansen, J., Menzies, P., 2015a. *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in sheep in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* 122, 129–134. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.07.007
- Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Jansen, J., Menzies, P., 2015b. *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in goats in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* 121, 199–205. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.06.014
- Moore, D.P., Konrad, J.L., San Martino, S., Reichel, M.P., Cano, D.B., Mendez, S., Spath, E.J.L., Odeon, A.C., Crudeli, G., Campero, C.M., 2014. *Neospora caninum* serostatus is affected by age and species variables in cohabiting water buffaloes and beef cattle. *Vet. Parasitol.* 203, 259–263. doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.011

- Musallam, I.I., Abo-Shehada, M., Omar, M., Guitian, J., 2015. Cross-sectional study of brucellosis in Jordan: Prevalence, risk factors and spatial distribution in small ruminants and cattle. *Prev. Vet. Med.* 118, 387–396. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.12.020
- Ndhlovu, D.N., Masika, P.J., 2015. Risk factors associated with clinical dermatophilosis in smallholder sector cattle herds of Zimbabwe at the *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* interface. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 353–360. doi:10.1007/s11250-014-0727-x
- Nijem, K., Kristensen, P., Al-Khatib, A., Bjertness, E., 2005. Application of different statistical methods to estimate relative risk for self-reported health complaints among shoe factory workers exposed to organic solvents and plastic compounds. *Nor. Epidemiol.* 15, 111–116.
- O' Doherty, E., Sayers, R., O' Grady, L., 2013. Temporal trends in bulk milk antibodies to *Salmonella*, *Neospora caninum*, and *Leptospira interrogans* serovar hardjo in Irish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 109, 343–348. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.10.002
- O'Connor, A.M., 2013. Interpretation of odds and risk ratios. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 600–603. doi:10.1111/jvim.12057
- Oseguera Montiel, D., Frankena, K., Udo, H., Keilbach Baer, N.M., van der Zijpp, A., 2013. Prevalence and risk factors for brucellosis in goats in areas of Mexico with and without brucellosis control campaign. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1383–1389. doi:10.1007/s11250-013-0375-6
- Ospina, P. a, Nydam, D. V, DiCiccio, T.J., 2012. Technical note: The risk ratio, an alternative to the odds ratio for estimating the association between multiple risk factors and a dichotomous outcome. *J. Dairy Sci.* 95, 2576–2584. doi:10.3168/jds.2011-4515
- Paul, S., Agger, J.F., Agerholm, J.S., Markussen, B., 2014. Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty. *Prev. Vet. Med.* 113, 504–511. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.01.018
- Pecoraro, H.L., Bennett, S., Huyvaert, K.P., Spindel, M.E., Landolt, G.A., 2014. Epidemiology and ecology of H3N8 canine influenza viruses in US shelter dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 311–318. doi:10.1111/jvim.12301
- Petersen, M.R., Deddens, J.A., 2008. A comparison of two methods for estimating prevalence ratios. *BMC Med. Res. Methodol.* doi:10.1186/1471-2288-8-9
- Pinho, L., Thompson, G., Machado, M., Carvalheira, J., 2013. Management practices associated with the bulk tank milk prevalence of *Mycoplasma* spp. in dairy herds in Northwestern Portugal. *Prev. Vet. Med.* 108, 21–27. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.07.001
- R Core Team., 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

- Rast, L., Lee, S., Nampanya, S., Toribio, J.-A.L.M.L., Khounsy, S., Windsor, P.A., 2013. Prevalence and clinical impact of *Toxocara vitulorum* in cattle and buffalo calves in northern Lao PDR. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 539–546. doi:10.1007/s11250-012-0256-4
- Rooney, A.L., Limon, G., Vides, H., Cortez, A., Guitian, J., 2014. *Sarcocystis* spp. in llamas (*Lama glama*) in Southern Bolivia: a cross sectional study of the prevalence, risk factors and loss in income caused by carcass downgrades. *Prev. Vet. Med.* 116, 296–304. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.11.014
- Rossi, S., Pioz, M., Beard, E., Durand, B., Gibert, P., Gauthier, D., Klein, F., Maillard, D., Saint-Andrieux, C., Saubusse, T., Hars, J., 2014. Bluetongue dynamics in French wildlife: exploring the driving forces. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, e12–24. doi:10.1111/tbed.12061
- Sackett, D.L., Deeks, J.J., Altman, D.G., 1996. Down with odds ratios! *Bmj* 1, 164–166.
- Sanhueza, J.M., Heuer, C., West, D., 2013. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev. Vet. Med.* 112, 90–98. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.009
- Sargeant, J.M., O'Connor, A.M., 2014. Issues of reporting in observational studies in veterinary medicine. *Prev. Vet. Med.* 113, 323–30. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.09.004
- Sarrazin, S., Veldhuis, A., Meroc, E., Vangeel, I., Laureyns, J., Dewulf, J., Caij, A.B., Piepers, S., Hooyberghs, J., Ribbens, S., Van Der Stede, Y., 2013. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 108, 28–37. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.07.005
- Sawford, K., do Karmo, A., da Conceicao, F., Geong, M., Tenaya, I.W.M., Hartawan, D.H.W., Toribio, J.-A.L.M.L., 2015. An investigation of classical swine fever virus seroprevalence and risk factors in pigs in Timor-Leste. *Prev. Vet. Med.* 122, 99–106. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.09.012
- Schiaffino, A., Rodriguez, M., Pasarin, M.I., Regidor, E., Borrell, C., Fernandez, E., 2003. [Odds ratio or prevalence ratio? Their use in cross-sectional studies]. *Gac. Sanit.* 17, 70–74.
- Schmidt, C.O., Kohlmann, T., 2008. When to use the odds ratio or the relative risk? *Int. J. Public Health* 53, 165–167.
- Skov, T., Deddens, J., Petersen, M.R., Endahl, L., 1998. Prevalence proportion ratios: estimation and hypothesis testing. *Int. J. Epidemiol.* 27, 91–95.
- Song, Q., Zhang, W., Song, W., Liu, Z., Khan, M.K., He, L., Fang, R., Li, P., Zhou, Y., Hu, M., Zhao, J., 2014. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. *Prev. Vet. Med.* 117, 215–221. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.07.006
- Spiegelman, D., Hertzmark, E., 2005. Easy SAS calculations for risk or prevalence ratios and differences. *Am. J. Epidemiol.* doi:10.1093/aje/kwi188

- Talafha, A.Q., Al-Majali, A.M., 2013. Prevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in dairy herds in Jordan. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 479–485. doi:10.1007/s11250-012-0244-8
- Tarazi, Y.H., Abo-Shehada, M.N., 2015. Herd- and individual-level prevalences of and risk factors for *Salmonella* spp. fecal shedding in dairy farms in Al-Dhulail Valley, Jordan. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 1241–1248. doi:10.1007/s11250-015-0854-z
- Teklu, T., Tolosa, T., Tuli, G., Beyene, B., Hailu, B., 2013. Sero-prevalence and risk factors study of brucellosis in small ruminants in Southern Zone of Tigray Region, Northern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1809–1815. doi:10.1007/s11250-013-0439-7
- Thomas, A., O’Hara, B., Ligges, U., Sturtz, S., 2006. Making BUGS open. *R news* 6, 12–17.
- Thompson, M.L., Myers, J.E., Kriebel, D., 1998. Prevalence odds ratio or prevalence ratio in the analysis of cross sectional data: what is to be done? *Occup. Environ. Med.*
- Torman, V.B.L., Camey, S.A., 2015. Bayesian models as a unified approach to estimate relative risk (or prevalence ratio) in binary and polytomous outcomes. *Emerg. Themes Epidemiol.* doi:10.1186/s12982-015-0030-y
- Tornimbene, B., Frossard, J.-P., Chhim, V., Sorn, S., Guitian, J., Drew, T.W., 2015. Emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS) in medium-scale swine farms in southeastern Cambodia. *Prev. Vet. Med.* 118, 93–103. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.08.009
- Trehy, M.R., German, A.J., Silvestrini, P., Serrano, G., Batchelor, D.J., 2014. Hypercobalaminemia is associated with hepatic and neoplastic disease in cats: a cross sectional study. *BMC Vet. Res.* 10, 175. doi:10.1186/s12917-014-0175-x
- Tsegay, K., Potts, A.D., Aklilu, N., Lotter, C., Gummow, B., 2016. Circulating serovars of *Leptospira* in cart horses of central and southern Ethiopia and associated risk factors. *Prev. Vet. Med.* 125, 106–115. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.01.009
- Vandenbroucke, J.P., von Elm, E., Altman, D.G., Gotzsche, P.C., Mulrow, C.D., Pocock, S.J., Poole, C., Schlesselman, J.J., Egger, M., 2007. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Epidemiology* 18, 805–835. doi:10.1097/EDE.0b013e3181577511
- Veldhuis, A.M.B., Carp-van Dijken, S., van Wuijckhuise, L., Witteveen, G., van Schaik, G., 2014. Schmallenberg virus in Dutch dairy herds: potential risk factors for high within-herd seroprevalence and malformations in calves, and its impact on productivity. *Vet. Microbiol.* 168, 281–293. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.021
- Vilibic-Cavlek, T., Vilibic, M., Kolaric, B., Jemersic, L., Kucinar, J., Barbic, L., Bagaric, A., Stevanovic, V., Tabain, I., Sviben, M., Jukic, V., Mlinaric-Galinovic, G., 2016. Seroepidemiology of Hepatitis

- E in Selected Population Groups in Croatia: A Prospective Pilot Study. *Zoonoses Public Health* 63, 494–502. doi:10.1111/zph.12254
- Wacholder, S., 1986. Binomial regression in GLIM: estimating risk ratios and risk differences. *Am. J. Epidemiol.* 123, 174–184.
- Wesonga, F.D., Gachohi, J.M., Kitala, P.M., Gathuma, J.M., Njenga, M.J., 2015. Theileria parva infection seroprevalence and associated risk factors in cattle in Machakos County, Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 93–101. doi:10.1007/s11250-014-0690-6
- Wilber, S.T., Fu, R., 2010. Risk Ratios and Odds Ratios for Common Events in Cross-sectional and Cohort Studies. *Acad. Emerg. Med.* 17, 649–651. doi:10.1111/j.1553-2712.2010.00773.x
- Yelland, L.N., Salter, A.B., Ryan, P., 2011. Relative Risk Estimation in Randomized Controlled Trials: A Comparison of Methods for Independent Observations. *Int. J. Biostat.* 7, 1–31. doi:10.2202/1557-4679.1278
- Yin, M.-Y., Wang, J.-L., Huang, S.-Y., Qin, S.-Y., Zhou, D.-H., Liu, G.-X., Tan, Q.-D., Zhu, X.-Q., 2015. Seroprevalence and risk factors of Toxoplasma gondii in Tibetan Sheep in Gansu province, Northwestern China. *BMC Vet. Res.* 11, 41. doi:10.1186/s12917-015-0358-0
- Yoak, A.J., Reece, J.F., Gehrt, S.D., Hamilton, I.M., 2014. Disease control through fertility control: Secondary benefits of animal birth control in Indian street dogs. *Prev. Vet. Med.* 113, 152–156. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.09.005
- Zare, Y., Shook, G.E., Collins, M.T., Kirkpatrick, B.W., 2013. Evidence of birth seasonality and clustering of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in US dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 112, 276–284. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.016
- Zocchetti, C., Consonni, D., Bertazzi, P.A., 1997. Relationship between prevalence rate ratios and odds ratios in cross-sectional studies. *Int. J. Epidemiol.* 26, 220–223.
- Zou, G., 2004. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *Am. J. Epidemiol.* 159, 702–706.

Tabela 1 Peer-reviewed journals deemed among the veterinary science field presented on the SCImago Journal Rank (SJR).

Journal	SJR*
Veterinary Parasitology	1.213
Journal of Veterinary Internal Medicine	1.257
Veterinary Microbiology	1.381
Preventive Veterinary Medicine	1.265
Transboundary and Emerging Diseases	1.251
American Journal of Veterinary Research	0.888
Zoonoses and Public Health	1.276
Theriogenology	0.842
BMC Veterinary Research	0.952
Tropical Animal Health and Production	0.620

Research conducted on June 30, 2016

* Data for the year 2015

Tabela 2 Studies selected in a strategic literature review including articles published from January 1st, 2013 to July 1st, 2016 in journals in which their scope considers aspects such as methods and approaches in veterinary epidemiology, veterinary public health, prevention and management of infectious animal diseases.

N°	Journal	Year	Study
1	Prev Vet Med.	2013	(Fasina et al., 2013)
2	Prev Vet Med.	2013	(Fablet et al., 2013)
3	Trop Anim Health Prod.	2013	(Teklue et al., 2013)
4	Prev Vet Med.	2013	(Mai et al., 2013)
5	Zoonoses Public Health.	2013	(Davlin et al., 2013)
6	Trop Anim Health Prod.	2013	(Rast et al., 2013)
7	Prev Vet Med.	2013	(Sarrazin et al., 2013)
8	Trop Anim Health Prod.	2013	(Talafha and Al-Majali, 2013)
9	Prev Vet Med.	2013	(Sanhueza et al., 2013)
10	Prev Vet Med.	2013	(Pinho et al., 2013)
11	Vet Parasitol.	2013	(Casais et al., 2013)
12	Prev Vet Med.	2013	(Gates et al., 2013)
13	Prev Vet Med.	2013	(Zare et al., 2013)
14	BMC Vet Res.	2013	(Gebremedhin et al., 2013)
15	Trop Anim Health Prod.	2013	(Oseguera Montiel et al., 2013)
16	Prev Vet Med.	2013	(Borba et al., 2013)
17	Trop Anim Health Prod.	2013	(Bruhn et al., 2013)
18	Prev Vet Med.	2013	(Chaka et al., 2013)
19	Trop Anim Health Prod	2013	(Mazeri et al., 2013)
20	Prev Vet Med.	2013	(O' Doherty et al., 2013)
21	Trop Anim Health Prod.	2013	(Asmare et al., 2013)
22	Zoonoses Public Health.	2013	(Halova et al., 2013)
23	Transbound Emerg Dis.	2013	(Dias et al., 2013)
24	Trop Anim Health Prod.	2014	(Kazoora et al., 2014)
25	BMC Vet Res.	2014	(Kirunda et al., 2014)
26	Vet Microbiol.	2014	(Veldhuis et al., 2014)
27	BMC Vet Res.	2014	(Trehy et al., 2014)
28	Prev Vet Med.	2014	(Hering et al., 2014)
29	Vet Parasitol.	2014	(Moore et al., 2014)
30	Vet Parasitol.	2014	(Hussain et al., 2014)
31	Trop Anim Health Prod.	2014	(Hireche et al., 2014)
32	Prev Vet Med.	2014	(Marks et al., 2014)
33	Prev Vet Med.	2014	(Paul et al., 2014)
34	J Vet Intern Med.	2014	(Pecoraro et al., 2014)
35	Trop Anim Health Prod.	2014	(Lindahl et al., 2014)
36	Prev Vet Med.	2014	(Jackson et al., 2014)
37	Prev Vet Med.	2014	(Yoak et al., 2014)

38	BMC Vet Res.	2014	(Larska et al., 2014)
39	Prev Vet Med.	2014	(Delgado et al., 2014)
40	BMC Vet Res.	2014	(Gebremedhin et al., 2014)
41	Prev Vet Med.	2014	(Song et al., 2014)
42	Trop Anim Health Prod.	2014	(Gunawardana et al., 2014)
43	Prev Vet Med.	2014	(Jiang et al., 2014)
44	Prev Vet Med.	2014	(Rooney et al., 2014)
45	Transbound Emerg Dis.	2014	(Rossi et al., 2014)
46	Prev Vet Med.	2015	(Meadows et al., 2015a)
47	Prev Vet Med.	2015	(Meadows et al., 2015b)
48	Prev Vet Med.	2015	(Castillo-Neyra et al., 2015)
49	Prev Vet Med.	2015	(Sawford et al., 2015)
50	Prev Vet Med.	2015	(Musallam et al., 2015)
51	Trop Anim Health Prod.	2015	(Tornimbene et al., 2015)
52	Prev Vet Med.	2015	(Ndhlovu and Masika, 2015)
53	BMC Vet Res.	2015	(Yin et al., 2015)
54	BMC Vet Res.	2015	(Gebremedhin et al., 2015)
55	Trop Anim Health Prod.	2015	(Wesonga et al., 2015)
56	BMC Vet Res.	2015	(Angwech et al., 2015)
57	Prev Vet Med.	2015	(Kardjadj et al., 2015)
58	Trop Anim Health Prod.	2015	(Tarazi and Abo-Shehada, 2015)
59	Trop Anim Health Prod.	2016	(Correa-Valencia et al., 2016)
60	Trop Anim Health Prod.	2016	(Lolli et al., 2016)
61	Prev Vet Med.	2016	(Tsegay et al., 2016)
62	Zoonoses Public Health.	2016	(Vilibic-Cavlek et al., 2016)

Tabela 3 Results for the three variables associated to the presence of antibodies against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using different statistical methods.

Variable	Point (CI: 95% ²) and range by method					$\Delta_{\text{igt}}\%$ ³	$\Delta_{\text{poi}}\%$ ⁴	$\Delta_{\text{bln}}\%$ ⁵
	Logistic	Poisson	Robust Poisson	Log-binomial ¹	Bayesian log-binomial (MCMC) ²			
Routine use of rectal examination	4.35 (2.52;7.49) 4.97	2.82 (1.81;4.39) 2.58	2.82 (1.96;4.06) 2.09	2.56 (1.78;3.67) 1.88	2.47 (1.78; 3.72) 1.94	69.91	10.15	-3.51
Direct contact over the fences	2.04 (1.22;3.41) 2.19	1.64 (1.06;2.54) 1.47	1.64 (1.13;2.39) 1.26	1.62 (1.12;2.34) 1.22	1.51 (1.14; 2.41) 1.27	25.93	1.23	-6.80
The use of Artificial Insemination (AI)	3.01 (1.60;5.66) 4.06	2.07 (1.28;3.34) 2.06	2.07 (1.41;3.03) 1.62	1.78 (1.27;2.49) 1.21	1.68 (1.21;2.38) 1.17	69.10	16.30	-5.61

¹ Reference Model.

² Credibility interval: 95%

³ Relative difference in point estimates between Logistic and Reference Model

⁴ Relative difference in point estimates between Poisson, Robust Poisson and Reference Model

⁵ Relative difference in point estimates between Bayesian log-binomial and Reference Model

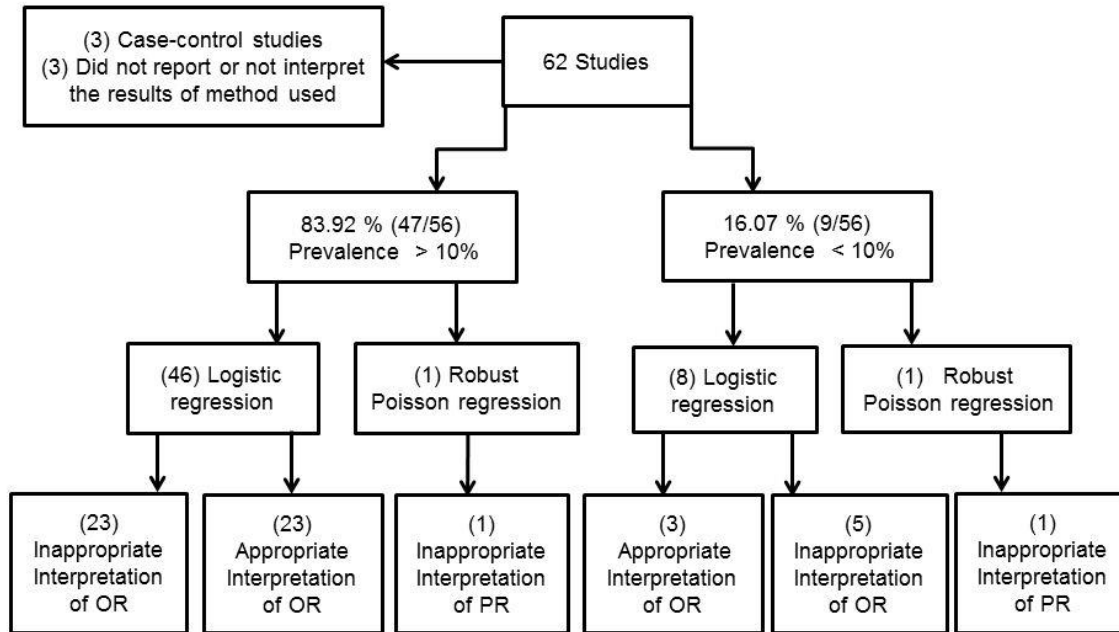


Figura 1 Results strategic review literature. In cross-sectional studies, inappropriate interpretations of OR and PR occur when they are interpreted as risk or probability.

APPENDIX 1

(cross sectional study[Text Word] OR cross sectional study[MeSH Terms] seroprevalence[MeSH Terms] OR seroepidemiologic studies[MeSH Terms] OR seroepidemiologic studies[Text Word] OR seroprevalence[Text Word] OR prevalence study[MeSH Terms] OR prevalence study[Text Word]) AND (odds ratio[MeSH Terms] OR odds ratio[Text Word] OR prevalence ratio[Text Word] prevalence[MeSH Terms] OR prevalence[Text Word] OR PR[Text Word] OR odds [Text Word]) AND (logistic model[MeSH Terms] OR logistic [Text Word] OR logistic regression[MeSH Terms] OR log-binomial [Text Word] OR poisson[Text Word]) AND ("Preventive veterinary medicine"[Journal] OR "BMC veterinary research"[Journal] OR "Tropical animal health and production"[Journal] OR "Theriogenology"[Journal] OR "Transboundary and Emerging Diseases"[Journal] OR "Zoonoses and public health"[Journal] OR "American journal of veterinary research"[Journal] OR "Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine "[Journal] OR "Veterinary microbiology"[Journal] OR "Veterinary Parasitology" [Journal]) NOT (Editorial[ptyp] OR Letter[ptyp] OR Comment[ptyp] OR Review[ptyp])

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve duas partes como objetivos próprios: a primeira teve em conta a estrutura hierárquica das populações nas análises, para contribuir ao entendimento da associação entre aborto bovino e *Neospora caninum* nos sistemas de produção de leite no estado de Rio Grande do Sul; a segunda parte, com base em uma revisão sistemática de estudos transversais publicados em revistas internacionais na veterinária, buscou identificar os métodos estatísticos utilizados e a adequação das interpretações dadas à medida de associação estimada. Adicionalmente se propôs ilustrar o uso de métodos que estimassem diretamente a razão de prevalências considerando-se os dados de um estudo transversal realizado no estado de Rio Grande do Sul. Baseada nos resultados da primeira parte observou-se que as diferenças observadas na probabilidade de uma vaca abortar variam grandemente entre fazendas. Isto sugere que o aborto associado à *Neospora caninum* pode estar sendo influenciado por outros fatores ao nível de fazenda que não estão sendo tidos em consideração. Ter em conta para as análises a estrutura populacional dos animais domésticos é uma interessante ferramenta que ajuda a elucidar possíveis fontes de variação e que pouco tem sido utilizado na medicina veterinária. Uma conclusão baseada na revisão de literatura feita ao respeito, indica que alguns estudos chegam a ter em conta a esta estrutura populacional mas poucos exploram e interpretam em profundidade os resultados destes modelos, daí a importância desta parte do estudo

Já na segunda parte do estudo mostro que apesar de que a razão de chances é uma medida de associação amplamente difundida e utilizada na medicina veterinária, poucos estudos de tipo transversal a interpretam adequadamente, levando a sobrestimar ou subestimar a verdadeira associação entre desfecho e fator para este tipo de estudos. É importante salientar a importância de ter clareza entre a comunidade veterinária em conceitos básicos como chance, probabilidade e risco especialmente no momento de divulgar seus trabalhos. Este trabalho mostra com um exemplo que há uma variedade de métodos estatísticos que podem estimar diretamente a medida de associação dos estudos transversais, por tanto seu uso deve ser fomentado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of Age and Purpose for Testing on the Cut-off Selection of Serological Methods in Bovine Neosporosis. **Veterinary research**, v. 34, n. 3, p. 341–352, 2003.

BARROS, A. J. D.; HIRAKATA, V. N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. **BMC medical research methodology**, v. 3, p. 21, 2003.

BARTELS, C. J. M.; ARNAIZ-SECO, J. I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJORKMAN, C.; FROSSLING, J.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, L. M. Supranational Comparison of Neospora Caninum Seroprevalences in Cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 17–27, abr. 2006.

BARTELS, C. J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk Factors for Neospora Caninum-Associated Abortion Storms in Dairy Herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 247–257, jul. 1999.

BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic regression when the disease is not rare. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, p. 243–256, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00095-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00095-6)>
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587798000956>>.

BEHRENS, T.; TAEGER, D.; WELLMANN, J.; KEIL, U. Different Methods to Calculate Effect Estimates in Cross-Sectional Studies. A Comparison between Prevalence Odds Ratio and Prevalence Ratio. **Methods of information in medicine**, v. 43, n. 5, p. 505–509, 2004.

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; MARTINEAU, R.; VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of Neospora caninum in dairy herds in Québec. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 6, p. 464–467, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1476225/>>.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified Cyst-Forming Sporozoon Causing Encephalomyelitis and Myositis in Dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, v. 70, n. 2, p. 271–274, 1984.

BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. Neospora Species Infection in a Herd of Dairy Cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, n. 9, p. 1441–1444, maio 1996.

BJORKMAN, C.; MCALLISTER, M. M.; FROSSLING, J.; NASLUND, K.; LEUNG, F.; UGGLA, A. Application of the Neospora Caninum IgG Avidity ELISA in Assessment of Chronic Reproductive Losses after an Outbreak of Neosporosis in a Herd of Beef Cattle. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 15, n. 1, p. 3–7, jan. 2003.

BLIZZARD, L.; HOSMER, D. W. Parameter Estimation and Goodness-of-Fit in Log Binomial Regression. **Biometrical journal. Biometrische Zeitschrift**, v. 48, n. 1, p. 5–22, fev. 2006.

CARLSON, M. D. A.; MORRISON, R. S. Study Design, Precision, and Validity in Observational Studies. **Journal of Palliative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 77–82, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2920077/>>.

CHRISTENSEN, R.; JOHNSON, W.; BRANSCUM, A.; HANSON, T. E. **Bayesian ideas and data analysis: an introduction for scientists and statisticians**. [s.l.] Taylor & Francis, 2010.

CHU, H.; COLE, S. R. Estimation of Risk Ratios in Cohort Studies with Common Outcomes: A Bayesian Approach. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 21, n. 6, p. 855–862, nov. 2010.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. Detection of Serum Antibody Responses in Cattle with Natural or Experimental Neospora Infections. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, v. 5, n. 4, p. 572–578, out. 1993.

CORBELLINI, L. .; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. .; GONDIM, L. F. .; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 195–202, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701006008>>. Acesso em: 16 set. 2015.

COUTINHO, L. M. S.; SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R. Métodos para estimar razão de prevalência em estudos de corte transversal Methods for estimating prevalence ratios in cross-sectional studies. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 6, p. 992–998, 2008.

CUMMINGS, P. The Relative Merits of Risk Ratios and Odds Ratios. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 163, n. 5, p. 438–445, maio 2009.

DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; WILLIAMS, D. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. Experimental Studies on the Transmission of Neospora Caninum between Cattle. **Research in veterinary science**, v. 70, n. 2, p. 163–168, abr. 2001.

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Significance of Neospora Caninum in British Dairy Cattle Determined by Estimation of Seroprevalence in Normally Calving Cattle and Aborting Cattle. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1189–1194, ago. 1999a.

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of Vertical and Horizontal Transmission Parameters of Neospora Caninum Infections in Dairy Cattle. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683–1689, out. 1999b.

DEDDENS, J. A.; PETERSEN, M. R. Approaches for Estimating Prevalence Ratios. **Occupational and environmental medicine**, v. 65, n. 7, p. 481,501–506, jul. 2008.

DEEKS, J. When can odds ratios mislead? Odds ratios should be used only in case-control studies and logistic regression analyses. **BMJ (Clinical research ed.)** ENGLAND, out. 1998. .

DIEZ, R. A glossary for multilevel analysis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 56, n. 8, p. 588–594, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1732212/>>.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of Post-Natal Transmission of *Neospora Caninum* in Dutch Dairy Herds. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 2, p. 209–215, fev. 2001a.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs Shed *Neospora Caninum* Oocysts after Ingestion of Naturally Infected Bovine Placenta but Not after Ingestion of Colostrum Spiked with *Neospora Caninum* Tachyzoites. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747–752, jun. 2001b.

DIJKSTRA, T. h; BARKEMA, H. W.; BJORKMAN, C.; WOUDA, W. A High Rate of Seroconversion for *Neospora Caninum* in a Dairy Herd without an Obvious Increased Incidence of Abortions. **Veterinary parasitology**, v. 109, n. 3-4, p. 203–211, nov. 2002.

DOHOO, I. .; TILLARD, E.; STRYHN, H.; FAYE, B. The use of multilevel models to evaluate sources of variation in reproductive performance in dairy cattle in Reunion Island. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 50, n. 1-2, p. 127–144, 2001.

DOHOO, IAN R. MARTIN, WAYNE. STRYHN, H. Veterinary epidemiologic research. 2009.

DUBEY, J. P. Neosporosis in Cattle: Biology and Economic Impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 8, p. 1160–1163, abr. 1999.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **J. Parasitol**, v. 89, p. S42–S56, 2003.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly Recognized Fatal Protozoan Disease of Dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269–1285, maio 1988.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in Animals--the Last Five Years. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90–108, ago. 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews** , v. 20 , n. 2 , p. 323–367, 1 abr. 2007. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/20/2/323.abstract>>.

FRONTEIRA, I. [Observational studies in the era of evidence based medicine: short review on their relevance, taxonomy and designs]. **Acta medica portuguesa**, v. 26, n. 2, p. 161–170, 2013.

FROSSLING, J.; LINDBERG, A.; BJORKMAN, C. Evaluation of an Iscom ELISA Used for Detection of Antibodies to Neospora Caninum in Bulk Milk. **Preventive veterinary medicine**, v. 74, n. 2-3, p. 120–129, maio 2006.

GADICKE, P.; MONTI, G. Factors Related to the Level of Occurrence of Bovine Abortion in Chilean Dairy Herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 110, n. 2, p. 183–189, jun. 2013.

GELMAN, A. **Bayesian data analysis**. [s.l.] Boca Raton: Chapman& Hall CRC, 2004.

GIMENO, S. G.; DE SOUZA, J. M. [The use of stratification and logistic regression model in the data analysis of case-control studies]. **Revista de saude publica**, v. 29, n. 4, p. 283–289, ago. 1995.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved Production of Neospora Caninum Oocysts, Cyclical Oral Transmission between Dogs and Cattle, and in Vitro Isolation from Oocysts. **The Journal of parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159–1163, dez. 2002.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJORKMAN, C.; LOCK, T. F.; FIRKINS, L. D.; GAO, L.; FISCHER, W. R. Transplacental Transmission and Abortion in Cows Administered Neospora Caninum Oocysts. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1394–1400, dez. 2004a.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (Canis Latrans) Are Definitive Hosts of Neospora Caninum. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159–161, fev. 2004b.

GREENLAND, S. Model-Based Estimation of Relative Risks and Other Epidemiologic Measures in Studies of Common Outcomes and in Case-Control Studies. **American journal of epidemiology**, v. 160, n. 4, p. 301–305, ago. 2004.

GRIMES, D. A.; SCHULZ, K. F. Cohort Studies: Marching towards Outcomes. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9303, p. 341–345, jan. 2002a.

GRIMES, D. A.; SCHULZ, K. F. Descriptive studies: what they can and cannot do. **The Lancet**, v. 359, n. 9301, p. 145–149, 12 jan. 2002b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673602073737>>.

GRIMES, D. A.; SCHULZ, K. F. Compared to What? Finding Controls for Case-Control Studies. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9468, p. 1429–1433, abr. 2005.

GRIMES, D. A.; SCHULZ, K. F. Making Sense of Odds and Odds Ratios. **Obstetrics and gynecology**, v. 111, n. 2 Pt 1, p. 423–426, fev. 2008.

HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Neospora Abortions in Dairy Cattle: Diagnosis, Mode of Transmission and Control. **Veterinary parasitology**, v. 128, n. 3-4, p. 231–241, mar. 2005.

HEIN, H. E.; MACHADO, G.; MIRANDA, I. C. S.; COSTA, E. F.; PELLEGRINI, D. C. P.; DRIEMEIER, D.; CORBELLINI, L. G. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de

aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira** scielo , 2012.

HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; LESLIE, K. E.; MCEWEN, B.; PEREGRINE, A. S. Risk Factors Associated with Neospora Caninum Abortion in Ontario Holstein Dairy Herds. **Veterinary parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 177–188, fev. 2005.

HOLCOMB, W. L. J.; CHAIWORAPONGSA, T.; LUKE, D. A.; BURGDORF, K. D. An Odd Measure of Risk: Use and Misuse of the Odds Ratio. **Obstetrics and gynecology**, v. 98, n. 4, p. 685–688, out. 2001.

HOSMER, D. LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. [s.l.] Wiley Interscience Publication, 2000.

JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and Seroepidemiology of Neospora Caninum-Associated Bovine Abortion. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 5, p. 631–636, maio 2002.

KASHIWAZAKI, Y.; GIANNECHINI, R. E.; LUST, M.; GIL, J. Seroepidemiology of Neosporosis in Dairy Cattle in Uruguay. **Veterinary parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 139–144, fev. 2004.

KNOL, M. J.; VANDENBROUCKE, J. P.; SCOTT, P.; EGGER, M. What Do Case-Control Studies Estimate? Survey of Methods and Assumptions in Published Case-Control Research. **American journal of epidemiology**, v. 168, n. 9, p. 1073–1081, nov. 2008.

KOIWAI, M.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; SHIMIZU, S.; TSUTSUI, T.; ETO, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of Neospora Caninum in Dairy and Beef Cattle with Reproductive Disorders in Japan. **Veterinary parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 15–18, jun. 2005.

LEE, J. Odds ratio or relative risk for cross-sectional data?. **International journal of epidemiology**. ENGLAND, fev. 1994. .

LEE, J.; TAN, C. S.; CHIA, K. S. A Practical Guide for Multivariate Analysis of Dichotomous Outcomes. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 38, n. 8, p. 714–719, ago. 2009.

LEVIN, K. A. Study design III: Cross-sectional studies. **Evid-based Dent**, v. 7, n. 1, p. 24–25, [s.d.]Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ebd.6400375>>.

LEVIN, K. A. Study design IV: Cohort studies. **Evid-based Dent**, v. 7, n. 2, p. 51–52, [s.d.]Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ebd.6400407>>.

LIN, D. Y.; WEI, L. J. The Robust Inference for the Cox Proportional Hazards Model. **Journal of the American Statistical Association**, v. 84, n. 408, p. 1074–1078, 1989. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2290085>>.

LOPEZ-GATIUS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J. L.; LOPEZ-BEJAR, M.; NOGAREDA, C.; ALMERIA, S. Relationship between Rainfall and Neospora Caninum-Associated

Abortion in Two Dairy Herds in a Dry Environment. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 52, n. 3, p. 147–152, abr. 2005.

MANN, C. J. Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. **Emergency Medicine Journal**, v. 20, n. 1, p. 54–60, 1 jan. 2003. Disponível em: <<http://emj.bmj.com/content/20/1/54.abstract>>.

MCALLISTER, M. M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D. G. Evidence of Point-Source Exposure to Neospora Caninum and Protective Immunity in a Herd of Beef Cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 6, p. 881–887, set. 2000.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs Are Definitive Hosts of Neospora Caninum. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473–1478, set. 1998.

MCDERMOTT, J. J.; SCHUKKEN, Y. H. A review of methods used to adjust for cluster effects in explanatory epidemiological studies of animal populations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 18, n. 3, p. 155–173, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167587794900736>>. Acesso em: 16 set. 2015.

MCNUTT, L.-A.; WU, C.; XUE, X.; HAFNER, J. P. Estimating the Relative Risk in Cohort Studies and Clinical Trials of Common Outcomes. **American journal of epidemiology**, v. 157, n. 10, p. 940–943, maio 2003.

MOEN, A. R.; WOUDA, W.; MUL, M. F.; GRAAT, E. A. M.; VAN WERVEN, T. Increased risk of abortion following neospora caninum abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1301–1309, maio 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98000776>>.

NIJEM, K.; KRISTENSEN, P.; AL-KHATIB, A.; BJERTNESS, E. Application of different statistical methods to estimate relative risk for self-reported health complaints among shoe factory workers exposed to organic solvents and plastic compounds. **Norsk Epidemiologi**, v. 15, n. 1, p. 111–116, 2005.

O’CONNOR, A. M. Interpretation of Odds and Risk Ratios. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 3, p. 600–603, 2013.

OSPINA, P. a; NYDAM, D. V; DICICCIO, T. J. Technical note: The risk ratio, an alternative to the odds ratio for estimating the association between multiple risk factors and a dichotomous outcome. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 5, p. 2576–2584, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541486>>.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic Study of Neospora Caninum in Dairy Herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 11, p. 1595–1598, dez. 1998.

PARE, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Neospora Caninum Antibodies in Cows during Pregnancy as a Predictor of Congenital Infection and Abortion. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 1, p. 82–87, fev. 1997.

PETERSEN, M. R.; DEDDENS, J. A. A comparison of two methods for estimating prevalence ratios. **BMC Medical Research Methodology**, 2008. .

PFEIFFER, D. U.; WILLIAMSON, N. B.; REICHEL, M. P.; WICHTEL, J. J.; TEAGUE, W. R. A Longitudinal Study of Neospora Caninum Infection on a Dairy Farm in New Zealand. **Preventive veterinary medicine**, v. 54, n. 1, p. 11–24, maio 2002.

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle - the billion dollar question. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133–42, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246675>>.

ROTHMAN, K. J.; GREENLAND, S.; LASH, T. L. **Modern epidemiology**. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

RUMEL, D. “Odds ratio”: algumas considerações. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 253–258, 1986. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101986000300011&nrm=iso>.

SACKETT, D. L.; DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G. Down with odds ratios! **Bmj**, v. 1, n. 6, p. 164–166, 1996.

SALEHI, N.; GOTTSTEIN, B.; HADDADZADEH, H. R. Genetic Diversity of Bovine Neospora Caninum Determined by Microsatellite Markers. **Parasitology international**, v. 64, n. 5, p. 357–361, out. 2015.

SARGEANT, J. M.; O’CONNOR, A. M. Issues of reporting in observational studies in veterinary medicine. **Preventive veterinary medicine**, v. 113, n. 3, p. 323–30, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24139690>>.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEM, P.; RAUSER, M.; SCHRODER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-Avidity-ELISA: Examination of Herds Experiencing Epidemic or Endemic Neospora Caninum-Associated Bovine Abortion. **Veterinary parasitology**, v. 106, n. 4, p. 293–305, jul. 2002.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; KLOSS, D.; SCHRODER, R.; LABOHRM, R.; DRAGER, K.; FASEN, W.; HESS, R. G.; CONRATHS, F. J. Potential Risk Factors for Bovine Neospora Caninum Infection in Germany Are Not under the Control of the Farmers. **Parasitology**, v. 129, n. Pt 3, p. 301–309, set. 2004.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F. J. The Efficiency of Vertical Transmission of Neospora Caninum in Dairy Cattle Analysed by Serological Techniques. **Veterinary parasitology**, v. 80, n. 2, p. 87–98, dez. 1998.

SCHMIDT, C. O.; KOHLMANN, T. When to Use the Odds Ratio or the Relative Risk? **International journal of public health**, v. 53, n. 3, p. 165–167, 2008.

SCHULZ, K. F.; GRIMES, D. A. Case-Control Studies: Research in Reverse. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9304, p. 431–434, fev. 2002.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTINEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine Neospora Caninum Inoculation of Heifers and Cows Using Contaminated Semen with Different Numbers of Tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 729–737, mar. 2007.

SISTROM, C. L.; GARVAN, C. W. Proportions, Odds, and Risk. **Radiology**, v. 230, n. 1, p. 12–19, jan. 2004.

SKOV, T.; DEDDENS, J.; PETERSEN, M. R.; ENDAHL, L. Prevalence Proportion Ratios: Estimation and Hypothesis Testing. **International journal of epidemiology**, v. 27, n. 1, p. 91–95, fev. 1998.

SNIJDERS, T. A. B.; BOSKER, R. J. **Multilevel analysis: an introduction to basic and advanced multilevel modeling**. Second ed. London: Sage Publishers, 2012.

SPIEGELMAN, D.; HERTZMARK, E. **Easy SAS calculations for risk or prevalence ratios and differences**. **American journal of epidemiology** United States, ago. 2005. .

STRYHN, H.; CHRISTENSEN, J. The analysis-Hierarchical models: Past, present and future. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 3, p. 304–312, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.001>>.

THOMPSON, M. L.; MYERS, J. E.; KRIEBEL, D. Prevalence odds ratio or prevalence ratio in the analysis of cross sectional data: what is to be done?. **Occupational and Environmental Medicine**, abr. 1998. .

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. [s.l.] Wiley, 2007.

THURMOND, M. C.; ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C. Secular and Seasonal Trends of Neospora Abortio in California Dairy Cows. **The Journal of parasitology**, v. 81, n. 3, p. 364–367, jun. 1995.

TORMAN, V. B. L.; CAMEY, S. A. Bayesian models as a unified approach to estimate relative risk (or prevalence ratio) in binary and polytomous outcomes. **Emerging Themes in Epidemiology** London, 2015. .

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and Exogenous Transplacental Infection in Neospora Caninum and Toxoplasma Gondii. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558–561, dez. 2005.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJORKMAN, C. Oral Neospora Caninum Inoculation of Neonatal Calves. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1467–1472, set. 1998.

WACHOLDER, S. Binomial Regression in GLIM: Estimating Risk Ratios and Risk Differences. **American journal of epidemiology**, v. 123, n. 1, p. 174–184, jan. 1986.

WACHOLDER, S.; SILVERMAN, D. T.; MCLAUGHLIN, J. K.; MANDEL, J. S. Selection of controls in case-control studies: III. Design options. **American journal of epidemiology**, v. 135, n. 9, p. 1042–1050, 1992.

WALDNER, C. L.; JANZEN, E. D.; RIBBLE, C. S. Determination of the Association between Neospora Caninum Infection and Reproductive Performance in Beef Herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 5, p. 685–690, set. 1998.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; PARKINSON, T. J.; WILLIAMSON, N. B. Causes of Abortion on New Zealand Dairy Farms with a History of Abortion Associated with Neospora Caninum. **New Zealand veterinary journal**, v. 60, n. 1, p. 27–34, jan. 2012.

WOUDA, W.; BARTELS, C. J. M.; MOEN, A. R. Characteristics of neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to1997). **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 233–245, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99001259>>. Acesso em: 16 set. 2015.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J. M. Seroepidemiological Evidence for a Relationship between Neospora Caninum Infections in Dogs and Cattle. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677–1682, out. 1999.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion Risk in Progeny of Cows after a Neospora Caninum Epidemic. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1311–1316, maio 1998.

YELLAND, L. N.; SALTER, A. B.; RYAN, P. Relative Risk Estimation in Randomized Controlled Trials: A Comparison of Methods for Independent Observations. **The International Journal of Biostatistics**, v. 7, n. 1, p. 1–31, 2011.

ZEGER, S. L.; LIANG, K. Y. Longitudinal Data Analysis for Discrete and Continuous Outcomes. **Biometrics**, v. 42, n. 1, p. 121–130, mar. 1986.

ZEGER, S. L.; LIANG, K. Y. An Overview of Methods for the Analysis of Longitudinal Data. **Statistics in medicine**, v. 11, n. 14-15, p. 1825–1839, 1992.

ZHANG, J.; YU, K. F. What's the Relative Risk? A Method of Correcting the Odds Ratio in Cohort Studies of Common Outcomes. **JAMA**, v. 280, n. 19, p. 1690–1691, nov. 1998.

ZOCCHETTI, C.; CONSONNI, D.; BERTAZZI, P. A. Relationship between Prevalence Rate Ratios and Odds Ratios in Cross-Sectional Studies. **International journal of epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 220–223, fev. 1997.

ZOU, G. A Modified Poisson Regression Approach to Prospective Studies with Binary Data. **American journal of epidemiology**, v. 159, n. 7, p. 702–706, abr. 2004.

7. APÊNDICE A. Comandos do modelo misto do artigo 1 no SAS ®

```
proc glimmix data=NC method=quadrature empirical=classical ;
  class fazenda NC (ref = "0") regiao;
  model aborto (descending) = NC idade regiao / dist=binary link=logit ddfm=bw obsweight=sw_1
solution or;
  estimate "NC" NC 1 -1 / exp ;
  lsmeans NC / ilink;
  random intercept / subject=fazenda solution weight=w_2; covtest/wald;
  output out=preditos pred(noblup)=predlin pred(blup ilink)=efeit_aleat;
run;
```

8. APÊNDICE B. Comandos dos quatro modelos usados no artigo 2 no SAS ®

```
/*modelo logístico*/
title 'logístico 3 variáveis';
proc genmod desc;
class Codigodaamostra inseminar(ref="1") /param=ref;
model bvd_1 = inseminar pr contato / dist=bin link=logit;
estimate 'contato' contato 1-1/exp;
estimate 'ia' inseminar 1-1/exp;
estimate 'palpação' pr 1-1/exp;
output out=bvdv_logistico pred=PR1;
run;
```

```
/*modelo final log binomial */
title 'log binomial 3 variáveis';
proc genmod desc;
class Codigodaamostra inseminar(ref="1") /param=ref;
model bvd_1 = inseminar pr contato / dist=binary link=log;
estimate 'palpação' pr 1-1/exp;
estimate 'contato' contato 1-1/exp;
estimate ' ia ' inseminar 1-1/exp;
output out=bvdv_logbin pred=PR1;
run;
```

```
/*modelo final poisson robusta */  
title 'poisson robusta 3 variaveis';  
proc genmod ;  
class Codigodaamostra inseminar(ref="1") /param=ref;  
model bvd_1 = inseminar pr contato/ dist=poisson link=log;  
estimate 'contato' contato 1-1/exp;  
estimate 'ia' inseminar 1-1/exp;  
estimate 'palpacao' pr 1-1/exp;  
output out=bvdv_poisson_rob pred=PR1;  
repeated subject=Codigodaamostra;  
run;
```

```
/*modelo final poisson com ia=1*/  
title 'poisson não robusta 3 variaveis';  
proc genmod desc;  
class Codigodaamostra inseminar(ref="1") /param=ref;  
model bvd_1 = inseminar pr contato/ dist=poisson link=log;  
estimate 'contato' contato 1-1/exp;  
estimate 'ia' inseminar 1-1/exp;  
estimate 'palpacao' pr 1-1/exp;  
output out=bvdv_poisson pred=PR1;  
run;
```

9. APÊNDICE C. Comandos do modelo log-binomial bayesiano do artigo 2 no R.

```
library(BRugs)
library(coda)

model <- read.csv("C:/Users/usuario/Downloads/log_bin1.csv", sep=",")
attach(model)
as.factor(inseminar)
inseminar=relevel(as.factor(inseminar), ref="1")
modelo = function (){
  for(i in 1:n) {
    Y[i] ~ dbern(p[i])
    log(p[i]) <- alpha0 + alpha1 * X1[i] + alpha2 * X2[i] + alpha3 * X3[i]
  }

  #prior

  alpha1 ~dnorm(0,1.0E-6)
  alpha2 ~dnorm(0,1.0E-6)
  alpha3 ~dnorm(0,1.0E-6)
  alpha0 ~dnorm(0,1.0E-6)

  #calculo de OR

  OR1 <- exp(alpha1)
  OR2 <- exp(alpha2)
  OR3 <- exp(alpha3)
}
#identificando parametros

parameters <- c("alpha0", "alpha1", "alpha2", "alpha3", "OR1", "OR2", "OR3")

#dataset para BRugs

dados = list(n = dim(model)[1], Y = model$bvd_1, X1 = model$inseminar, X2 = model$pr, X3 =
model$contato)

#valores iniciais da cadeia, ??? # de cadeis igual ao numero covariaveis

inits <- function(){
  list(alpha0=-10, alpha1=0, alpha2=0, alpha3=0)
```

```

list(alpha0=-20, alpha1=0, alpha2=0, alpha3=0)
list(alpha0=-30, alpha1=0, alpha2=0, alpha3=0)
}

# simulação

simul <- BRugsFit(modelFile = modelo, data= dados, inits, numChains = 1,parameters,nBurnin = 0,
nIter=100, nThin=1, coda = T)

simul <- BRugsFit(modelFile = modelo, data= dados, inits, numChains = 3,parameters,nBurnin =
5000, nIter=30000, nThin=30, coda = T)

##### MODA OR1 #####
kernel1 = density(as.matrix(simul[, 'OR1']), from=min(as.matrix(simul[, 'OR1'])),
to=max(as.matrix(simul[, 'OR1'])))
posmo1 = which.max(kernel1$y)
moda=kernel1$x[posmo1]
moda

##### MODA OR2 #####
kernel1 = density(as.matrix(simul[, 'OR2']), from=min(as.matrix(simul[, 'OR2'])),
to=max(as.matrix(simul[, 'OR2'])))
posmo1 = which.max(kernel1$y)
moda=kernel1$x[posmo1]
moda

##### MODA OR3 #####
kernel1 = density(as.matrix(simul[, 'OR3']), from=min(as.matrix(simul[, 'OR3'])),
to=max(as.matrix(simul[, 'OR3'])))
posmo1 = which.max(kernel1$y)
moda=kernel1$x[posmo1]
moda

##### Diagnostico #####
plot(simul)
gelman.plot(simul)
autocorr.plot(simul)
autocorr.diag(simul)
effectiveSize(simul)
summary(simul)

```