

# Fertőző betegségek diagnosztikájában használt tesztek eredményének értelmezése II.

Solymosi Norbert

*Kvantitatív állatorvosi epidemiológia*

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem

2020. október 14.

- A diagnosztikai pontosság javítása céljából a teszteket **ismételhetik**, vagy **további** teszteket lehet alkalmazni a diagnosztikai folyamat során.
- Valójában a legtöbb diagnózis több teszten alapszik (pl. kórelőzmény, fizikai vizsgálat, laboratóriumi tesztek).
- A többszörös tesztelés alkalmazható egyidejűleg vagy egymást követően, és az eredmények értelmezhetők **párhuzamosan** vagy **sorozatban**.
- A különböző tesztek szenzitivitás- és specificitás-értékének **kombinációja eltér** az egyedi tesztek szenzitivitás- és specificitás-értékeitől.
- A tesztek kombinációjából származó eredmények értelmezésében fontos figyelembe venni, hogy annak alapfeltétele, hogy az alkalmazott tesztek **függetlenek** legyenek egymástól.
- Ha ez a függetlenség nem áll fenn, akkor a tesztkombinációkból származó szenzitivitás- és specificitás-értékekben a változás **kisebb**, mint az elméletileg várható.

- Ilyen **korrelációs** eredmények azon szerológiai tesztek esetén várhatók, amikor a tesztek ugyanazon ellenanyagcsoportot mérik, de kevésbé valószínű, ha a tesztek különböző biológiai válaszokat (pl. hisztopatológiai és szerológiai tesztelés) mérnek.
- A **párhuzamosan** alkalmazott tesztek esetén a **szenzitivitás** magasabb lesz, mint bármelyik alkalmazott egyedi teszt szenzitivitása

$$Se_{par} = 1 - (1 - Se_1) \times (1 - Se_2)$$

$$Sp_{par} = Sp_1 \times Sp_2$$

- A **sorozatban** végzett tesztek esetén a **specifitás** magasabb lesz, mint bármelyik alkalmazott egyedi teszt specifitása.

$$Se_{ser} = Se_1 \times Se_2$$

$$Sp_{ser} = 1 - (1 - Sp_1) \times (1 - Sp_2)$$

- Ha két tesztet használunk, a következő négy eredmény egyike lehetséges:
  - mindkét teszt pozitív
  - mindkét teszt negatív
  - az 1. teszt negatív és a 2. teszt pozitív
  - az 1. teszt pozitív és a 2. teszt negatív
- A párhuzamos értelmezésben az állat pozitívnak tekintendő, ha az egyik teszt pozitív – ez növeli a kombinált tesztek szenzitivitását, de csökkenti a specificitását.
- Ez a párhuzamos tesztelési stratégia hasznos, amikor egyik teszt sem rendelkezik különösebben nagy szenzitivitással, de a betegség különböző típusait képesek detektálni (pl. korai – késői, gyorsan – lassan progrediáló).
- Kórokozó kimutatása szenzitívebb lehet, mint a szerológiai tesztek a fertőzés korai stádiumában, de a szerológia szenzitívebb lehet a fertőzés későbbi stádiumában, amikor a kórokozók mennyisége alacsonyabb.

- A **sorozattesztelés** során **mindkét**, egymást követő tesztnek pozitívnek kell lennie, hogy az állatot pozitívként azonosítsuk, ez növeli a specificitást, de a szenzitivitás rovására.
- Az első teszt lehet **magas szenzitivitású** és olcsó, aminek eredményét egy **magas specificitású** teszttel tovább vizsgálhatjuk a fals pozitívek meghatározásának céljából.
- A **költséghatékonyság** miatt azokon az állatokon, amelyeknél az első teszt negatív volt, a második tesztet nem végzik el.
- Ez a stratégia lehetővé teszi az állatorvos számára, hogy **kevesebb tesztet** használjon a betegség kizárására, ugyanakkor időigényesebb.
- A két teszt pozitívitása után a **betegség valószínűsége** úgy számítható ki, hogy a második teszt esetén a pre-teszt valószínűség az első teszt alapján kapott pozitív prediktív értékkel lesz egyenlő.

- Pl.: egy A teszt esetén a pozitív prediktív érték 67.9% volt, amikor egy olyan állományban használták, ahol a prevalencia 20% volt.
- Ha a A-val tesztelt állat pozitív volt és azt újra vizsgálták egy másik B-teszttel, aminek a szenzitivitása 45.9%, a specificitása 96.9%, a 67.9%-os pozitív prediktív értéket tekintjük a B-tesztnél az érintettség pre-teszt valószínűségének.
- A Bayes-tétel alkalmazásával a második teszt alkalmazása után a pozitív prediktív érték 96.9% lesz, amennyiben feltételezhetjük, hogy A és B eredményei nem korrelálnak.
- Ha a tesztek korrelálatlanságának feltétele tartható, akkor A és B együttes alkalmazásával kapott két pozitív érték a fertőzésnek erősebb indikátora, mintha egyedül az A-t használták volna.

# Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary

R. Farkas<sup>a,\*</sup>, B. Tánzos<sup>a</sup>, M. Gyurkovszky<sup>a</sup>, G. Földvári<sup>a</sup>, N. Solymosi<sup>b</sup>,  
R. Edelhofer<sup>c</sup>, S. Hornok<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Parasitology and Zoology, Faculty of Veterinary Science, Szent István University, H-1078, Budapest, István u. 2, Hungary

<sup>b</sup> Department of Animal Hygiene, Herd-health and Veterinary Ethology, Faculty of Veterinary Science, Szent István University, H-1078, Budapest, István u. 2, Hungary

<sup>c</sup> Institute of Parasitology and Zoology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, 1210-Vienna, Austria

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 July 2012

Received in revised form

25 September 2012

Accepted 27 September 2012

### Keywords:

*T. equi*

Horse

cELISA

IFAT

PCR

Hungary

## ABSTRACT

The prevalence of *Theileria equi* infection was studied in 324 healthy horses from 27 farms in Hungary with cELISA and IFAT and the blood samples of 101 horses selected randomly were also examined by PCR. The results indicate that there are many stud farms where one or more horses are infected with *T. equi*. Among 27 farms 17 (67.9%) were found to have seropositive horses. The seroprevalence of theileriosis among the tested stud farms ranged between 0 and 100%. No marked differences were found in seropositivity between geographical areas. The overall prevalence of positive samples was 32.0% with cELISA as well as with IFAT. The results obtained with cELISA and IFAT in this study had the strongest agreement, except for 9 samples in which the two serological tests gave different results. The prevalence of infection among 101 horses was 49% with PCR. All 14 sequenced samples were found by BLAST analysis to be closest to the *T. equi* 18S rRNA gene sequences in GenBank with a similarity of  $\geq 99\%$ .

No significant association was found between the seropositivity and the age of horses. Horses below 5 years of age had three times higher chance to be PCR-positive, than older ones. There was no significant association between the gender and the results of diagnostic tests (cELISA:  $p = 0.40$ ; IFAT:  $p = 0.25$ ; PCR:  $p = 0.41$ ). Based on the findings, the prevalence of equine theileriosis is much higher than expected and it occurs in many regions of the country unlike equine babesiosis. To the authors' knowledge, this is the first report of the serological and molecular survey of *T. equi* infection in horses in Hungary.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Elanco Keto-Test

Közlemény	Telepek száma	Minta-elemszám (n)	DIM	SE	SP %	Prev
Belanger et al. (2003)	1	55	2-21	93	68	25.4
Carrier et al. (2004)	1	850	2-15	73	96	7.6
Geishauser et al. (2000)	21	469	1-7	80	76	12.0
Oetzel (2004)	17	221	?	87	83	17.2
Osborne et al. (2002)	1	248	1-15	95	69	16.5

## IDEXX Milk Pregnancy Test

Venhes: 923, üres: 392

Se: 98.8% (95% CI: 97.7-99.3%); Sp: 97.4% (95% CI: 95.2-98.6%)

## IDEXX SNAP BVDV Ag Test (szérum)

Pozitív: 211, negatív: 215

Se: 95.9% (95% CI: 92.3-97.9%); Sp: 100% (95% CI: 97.7-100%)



A **Prevalencia** a populációban jelenlévő esetek részaránya:

- az érintett egyedek számának és veszélyeztetett populáció méretének hányadosa
- annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed érintett a
- pre-test probability, post-test probability

**Pont**-prevalencia egy adott időpontban érintett egyedek részaránya.

**Periódus**-prevalencia egy adott időszakban azonosított érintett egyedek részaránya.

Ha az **esetdefiníció** nem tökéletes tesztre épül, akkor a teszt hibáját figyelembe kell venni a prevalencia becslése során.

- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- $x = 5, n = 20$

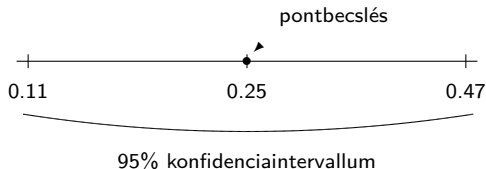
$$P_A = \frac{5}{20} = 0.25$$

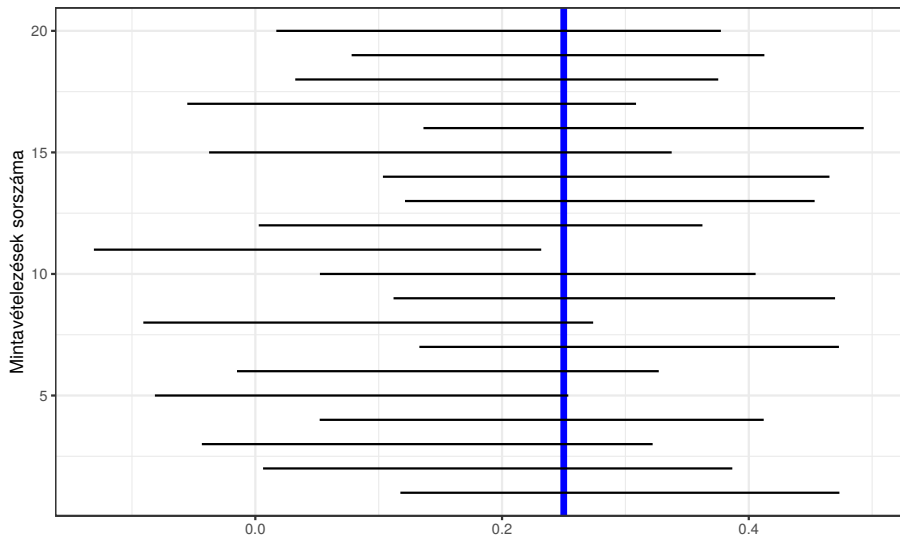
- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

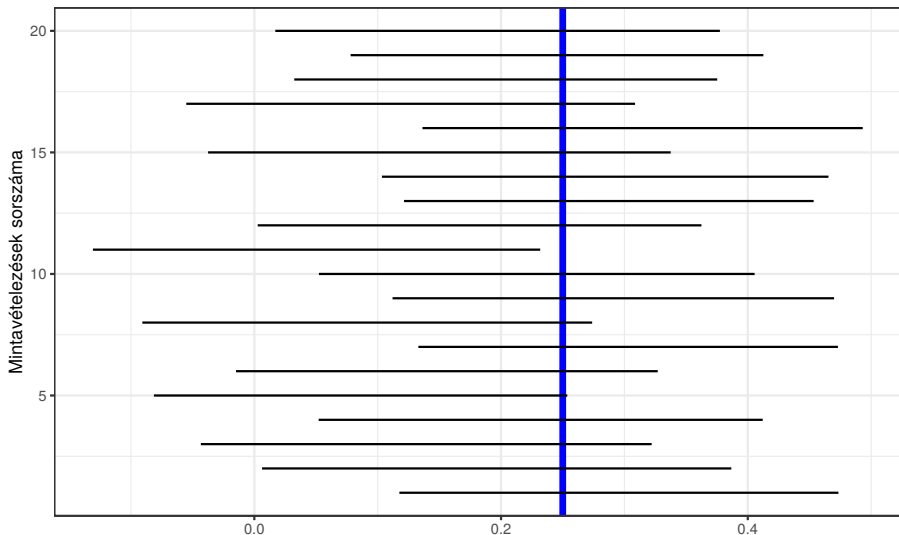
$$P_A = \frac{x}{n}$$

- $x = 5, n = 20$

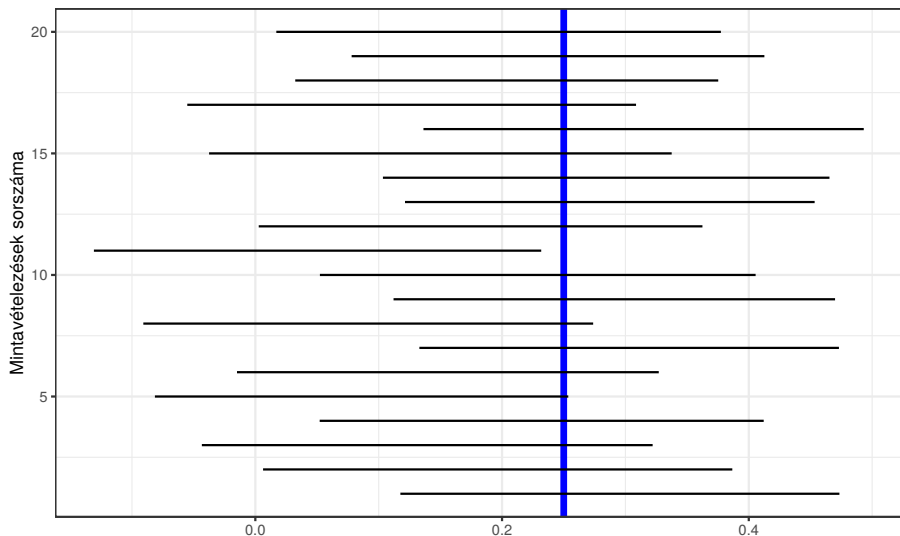
$$P_A = \frac{5}{20} = 0.25$$



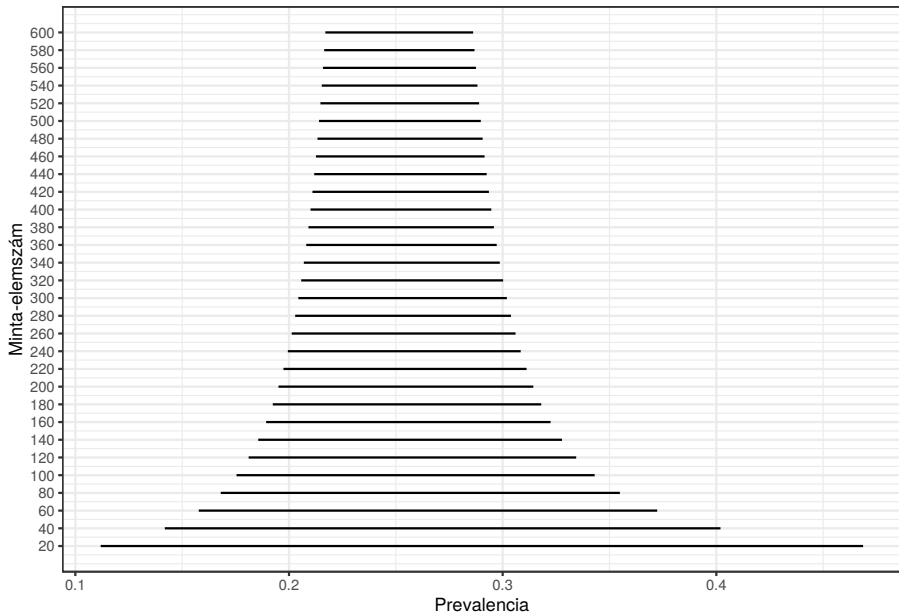




95% CI: ha 100-szor megismételnénk a vizsgálatot, akkor az ugyanúgy létrehozott intervallumok közül 95 tartalmazná a valódi prevalencia értékét



95% CI: ha 20-szor megismételnénk a vizsgálatot, akkor az ugyanúgy létrehozott intervallumok közül 19 tartalmazná a valódi prevalencia értékét.





- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- Bayesi becslés:
  - $n/N \leq 0.1$ :  $x \sim \text{binomial}(n, P_A)$
  - $n/N > 0.1$ :  $x \sim \text{hypergeometric}(N, n, P_A)$

- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- Bayesi becslés:
  - $n/N \leq 0.1$ :  $x \sim \text{binomial}(n, P_A)$
  - $n/N > 0.1$ :  $x \sim \text{hypergeometric}(N, n, P_A)$
- Teszt hibája:
  - Szenzitivitás:  $p(+|Infected) \neq 100\%$
  - Specificitás:  $p(-|Not\ infected) \neq 100\%$

- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- Bayesi becslés:
  - $n/N \leq 0.1$ :  $x \sim \text{binomial}(n, P_A)$
  - $n/N > 0.1$ :  $x \sim \text{hypergeometric}(N, n, P_A)$
- Teszt hibája:
  - Szenzitivitás:  $p(+|Infected) \neq 100\%$
  - Specifitás:  $p(-|Not\ infected) \neq 100\%$
  - Rogan-Gladen formula:

$$P_T = \frac{P_A + Sp - 1}{Sp + Se - 1}$$

- Látszólagos (apparent,  $P_A$ ) prevalencia: annak a valószínűsége, hogy egy véletlenszerűen kiválasztott egyed teszt-pozitív

$$P_A = \frac{x}{n}$$

- Bayesi becslés:
  - $n/N \leq 0.1$ :  $x \sim \text{binomial}(n, P_A)$
  - $n/N > 0.1$ :  $x \sim \text{hypergeometric}(N, n, P_A)$
- Teszt hibája:
  - Szenzitivitás:  $p(+|Infected) \neq 100\%$
  - Specifitás:  $p(-|Not\ infected) \neq 100\%$
  - Rogan-Gladen formula:

$$P_T = \frac{P_A + Sp - 1}{Sp + Se - 1}$$

- Bayesi binomiális modell:

$$x|P_A, Se, Sp \sim \text{binomial}(n, P_T Se + (1 - P_T)(1 - Sp))$$

- Rogan-Gladen formula:

- Rogan-Gladen formula:
- $x = 5$ ,  $n = 20$ ,  $Se = 0.3$ ,  $Sp = 0.96$ ,  $N = 675$

$$P_A = 5/20 = 0.25$$

$$P_T = \frac{P_A + Sp - 1}{Sp + Se - 1} = \frac{0.25 + 0.96 - 1}{0.96 + 0.3 - 1} = 0.808$$

- Rogan-Gladen formula:

- $x = 5, n = 20, Se = 0.3, Sp = 0.96, N = 675$

$$P_A = 5/20 = 0.25$$

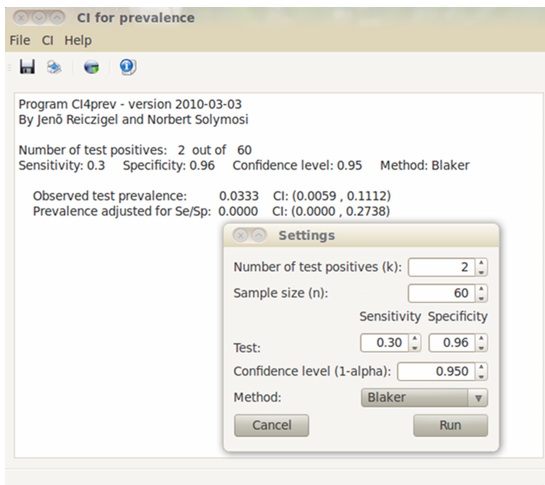
$$P_T = \frac{P_A + Sp - 1}{Sp + Se - 1} = \frac{0.25 + 0.96 - 1}{0.96 + 0.3 - 1} = 0.808$$

- $x = 2, n = 60, Se = 0.3, Sp = 0.96, N = 675$

$$P_A = 2/60 = 0.033$$

$$P_T = \frac{P_A + Sp - 1}{Sp + Se - 1} = \frac{0.033 + 0.96 - 1}{0.96 + 0.3 - 1} = -0.0269$$





<http://solymosin.github.io/CI4prev/>

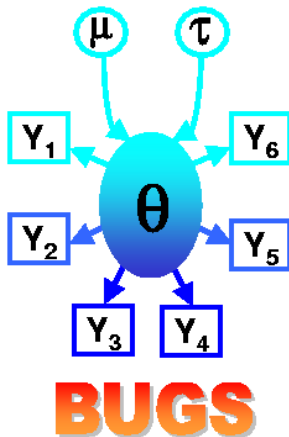
<https://epitools.ausvet.com.au/trueprevalence>

- $x = 2$ ,  $n = 60$ ,  $Se = 0.3$ ,  $Sp = 0.96$ ,  $N = 675$
- Bayesi megközelítés figyelembe veszi  $P_T$ ,  $Se$ ,  $Sp$  bizonytalanságát is:
  - 95%-osan biztos az, hogy  $Se < 0.5$  és  $Sp > 0.94$
  - Béta prior eloszlás
  - Posterior eloszlások
    - $P_T = 0.02$ , 95% credible interval 0 – 0.456
    - $Se = 0.29$ , 95% credible interval 0.11 – 0.52
    - $Se = 0.96$ , 95% credible interval 0.94 – 0.98
    - 97.5%-osan biztosak lehetünk abban, hogy  $P_T < 0.456$
    - 58%-osan biztosak lehetünk abban, hogy az állomány fertőzött



Thomas Bayes (1702 – 1761)

$$p(\theta|x) = \frac{p(x|\theta)}{p(x)} \times p(\theta)$$



<https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs>

<https://cadms.vetmed.ucdavis.edu/diagnostic-tests>

Dinya et al. (2019)

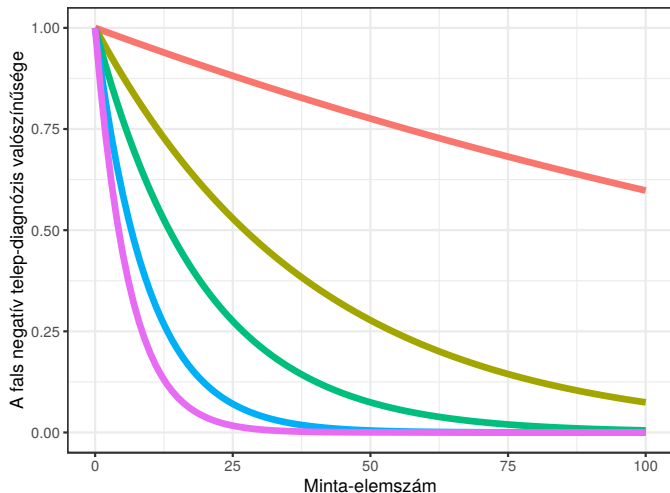
- Sok esetben egy **populációs egység** (telep, istálló, alom, stb) egészségi állapotára vonatkozó becslések fontosabbak, mint a csoportbeli egyedek státuszának ismerete.
- Nem általánosan ismert, hogy az **állományszintű tesztek**et máshogyan kell értelmezni, mint az egyedi tesztek.
- A tesztek állományszintű értelmezése gyakran **bonyolultabb**, különösen, ha az alkalmazott tesztek nem tökéletes specificitásúak.
- Az egyedi teszteredmény értelmezéshez hasonlóan szükséges a **telepszintű szenzitivitás**- és **specificitás**-értékek ismerete azokra a tesztekre vonatkozóan, amelyeket a telep státuszának meghatározásában használunk.
- Az **állomány-teszt** legvalószínűbb teljesítményét általában az **egyedi teszt** szenzitivitási és specificitási értékekből becsüljük.

- A **telepszintű szenzitivitás** (HSE) annak a valószínűsége, hogy egy fertőzött telep a telep tesztelése során pozitív eredményű lesz.
- A **telepszintű specificitás** (HSP) annak a valószínűsége, hogy a nem fertőzött telep a telepteszt alapján negatív eredményű lesz.
- A telepszintű szenzitivitás és specificitás nem csak az alkalmazott teszt egyedszintű szenzitivitásától és specificitásától függ, hanem további tényezőktől is:
  - minta-elemszámtól ( $n$ )
  - fertőzött telepen belüli prevalenciától
  - kritikus számtól:
    - hány állat pozitivitása (1,2,3, stb.) esetén tekintjük a telepet pozitívnak?
    - ahogy nő a kritikus szám, úgy növekszik a HSP és csökken a HSE

tesztelt állatok száma  $\uparrow$ :

$P_T$  0.01 0.05 0.1 0.2 0.3

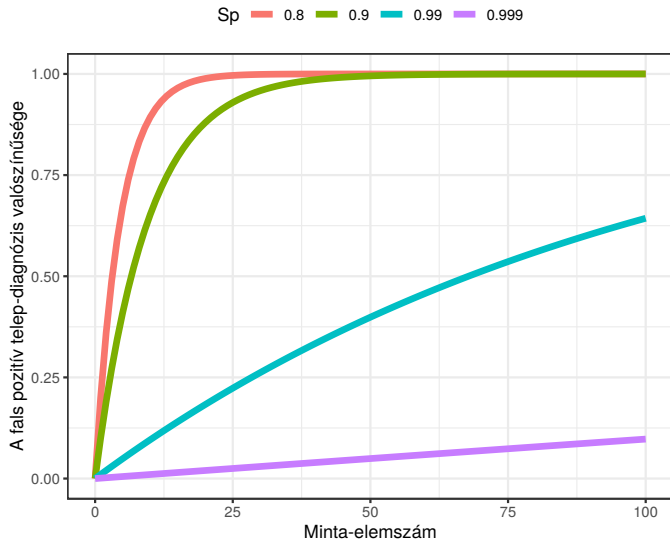
- HSE $\uparrow$
- fals negatív telep-diagnózis valószínűsége (1-HSE)  $\downarrow$
- magasabb prevalencia esetén a fals negatív telep-diagnózis valószínűsége gyorsabban csökken, mint alacsony prevalencia esetén



ugyanakkora mintaelemszám mellett könnyebb a fertőzött és nem fertőzött telepet elkülöníteni, ha magasabb a telepen belüli prevalencia

tesztelt állatok száma  $\uparrow$ :

- növekszik annak a valószínűsége, hogy legalább egy fals pozitív állatot találunk, vagyis a HSP  $\downarrow$
- a nagyobb telepekről, általában több mintát vesznek, így ezeknél gyakrabban kaphatunk fals pozitivitást



Ha a kritikus szám 1

$$HSE = 1 - (1 - P_A)^n$$

$$P_A = P_T Se + (1 - P_T)(1 - Sp)$$

- $1 - P_A$  annak a valószínűsége, hogy egy tesztelt állat negatív eredményű
- $(1 - P_A)^n$  annak a valószínűsége, hogy az összes ( $n$ ) tesztelt állat negatív eredményű
- $1 - (1 - P_A)^n$  annak a valószínűsége, hogy  $n$  állatból legalább 1 pozitív eredményű

$$HSP = Sp^n$$

- ha  $Sp = 0.95$  és  $n = 1$ , akkor  $HSP = 0.95^1 = 0.95$
- ha  $Sp = 0.95$  és  $n = 5$ , akkor  $HSP = 0.95^5 = 0.774$



Ha a kritikus szám nagyobb mint 1

$$HSP = \sum_{i=0}^{c-1} \frac{n!}{i! \times (n-i)!} \times p_f^i \times q_f^{n-i}$$

$$HSE = 1 - \sum_{i=0}^{c-1} \frac{n!}{i! \times (n-i)!} \times p_d^i \times q_d^{n-i}$$

$n$  minta-elemszám

$c$  kritikus szám

$p_f$   $P_A$  ha a telep valóban mentes

$q_f$   $1 - p_f$

$p_d$   $P_A$  ha a telep valóban fertőzött

$q_d$   $1 - p_d$

- **census**nak nevezzük, amikor a populáció minden egyedéről gyűjtünk adatokat
- költséges és nem nyújt jelentősen több információt a populáció fertőzöttségére vonatkozóan, mint egy olyan jól megtervezett mintavételezés, amely során **csak a populáció egy részéből** veszünk mintát
- csak a populáció egy részét érintő mintavételezés esetén matematikai statisztikai módszerekkel, mintaszám-becsléssel határozzuk meg azon **egyedek számát**, amelyekből mintát kell venni
- **mintázott populáció**, amelyből a minta származik (pl. egy vagy több nagy termelésű hazai tehenészet)
- **célpopuláció**, az a populáció (pl. az összes nagy termelésű hazai tehenészet)
- a populáció **mintavételi egységekből** áll, amelyek a vizsgálat céljából nem oszthatók tovább
- a mintavételi egységek sajátosságaik alapján **rétegekbe** sorolhatók

- gyakori feladat, hogy megállapítsuk egy adott fertőzéstől, hogy **jelen** van-e az állományban, illetve előfordult-e benne, vagy az állomány valamely csoportjában
- **100%-os specificitású** teszt esetén **egyetlen pozitív** teszteredmény is elegendő ahhoz, hogy az állományról megállapítsuk, hogy pozitív, míg tökéletlen specificitású szerológiai teszttel egynél több pozitív eredményre lehet szükség
- a fertőzés jelenlétének kimutatásához szükséges mintaelemszámot meg tudjuk határozni, két értékre van szükségünk:
  - az elvárt megbízhatósági szintre, ami általában 95%
  - a legvalószínűbb prevalencia értékre (ha vitás a mértéke, akkor érdemesebb egy alacsonyabb értéket választani, azt biztosítandó, hogy a minta-elemszám elegendő legyen)
- ha csak a jelenlét vizsgálata a cél, nem szükséges véletlen mintát vennie, elegendő, ha **magasabb kockázatú** csoportokat céloz meg

FreeCalc Version 2


## Freedom from Disease Survey Toolbox

Sample Size    Analyse Results    Tables    Options

Iteration	n	Cutpoint	Probability
1	50	0	0.002251
2	25	0	0.059809
3	38	0	0.011622
4	32	0	0.025172
5	28	0	0.041464
6	26	0	0.052973
7	27	0	0.046885


Test Sensitivity  %

Test Specificity  %

Population Size  

Prevalence

☒ Minimum Expected Prevalence  %

☐ Number of Diseased Elements  

FreeCalc Sample Size

**Survey Toolbox**

Sample Size Calculation

Required Sample Size = **27**      Cutpoint number of reactors = **0**

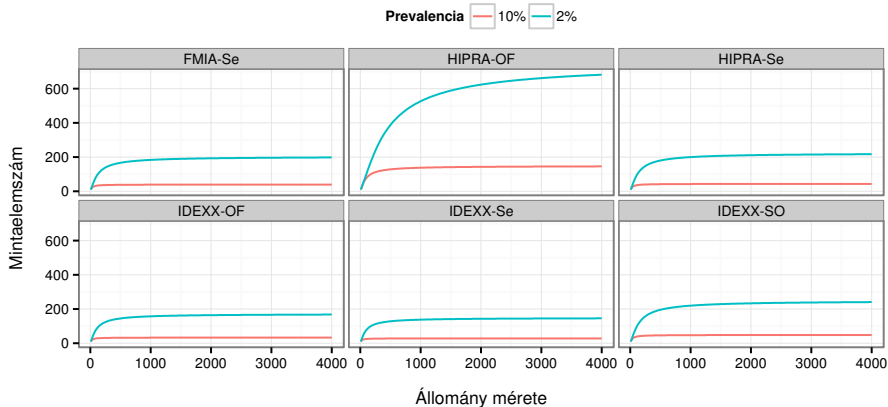
Calculated using the Hypergeometric Exact Probability formula.

	Actual	Target
Type I Error:	0.0469	0.05
Type II Error:	0.0000	0.05
Herd-level Sensitivity:	0.9531	0.9500
Herd-level Specificity:	1.0000	0.9500

Explanation

If a random sample of 27 units is taken from a population of 200, and 0 or fewer reactors are found, the probability that the population is diseased at a prevalence of 10.00% is 0.0469.

Exit



PPRS Teszt	Minta	Szenzitivitás	Specifitás
FMIA-Se	szérum	73.3% (12/15)	73.3% (12/15)
HIPRA-OF	nyál	20.0% (3/15)	100% (15/15)
HIPRA-Se	szérum	66.7% (10/15)	93.3% (14/15)
IDEXX-OF	nyál	86.7% (13/15)	100% (15/15)
IDEXX-Se	szérum	100% (15/15)	100% (15/15)
IDEXX-SO	nyál	60.0% (9/15)	93.3% (14/15)

Gerber et al. (2014)

- Belanger, A., L. Descoteaux, Y. Couture, J. Baril, and R. Bagg (2003). Evaluation of a milk strip test for detection of subclinical ketosis at cow level. In *36th Annu. Am. Assoc. Bovine Pract.(AABP) Conf. Auburn, AL: AABP*, Volume 175.
- Carrier, J., S. Stewart, S. Godden, J. Fetrow, , and P. Rapnicki (2004). Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *J Dairy Sci* 87, 3725–3735.
- Dinya, E., L. D. Molnár, J. Mészáros, and N. Solymosi (2019). *Biometria a klinikumban. Feladatok bayesi megoldása*. Budapest: Medicina.
- Farkas, R., B. Tanczos, M. Gyurkovszky, G. Földvári, N. Solymosi, R. Edelhofer, and S. Hornok (2013). Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Veterinary parasitology* 192(1-3), 143–148.
- Gardner, I. A. (2012). Analysis and use of diagnostic data. In *Diseases of Swine*, pp. 94–105. John Wiley & Sons, Ltd.
- Geishauser, T., K. Leslie, J. Tenhag, and A. Bashiri (2000). Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of dairy science* 83(2), 296–299.
- Gerber, P. F., L. G. Giménez-Lirola, P. G. Halbur, L. Zhou, X.-J. Meng, and T. Opriessnig (2014). Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and fluorescent microbead immunoassays for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *Journal of virological methods* 197, 63–66.
- Messam, L. L. M., A. J. Branscum, M. T. Collins, and I. A. Gardner (2008). Frequentist and Bayesian approaches to prevalence estimation using examples from John's disease. *Animal Health Research Reviews* 9(1), 1–23.
- Noordhuizen, J. P. T. M., K. Frankena, M. Thrusfield, and E. A. M. Graat (2001). *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Pers.
- Oetzel, G. R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 20(3), 651–674.
- Osborne, T., K. Leslie, T. Duffield, C. Petersson, J. Ten Hag, and Y. Okada (2002). Evaluation of keto-test in urine and milk for the detection of subclinical ketosis in periparturient holstein dairy cattle. In *Proceedings of the 35th conference of the American Association of Bovine Practitioners, Rome, GA, USA*, pp. 188–9.