

OBSERVATIONELE STUDIES EN RISICOFACTORENANALYSE

J. Dewulf¹, D. Maes¹, K. Mintiens², H. Laevens², F. Boelaert³, D. Verloo²

¹ Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Afdeling voor Veterinaire Epidemiologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

² Coördinatiecentrum voor Diergeneeskundige Diagnostiek, Centrum voor Onderzoek in de Diergeneeskunde en Agrochemie, Groeselenberg 99, B-1180 Brussel

³ Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (European Food Safety Authority), Palazzo Ducale, Parco Ducale 3, I-43100 Parma, Italië
jeroen.dewulf@UGent.be

SAMENVATTING

De oorzaak van veel ziekten is multifactorieel. Om een goede behandeling en/of preventie van deze ziekten mogelijk te maken is het van cruciaal belang de risicofactoren te kennen die het ontstaan van deze ziekten in de hand werken. Bijkomend is het ook belangrijk de invloed van ieder van deze risicofactoren op de ziekte te kunnen kwantificeren.

In het eerste deel van dit artikel worden de verschillende soorten observationele studies besproken die het mogelijk maken om onder veldomstandigheden verbanden tussen ziekten en risicofactoren te identificeren en te kwantificeren. Deze observationele studies kunnen worden opgesplitst in dwarsdoorsnedestudies, gevallencontrolestudies en cohortstudies.

In een tweede deel wordt ingegaan op de maatstaven van associatie die, aan de hand van de resultaten bekomen uit de observationele studies, het verband tussen risicofactor en ziekte kwantificeren. De twee meest gebruikte maatstaven voor associatie zijn het relatief risico en de odds ratio. Tevens wordt de toewijsbare proportie besproken. Deze parameter kwantificeert de impact van een bepaalde risicofactor op het voorkomen van de ziekte.

In het derde deel van dit artikel wordt besproken hoe de resultaten uit een risicofactorenanalyse dienen geïnterpreteerd te worden en welke de belangrijke oorzaken van vertekening van de resultaten kunnen zijn. Hierbij wordt voornamelijk gefocust op “confounding” of “verstremgeling”. Tevens wordt een korte introductie gegeven tot de theorie van multivariabele analyse.

Tenslotte wordt er nogmaals aangegeven dat het aan de hand van observationeel onderzoek niet mogelijk is om causale verbanden aan te tonen maar dat er wel enkele criteria zijn die, wanneer eraan voldaan wordt, het vermoeden van causaliteit kunnen versterken.

INLEIDING

Zoals reeds in voorgaande artikels werd besproken zijn zeer veel ziekten multifactorieel van aard (Laevens *et al.*, 2005). Om een optimale behandeling en/of preventie van dergelijke ziekten mogelijk te maken, is het belangrijk te weten welke factoren een impact hebben op de ziekte en hoe groot deze impact is.

Observationeel onderzoek is vaak een eerste stap in het identificeren van deze risicofactoren. Dit gebeurt aan de hand van gegevens die verzameld worden in het veld. Meestal wordt het verband tussen verschillende potentiële risicofactoren en een ziekte onderzocht in één en dezelfde studie. Op basis van de resultaten van dergelijke onderzoeken kunnen hypothesen vooropgesteld worden over mogelijke oorzakelijke verbanden. Observationeel onderzoek heeft

dus als voornaamste taak hypothesen te genereren die in verder onderzoek, bijvoorbeeld in klinische veldstudies (Maes *et al.*, 2005), al dan niet bevestigd kunnen worden. Het essentieel verschil tussen observationele studies en experimentele studies, waarvan de klinische veldstudie er één is, is dat bij experimentele studies de risicofactor volgens het toeval wordt toegewezen aan willekeurig (at random) geselecteerde dieren en die dan wordt vergeleken met willekeurig geselecteerde controledieren waarbij de risicofactor niet aanwezig is. Indien het geobserveerde verschil tussen de 2 groepen groter is dan wat toe te schrijven is aan het toeval, kan dat verschil enkel te wijten zijn aan de factor die gerandomiseerd werd. Alle andere factoren zijn immers gemiddeld evenredig verdeeld over de twee groepen. Voor be-

paalde risicofactoren is deze random toewijzing van de risicofactor echter niet mogelijk en dan is men genoodzaakt een beroep te doen op observationele studies. Een voorbeeld hiervan is het onderzoek, gedurende een epidemie van klassieke varkenspest (KVP), naar de invloed van de afstand tussen een infectiehaard en een buurtbedrijf op de kans op infectie op dat buurtbedrijf (Laevens, 1999). Uiteraard is het hier niet mogelijk bedrijven at random op bepaalde afstanden van de infectiehaard te plaatsen en is men genoodzaakt gebruik te maken van de gegevens zoals ze zich in het veld voordoen.

Het doel van dit artikel is summier de verschillende soorten observationeel onderzoek te bespreken en aan te geven welke technieken er worden gebruikt om verbanden tussen risicofactoren en ziekte te kwantificeren. Tevens wordt aangegeven wat de waarde maar ook wat de beperkingen zijn van resultaten bekomen uit observationeel onderzoek.

OBSERVATIONELE STUDIES

Om het verband tussen ziekte en risicofactoren na te gaan onder natuurlijke omstandigheden wordt vaak gebruik gemaakt van observationeel onderzoek. De term "observationeel" heeft betrekking op het feit dat de onderzoeker niet intervenueert, hij observeert enkel wat er zich afspeelt binnen de gevolgde groep dieren (Thrusfield, 1995).

Bij aanvang van observationeel onderzoek wordt steeds een reeks (uitgebreid of beperkt) risicofactoren aangeduid die worden onderzocht en waarvan op basis van de verzamelde gegevens wordt nagegaan of ze een invloed hebben op het al dan niet voorkomen van de ziekte.

Aangezien in observationele studies het verband tussen een risicofactor en een ziekte wordt bestudeerd onder natuurlijke omstandigheden, zijn de resultaten van dit soort onderzoek relatief goed extrapoleerbaar naar de ganse (referentie)populatie. Daarom wordt gezegd dat observationele studies een grote externe validiteit hebben. Anderzijds heeft dit soort studies ook belangrijke beperkingen. Vaak zijn het dure studies die heel wat administratie en logistiek vergen om correct uitgevoerd te kunnen worden. Ook zijn de studies, door het feit dat ze in het veld uitgevoerd worden, vatbaar voor factoren die het resultaat kunnen beïnvloeden en vertekenen waardoor waargenomen verbanden misschien geen correcte weergave zijn van de realiteit. Dit laatste resulteert in een lage interne validiteit.

Er wordt onderscheid gemaakt tussen drie soorten observationele studies: dwarsdoorsnede (cross-sectionele) studies, gevallencontrole (case-control) studies en cohortstudies. Voor de eenvoud wordt bij de beschrijving van de verschillende soorten observationeel onderzoek steeds het verband tussen één risicofactor en de ziekte gebruikt in de voorbeelden. In de realiteit wordt evenwel vaak het verband tussen een hele reeks risicofactoren en een bepaalde ziekte onderzocht in één en dezelfde studie. Hierop zal in het tweede deel van het artikel worden teruggekomen bij de bespreking van multivariabele analysemodellen. Tenslotte dient opgemerkt te worden dat ondanks het feit er gemeenzaam wordt gesproken over risicofactorenonderzoek, dit soort onderzoek evengoed kan worden gebruikt voor het identificeren van beschermende factoren. Dit zijn dus factoren die bij hun voorkomen een reductie van de frequentie van ziekte veroorzaken.

Dwarsdoorsnede studie

In een dwarsdoorsnede studie wordt een willekeurige steekproef uit de populatie getrokken en wordt simultaan voor elk dier (of bedrijf) gemeten of het de ziekte heeft en/of de risicofactor aanwezig is.

Voorbeeld

In het kader van het verhogen van de voedselveiligheid wordt veel aandacht besteed aan de bestrijding van *Salmonella*, één van de meest frequent voorkomende zoönosen. Om het probleem bij de bron aan te pakken wordt onder andere getracht de prevalentie van *Salmonella* op varkensbedrijven te reduceren. Hiervoor is het van belang te weten welke factoren het voorkomen van deze kiem op de varkensbedrijven beïnvloeden. Uit een risicofactorenonderzoek wordt één aspect, namelijk het mogelijk verband tussen vloertype (vol rooster of half rooster) en infectiestatus, als voorbeeld gebruikt.

Om aan de hand van een dwarsdoorsnedestudie het verband tussen vloertype en de *Salmonella* infectiestatus na te gaan, werden er op willekeurige basis 170 varkensbedrijven geselecteerd. Vervolgens werd op ieder bedrijf de infectiestatus bepaald bij de slachtrijpe vleesvarkens. Deze werden ingedeeld in hoge infectiestatus en lage infectiestatus. Tevens werd op ieder bedrijf bepaald op welk type vloer de vleesvarkens waren gehuisvest. De resultaten worden vervolgens in een 2 x 2 tabel uitgezet (Tabel 1).

Tabel 1. Resultaten van een dwarsdoorsnedestudie naar het verband tussen vloertype en *Salmonella* infectiegraad.

	<i>Salmonella</i> infectiegraad		
	Hoog	Laag	
Half rooster	69	29	98
Vol rooster	32	40	72
	101	69	170

De dwarsdoorsnedestudies is een relatief eenvoudige en goedkope studie die zowel informatie verschaft over de prevalentie van de ziekte als over het voorkomen van mogelijke risicofactoren in de populatie. Dit type van studie wordt dan ook vaak gebruikt wanneer niet veel geweten is over de ziekte en de mogelijke risicofactoren. Een toepassingsmogelijkheid is bijvoorbeeld verkennend onderzoek bij nieuwe ziekten. Voor onderzoek naar zeldzame ziekten of zeldzame risicofactoren is een dwarsdoorsnedestudie niet geschikt omdat in dergelijke situaties de kans zeer groot is dat bij een willekeurige steekproef er ofwel zeer weinig dieren met de ziekte in de onderzoekspopulatie zitten, ofwel zeer weinig dieren waarvoor de risicofactor aanwezig is.

Wanneer in een dwarsdoorsnedestudie het voorkomen van de ziekte en de risicofactor op hetzelfde moment (dag, week, maand) wordt geregistreerd, is er geen informatie beschikbaar over de opeenvolging van gebeurtenissen. Dit heeft voor gevolg dat steeds moet opgelet worden dat oorzaak en gevolg niet verwisseld worden. Wanneer bijvoorbeeld binnen een groep koeien wordt nagegaan of er zich gedurende de laatste maand klauwproblemen hebben voorgedaan en er eveneens wordt nagegaan of er hoefverzorging heeft plaatsgevonden en hiertussen een positief verband wordt gevonden, dan zou kunnen besloten worden dat de klauwproblemen een gevolg zijn van de hoefverzorging. Het omgekeerde is evenwel natuurlijk veel waarschijnlijker.

Gevallecontrolestudie

In tegenstelling tot dwarsdoorsnedeonderzoek is een gevallencontrole (case-control) studie bijzonder geschikt om zeldzaam voorkomende ziekten te onderzoeken. Hierbij zullen in eerste instantie zieke dieren of bedrijven waar de ziekte voorkomt, geïdentificeerd worden. Vervolgens worden alle zieke dieren of een random selectie van de zieke dieren (bedrij-

Tabel 2. Resultaten van een gevallencontrolestudie naar het verband tussen het voorkomen van BSE en het voeren van vleesbeendermeel (VBM).

	BSE op het bedrijf		
	Ja	Nee	
Wel VBM	87	20	107
Geen VBM	90	98	188
	177	118	295

ven) in de studie opgenomen. Eens deze gevallen (cases) in de studie gekend zijn, worden controledieren (bedrijven) – dieren of bedrijven waarbij de ziekte niet voorkomt – geïdentificeerd. Uit alle mogelijke controledieren worden per geval 1 tot maximaal 5 controledieren at random geselecteerd. Bij de selectie van controledieren wordt vaak rekening gehouden met het feit dat zowel de zieke dieren en de controledieren één of meerdere kenmerken gemeenschappelijk hebben. Vaak zijn deze kenmerken geslacht, leeftijd en bedrijf. Deze kenmerken worden “matching” variabelen genoemd en het zijn kenmerken die in eerder uitgevoerde epidemiologische studies als risicofactoren aangeduid werden. Het nadeel van matching is dat het effect van “matching variabelen” op het voorkomen van ziekte niet meer kan onderzocht worden. Ze komen immers even frequent voor bij de zieke als bij de niet-zieke dieren. Het voordeel is echter dat deze variabelen niet meer kunnen optreden als confounders (zie verder). Men moet er echter op toezien dat het aantal variabelen waarvoor gevallen en controles gematcht worden niet te hoog is omdat dit het onderscheidend vermogen van een analyse in het gedrang kan brengen. Dit fenomeen wordt ook wel “overmatching” genoemd. Een andere strategie bestaat erin om naast de te onderzoeken risicofactoren ook alle gekende beïnvloedende factoren te registreren en hiervoor naderhand in de analyse te corrigeren met behulp van multivariabele technieken. Deze methodiek is te verkiezen boven “matching” maar vergt veel data wanneer er verschillende beïnvloedende factoren zijn waarvoor moet gecorrigeerd worden.

Voorbeeld

In het begin van de epidemie van boviene spongiforme encefalopathie (BSE) werd een gevallencontrolestudie uitgevoerd ter identificatie van risico-

factoren die het voorkomen van BSE beïnvloeden (Wilesmith *et al.*, 1992). Er werd onder andere nagegaan of het voederen van krachtvoer waarin vleesbeendermeel verwerkt zat, een risicofactor was voor het ontstaan van BSE op een bedrijf. Hiervoor werden 177 bedrijven waarop minstens één geval van BSE was voorgekomen in het laatste jaar, geselecteerd en er werden 118 negatieve controlebedrijven aangeduid die gelegen waren in de nabijheid van de gevallen (matching). Het feit dat er in deze studie meer gevallen dan controles werden opgenomen is atypisch en is een gevolg van de specifieke studieopzet (Wilesmith *et al.*, 1992); anderzijds bemoeilijkt het geenszins de analyse van de resultaten.

In tegenstelling tot het dwarsdoorsnedeonderzoek wordt bij een gevallencontroleonderzoek niet de werkelijke ziekteprevalentie in de populatie gemeten aangezien de onderzoeker zelf bepaalt hoeveel zieke en hoeveel gezonde dieren (bedrijven) hij opneemt in zijn studie.

In het BSE-voorbeeld werden 177 gevallen en 118 controles geselecteerd. De gevonden prevalentie van 60% (=177/295) is dus geen correcte weerspiegeling van de ware prevalentie van BSE in de populatie.

Cohortstudie

In tegenstelling tot een gevallencontrolestudie, waarbij dieren geselecteerd worden op basis van hun ziektestatus, worden in een cohortstudie niet-zieke dieren (niet-geïnfecteerde bedrijven) geselecteerd op basis van de aan- of afwezigheid van de risicofactor. Hierbij worden niet-zieke dieren at random geselecteerd uit de niet-zieke populatie die blootgesteld is aan de risicofactor, en worden niet-zieke dieren at random geselecteerd uit de niet-zieke populatie die niet blootgesteld is aan de risicofactor. Vervolgens worden de groepen (cohorten) gedurende een bepaalde tijd gevolgd en wordt geobserveerd hoeveel nieuwe ziektegevallen er optreden in beide cohorten. Het cohortonderzoek is dan ook de enige van de drie besproken studies waarbij incidentie (= aantal nieuwe ziektegevallen binnen een bepaalde tijd) bekomen wordt. In tegenstelling tot de dwarsdoorsnede- en de gevallencontrolestudie kan bij een cohortonderzoek het effect van slechts één risicofactor (namelijk deze die werd gebruikt om de dieren of bedrijven in te delen in twee cohorten) worden onderzocht. De cohortstudie is dan ook een veel gebruikt alternatief voor het experimenteel onderzoek wanneer de risicofactor niet kan gerandomiseerd worden. Bovendien is de studie geschikt voor onderzoek naar het effect van

zeldzame risicofactoren. Het nadeel van cohortstudies is dat ze vaak duur en arbeidsintensief zijn. Bij relatief zeldzame ziekten moeten er veel dieren opgenomen worden in iedere cohort teneinde over voldoende informatie te beschikken om een zinvolle statistische analyse te kunnen uitvoeren. Anderzijds heeft de cohortstudie het voordeel dat het effect van een bepaalde risicofactor op verschillende ziekten tegelijkertijd kan onderzocht worden. Ook bij een cohortonderzoek is het noodzakelijk dat de blootgestelde en niet-blootgestelde groep met elkaar vergelijkbaar zijn voor alle factoren die de uitkomst mogelijk kunnen vertekenen. Net zoals bij de gevallencontrolestudie kan dit gedaan worden aan de hand van “matching” of multivariabele data-analyse.

Voorbeeld

In een onderzoek naar risicofactoren die het ontstaan van voetblessures gedurende paardenraces beïnvloeden, werd onder andere nagegaan wat de invloed is van het niet meer laten drinken van de paarden vanaf 4 uur vóór de wedstrijd (een sterk verspreide gewoonte) op de kans om een voetblessure op te lopen (Pinchbeck *et al.*, 2004). Hiervoor werd bij aanvang van de race nagegaan of het paard al dan niet had kunnen drinken in de laatste 4 uur vóór de wedstrijd en er werd gevolgd of de dieren gedurende de wedstrijd voetblessures opliepen. De resultaten staan in Tabel 3.

In tegenstelling tot de twee voorgaande studies kan in een cohortstudie wel een duidelijke uitspraak worden gedaan over de opeenvolging van gebeurtenissen aangezien de dieren over de tijd worden gevolgd.

In Tabel 4 worden enkele karakteristieken van de verschillende soorten observationeel en experimenteel onderzoek met elkaar vergeleken.

Tabel 3. Resultaten van een cohortonderzoek naar het verband tussen het niet meer laten drinken van de paarden vanaf 4 uur vóór de wedstrijd en de kans op voetblessures (naar Pinchbeck *et al.*, 2004).

	Voetblessures		
	Ja	Nee	
Geen drinken	40	651	691
Wel drinken	43	2145	2188
	83	2796	2879

Tabel 4. Karakteristieken van de verschillende typen observationele studies ten opzichte van experimenteel onderzoek.

Studiotype	Moelijkheidsgraad	Impact van onderzoeker op studieverloop	Sterkte van het "bewijs" van een causaal verband	Relevantie voor de praktijk
Experimenteel onderzoek				
Labo-experiment	gemiddeld	zeer hoog	zeer hoog	laag
Veldstudie	gemiddeld	hoog	zeer hoog	hoog
Observationeel onderzoek				
Dwarsdoorsnede	gemiddeld	Laag	laag	gemiddeld
Gevallencontrole	gemiddeld	gemiddeld	gemiddeld	hoog
Cohort	moeilijk	hoog	hoog	hoog

Uit Dohoo *et al.*, 2003 (Zie ook Maes *et al.*, 2005)

MAATSTAVEN VAN ASSOCIATIE

Om na te gaan of er een statistisch significant verband bestaat tussen een risicofactor en een ziekte, moeten de waarnemingen bekomen uit de verschillende soorten onderzoek worden geanalyseerd. Hiertoe worden maatstaven van associatie geschat die de sterkte van het verband tussen de risicofactor en de ziekte kwantificeren of de grootte van het effect van de risicofactor op het voorkomen van ziekte in de populatie evalueren.

De sterkte van de associatie

De sterkte van een associatie wordt meestal weergegeven aan de hand van het relatief risico (RR) of de odds ratio (OR). Beide geven in grote lijnen dezelfde informatie, namelijk de verhouding van de kans op ziekte bij aanwezigheid van de risicofactor ten opzichte van de kans op ziekte bij afwezigheid van de risicofactor.

De interpretatie van zowel het RR als de OR is als volgt: wanneer het RR of de OR gelijk is aan 1 dan bestaat er geen verband tussen de risicofactor en de ziekte, want de ziekte komt net evenveel voor bij aanwezigheid als bij afwezigheid van de risicofactor. Wanneer het RR of de OR groter is dan 1 dan is er sprake van een risicofactor, aangezien de ziekte frequenter voorkomt bij aanwezigheid van de risicofactor. Wanneer het RR of de OR kleiner is dan 1 is er sprake van een beschermende factor.

Relatief Risico (RR)

Het relatief risico is de verhouding van incidentie van de ziekte in de groep dieren blootgesteld aan de risicofactor (=I_e, e staat voor exposed) tot de incidentie van de ziekte in de groep dieren niet blootgesteld aan de risicofactor (=I₀). Anders gezegd komt dit neer op: hoeveel nieuwe gevallen zijn er opgetreden gedurende een bepaalde tijdspanne bij een groep dieren waarbij de risicofactor aanwezig was in verhouding tot het aantal nieuwe gevallen in een groep dieren waar de risicofactor afwezig was.

Uit Tabel 5 kan de incidentie in de groep dieren met de risicofactor I_e geschat worden door A/(A+B) en soortgelijk de incidentie in de groep dieren zonder de risicofactor, I₀, door C/(C+D).

Een schatting van het RR wordt dan gegeven door

$$\hat{RR} = (A/A+B)/(C/C+D) \quad (1)$$

Iedere maatstaf van associatie wordt geschat op basis van de resultaten van een studie. Uiteraard worden deze studies uitgevoerd op een beperkte steekproef en niet op de ganse populatie. Vandaar dat de gevonden resultaten schatters zijn van de werkelijke maatstaven van associatie. Dit wordt symbolisch aangeduid door het hoedje boven de populatieparameter. Als gevolg van het feit dat de maatstaven van associatie berekend zijn op basis van steekproeven, bepaalt het toeval ook voor een deel de uitkomst. Dit wordt aangegeven door het construeren van een 95% betrouwbaarheidsinterval (95%BI) rond de gevonden waarde.

Het 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) voor het \hat{RR} wordt gegeven door

$$95\%BI = e^{\log(\hat{RR}) \pm 1,96 \sqrt{\frac{B/A}{A+B} + \frac{D/C}{D+C}}} \quad (2)$$

Dit 95% betrouwbaarheidsinterval geeft de uiterste grenzen aan waarbinnen het werkelijke RR ligt met 95% betrouwbaarheid. Wanneer dit BI 1 niet omvat dan kan worden gesteld dat het RR significant verschillend is van 1 op een significantieniveau van 5%.

Aangezien het RR wordt berekend aan de hand van incidentiecijfers zijn de gegevens meestal afkomstig van cohortstudies.

Voorbeeld

Gebaseerd op de resultaten van Tabel 3 (cohort-onderzoek) kan het verband berekend worden tussen het niet laten drinken van een paard vanaf 4 uur vóór de wedstrijd en de kans op een voetblessure. In de groep paarden die niet te drinken kreeg vanaf 4 uur vóór de wedstrijd, was de incidentie (I_e) 40/691, in de groep paarden die wel te drinken kreeg, was de incidentie (I_o) 43/2188. Op basis van deze data wordt het RR geschat als $(40/691)/(43/2145) = 2,95$. Dit wil zeggen dat een paard dat niet kon drinken gedurende de laatste 4 uur vóór de wedstrijd 2,95 maal meer kans heeft om een voetblessure op te lopen dan een paard dat wel kon drinken. De onder- en bovengrens van het 95% BI zijn respectievelijk 1,93 en 4,49, wat inhoudt dat het RR significant groter is dan 1.

Er moet opgemerkt worden dat het RR niets zegt over de frequentie van het voorkomen van de ziekte. Het kan makkelijk gebeuren (zoals in bovenstaand voorbeeld) dat een redelijk hoog RR wordt gevonden ondanks het feit dat de ziekte slechts een lage incidentie heeft.

Odds Ratio (OR)

Wanneer men niet over incidenties beschikt (dwarsdoornedestudie, gevallencontrolestudie) dan wordt de odds ratio (OR) gebruikt in plaats van het RR. De odds is de verhouding van de kans dat een gebeurtenis zich voordoet (π) ten opzichte van de kans dat een gebeurtenis zich niet voordoet ($1 - \pi$).

De odds is goed gekend bij het paardenwedrennen waarbij paarden worden gerangschikt volgens de verhouding van de kans om te winnen ten opzichte van de kans om niet te winnen. Dit wordt weergegeven als bijvoorbeeld "1 tegen 4". Dit is de odds van het paard om de wedstrijd te winnen.

Tabel 5. Theoretische 2 x 2 tabel.

	Ziekte aanwezig	Ziekte afwezig
Risicofactor aanwezig	A	B
Risicofactor afwezig	C	D

De OR is de ratio (=verhouding) van twee odds, namelijk de odds op ziekte bij aanwezigheid van de risicofactor ten opzichte van de odds op ziekte bij afwezigheid van de risicofactor. Resultaten worden ook vaak als odds ratios weergegeven omdat statistische modellen voor de analyse van binaire gegevens (logistische regressie) zijn gebaseerd op odds ratios.

Een schatting van de OR op basis van de gegevens in Tabel 5 wordt dan gegeven door

$$\hat{OR} = (A/B)/(C/D) = (AD)/(BC) \quad (3)$$

Het 95% BI voor de OR wordt gegeven door

$$95\%BI = e^{\log(\hat{OR}) \pm 1,96 \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}}} \quad (4)$$

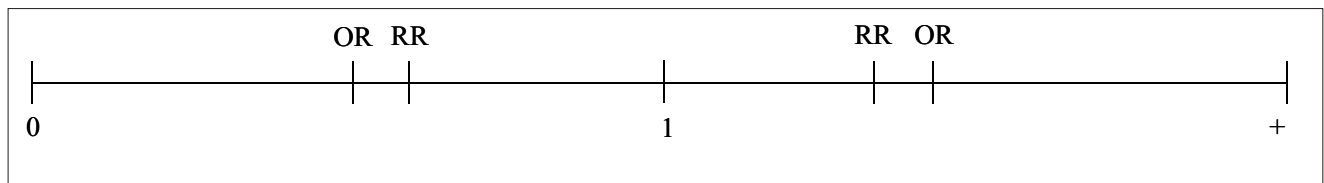
Voorbeeld

In Tabel 1 staan de resultaten van een dwarsdoornedestudie om het verband tussen vloertype en *Salmonella* prevalentie te onderzoeken. De odds op hoge *Salmonella* infectiegraad bij half rooster wordt geschat door $(69/98) / (29/98)$, de odds hoge *Salmonella*-infectiegraad bij vol rooster door $(32/72) / (40/72)$. De OR wordt geschat door $(69/29) / (32/40) = 2,95$. De onder en bovengrens van het 95% BI rond de OR zijn respectievelijk 1,58 en 5,62, wat inhoudt dat de OR significant groter is dan 1.

De odds ratio ligt steeds verder verwijderd van de waarde 1 (= kantelpunt) dan het relatieve risico (Figuur 1).

Effect van de risicofactor in de populatie

Het RR of de OR zegt iets over de sterkte van het verband tussen de risicofactor en de ziekte. Zij zeggen evenwel niets over het belang van de risicofactor in de populatie. Om de grootte van de invloed van een risicofactor op het voorkomen van de ziekte te kwantificeren, wordt gebruik gemaakt van de toewijsbare proportie (TP). Hiermee wordt de vraag beantwoord:



Figuur 1. verband tussen RR en OR.

hoeveel procent van de ziektegevallen wordt naar schatting daadwerkelijk veroorzaakt door de risicofactor? Of andersom, als de risicofactor wordt weggenomen, hoeveel ziektegevallen kunnen naar schatting dan voorkomen worden? Deze toewijsbare proportie kan zowel worden bepaald voor de blootgestelde groep (Formule 5a en 5b) als voor de ganse populatie (Formule 6a en 6b).

Toewijsbare proportie voor de blootgestelde groep

$$TP_e = [(RR-1)/RR] \times 100 \quad (5a)$$

$$TP_e = [(OR-1)/OR] \times 100 \quad (5b)$$

Toewijsbare proportie voor de ganse populatie

$$TP_p = [(RR-1)/RR] \times 100 \times f \quad (6a)$$

$$TP_e = [(OR-1)/OR] \times 100 \times f \quad (6b)$$

waarbij f gelijk is aan de proportie zieke dieren die blootgesteld is aan de risicofactor,
 $f = A / (A+C)$.

Voorbeeld

Op basis van de resultaten van Tabel 1 werd berekend dat de odds op een hoge *Salmonella*-infectiegraad 2,95 maal hoger was bij halfroostervloer dan bij volroostervloer (OR=2,95). Op basis daarvan kan berekend worden dat, indien alle halfroostervloeren vervangen zouden worden door volroostervloeren, dit een reductie van 66,1% ($= (2,95-1)/2,95 \times 100$) van het aantal bedrijven met een hoge *Salmonella*-infectiestatus zou opleveren.

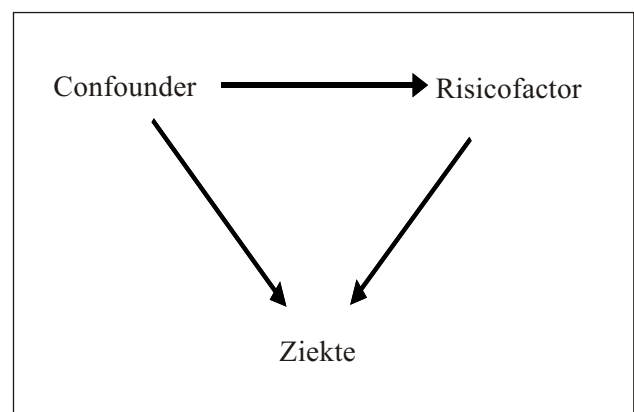
Wanneer men het gecombineerd effect van meerdere risicofactoren wil berekenen, moet eerst het gezamenlijk RR of OR berekend worden en vervolgens kan deze gezamenlijke waarde in de formule worden ingepast.

BIAS EN CONFOUNDING

Aangezien observationele studies per definitie plaatsvinden in het veld moet er rekening gehouden

worden met allerlei fouten die kunnen optreden bij de opzet (bijvoorbeeld het selecteren van de dieren, ...) en het uitvoeren (bijvoorbeeld het meten van ziekte, het meten van risicofactoren, ...) van de studie (Laevens *et al.*, 2005). Wanneer deze fouten een systematisch karakter hebben, kunnen zij het resultaat van de studie sterk beïnvloeden. Deze vertekening van de resultaten wordt "bias" genoemd. Bias of vertekening komt uiteraard niet alleen voor bij observationeel onderzoek maar is een probleem dat in veel verschillende takken van de epidemiologie aanwezig is. Het onderwerp wordt dan ook verder besproken en geïllustreerd in andere artikelen van deze reeks.

Een bijzondere vorm van vertekening van de resultaten, typisch voor observationeel onderzoek, is "confounding". Confounding ontstaat als een waargenomen verband tussen een bepaalde ziekte en een bepaalde risicofactor geen correcte weergave is van het verband dat in werkelijkheid bestaat en als deze vertekening het gevolg is van een andere niet opgemeten risicofactor die zowel gecorreleerd is met de gemeten risicofactor als met de ziekte (Martin *et al.*, 1994). Om van een confounder te kunnen spreken moet een parameter dus voldoen aan de volgende drie criteria: 1) de confounder moet gecorreleerd zijn met de risicofactor, 2) de confounder moet gecorreleerd zijn met de ziekte, 3) de confounder mag geen tussenstap zijn in de pathogenese tussen risicofactor en ziekte (Figuur 2).



Figuur 2. Schematische voorstelling van een confounder (Noordhuizen *et al.*, 1997).

Tabel 6. Resultaten van een gevallencontrolestudie over het verband tussen ventilatiesysteem en ademhalingsstoornissen.

	Ademhalingsstoornis	
	Ja	Nee
Natuurlijke ventilatie	45	35
Mechanische ventilatie	45	75

Voorbeeld

Confounding kan worden geïllustreerd aan de hand van de resultaten van een studie die werd uitgevoerd om het verband te onderzoeken tussen het ventilatiesysteem (natuurlijk versus mechanisch) en het voorkomen van ademhalingsstoornissen bij varkens. Hiervoor werd een gevallencontrolestudie uitgevoerd op 200 bedrijven, waarvan 80 bedrijven met natuurlijke ventilatie en 120 bedrijven met mechanische ventilatie. Er werd een bepaalde drempelwaarde voor de hoestindex ingesteld. Een bedrijf waar de hoestindex boven de drempelwaarde kwam, werd als een geval aanzien, onder de drempelwaarde werd als controle aanzien (Tabel 6). Natuurlijke ventilatie werd aanzien als de risicofactor.

De OR voor het verband tussen natuurlijke ventilatie en ademhalingsstoornissen is hier 2,14, het 95% betrouwbaarheidsinterval bedraagt 1,21-3,81.

Bij verder onderzoek werd echter geopperd dat de bedrijfsgrootte mogelijk de resultaten vertekende. De grootte van alle onderzochte bedrijven werd nagegaan en de bedrijven werden onderverdeeld in grote (>500 varkens) en kleine bedrijven (<500 varkens)

Tabel 7. Resultaten van een gevallencontrolestudie over het verband tussen ventilatiesysteem en ademhalingsstoornissen opgesplitst per bedrijfstype.

	Grote bedrijven Ademhalingsstoornis		Kleine bedrijven Ademhalingsstoornis	
	Ja	Nee	Ja	Nee
Natuurlijke ventilatie	40	20	5	15
Mechanische ventilatie	25	15	20	60

Tabel 8. Verband tussen de grootte van het bedrijf en de aanwezigheid van mechanische ventilatie.

	Natuurlijke Ventilatie	Mechanische ventilatie
Groot bedrijf	60	40
Klein bedrijf	20	80

Wanneer de resultaten uit Tabel 5 opgesplitst worden per type bedrijf (Tabel 7) worden volgende resultaten bekomen:

Binnen de groep van de grote bedrijven is de OR voor het verband tussen natuurlijke ventilatie en ademhalingsstoornissen nu 1,20 (0,52-2,77). Binnen de groep van de kleine bedrijven is de OR = 1,00 (0,32-3,10). De resultaten per bedrijfstype tonen aan dat er geen significant verband bestaat tussen natuurlijke ventilatie en ademhalingsstoornissen (OR rond 1 en het betrouwbaarheidsinterval omvat steeds 1).

Tenslotte wordt het verband tussen de grootte van het bedrijf en de aanwezigheid van mechanische ventilatie geschat als OR = 6,00 (3,19-11,29) (Tabel 8).

Hieruit blijkt dat er een sterk verband is tussen beide factoren. Het bedrijfstype (of een eigenschap specifiek voor het bedrijfstype, zoals bijvoorbeeld de infectiedruk) was in de eerste analyse een “confounding variable” want het gevonden verband tussen het ventilatiesysteem en het al dan niet voorkomen van ademhalingsstoornissen is in realiteit niet aanwezig en wordt veroorzaakt door een bepaalde factor die gerelateerd is aan de bedrijfsgrootte. Eens men zich bewust is van het voorkomen van een “confounding variable” zal men deze mee registreren gedurende het onderzoek en mee analyseren, waar-

door de confounder dan een gewone risicofactor wordt.

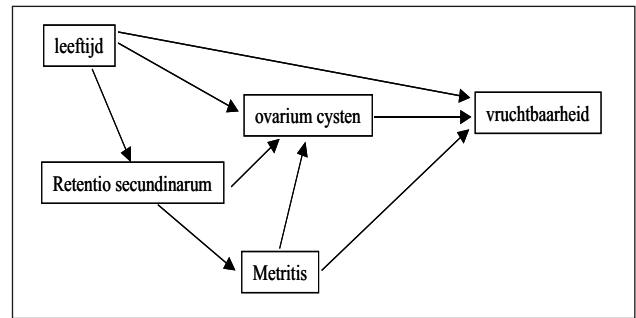
Er bestaan verschillende manieren om confounding te vermijden. Dit kan door ervoor te zorgen dat zowel de gevallen als de controles zoveel mogelijk met elkaar vergelijkbaar zijn (matching), zodanig dat versturende factoren in even grote mate in de twee groepen aanwezig zijn. De meest gebruikte methode bestaat er echter in zoveel mogelijk alle potentieel beïnvloedende factoren te meten en vervolgens met behulp van statistische analysetechnieken na te gaan welke factoren wel en welke geen invloed hebben op de ziekte.

MULTIVARIABELE ANALYSE

Het voorkomen van een ziekte wordt meestal beïnvloed door meerdere factoren. Vaak betreft het een complex samenspel van factoren die onderling ook met mekaar verbonden zijn. Dergelijke verbanden kunnen grafisch worden weergegeven met behulp van een "causaal web" waarbij alle verbanden tussen beïnvloedende factoren onderling en tussen beïnvloedende factoren en de ziekte worden weergegeven (Figuur 3).

In observationeel onderzoek wordt vaak het effect van verschillende risicofactoren op één bepaalde ziekte gelijktijdig onderzocht. Eén mogelijkheid om het effect van deze risicofactoren op de ziekte te kwantificeren is voor iedere risicofactor apart het verband te berekenen. Dit is een zogenaamde univariabele analyse aangezien het effect van slechts één variabele wordt geëvalueerd. Wanneer dit voor iedere geregistreerde risicofactor wordt gedaan, bekomt men een reeks van univariabele verbanden. Het is echter zeer vaak zo dat verschillende van de geregistreerde risicofactoren gecorreleerd zijn (niet onafhankelijk). Als gevolg hiervan kan een bepaald effect zowel door risicofactor A als door risicofactor B worden verklaard. In de univariabele analyse kan je dit effect niet opmerken.

Wanneer men het werkelijke effect van iedere risicofactor apart wil bekomen, is het noodzakelijk de verschillende factoren samen in één analyse te stoppen. Dit is een zogenaamde multivariabele analyse (Frankena en Graat, 1997). Hierbij wordt het effect van risicofactor A op de ziekte nagegaan, gecorrigeerd voor het effect van risicofactor B. Voor een dergelijke multivariabele analyse wordt vaak gebruik gemaakt van logistische regressiemodellen. Het grote voordeel van deze logistische regressie is dat de



Figuur 3. Een causaal web van enkele factoren die de vruchtbaarheid beïnvloeden bij runderen (Dohoo *et al.*, 2003).

uitkomst van de analyse wordt gegeven in termen van odds ratios.

Voorbeeld

In een onderzoek wordt gezocht naar de factoren die het voorkomen van hypocalcemie bij melkvee beïnvloeden. Hieruit blijkt dat, naast andere, melkproductie en pariteit significante risicofactoren zijn. Uiteraard zijn beide factoren ook gecorreleerd aangezien koeien met een hogere pariteit gemiddeld meer melk zullen geven (tot op een bepaalde leeftijd) dan jonge koeien. Wanneer beide factoren gezamenlijk in een logistisch regressiemodel worden gestopt dan zal het effect van melkproductie op de ontwikkeling van hypocalcemie bekomen worden onafhankelijk van de pariteit van de koeien. Omgekeerd zal ook het effect van pariteit bekomen worden onafhankelijk van de melkproductie.

CRITERIA VOOR CAUSAAL VERBAND

Wanneer een verband wordt aangetoond bij een goed uitgevoerde observationele studie blijft de vraag of het gevonden verband ook wel degelijk een oorzakelijk verband is. Gezien in observationeel onderzoek de onderzochte risicofactor niet at random is toegewezen aan een behandelings- en een controle-groep is het per definitie onmogelijk om met een bepaalde betrouwbaarheid uitspraken te doen over oorzakelijke (= causale) verbanden.

Desalniettemin is er een reeks criteria voorhanden die, indien eraan voldaan wordt, het bestaan van een oorzakelijk verband tussen een bepaalde risicofactor en een ziekte aannemelijk maken (Susser, 1986; Rothman, 1986). Het blijft echter zo dat zelfs wanneer aan alle volgende criteria wordt voldaan, er nog steeds geen causaal verband is bewezen. Het kan hoogstens worden verondersteld.

Ter illustratie zal ieder criterium geïllustreerd worden met het voorbeeld waarin een verband werd aangetoond tussen het voederen van vleesbeendermeel aan kalveren en het risico op BSE (cf. gevallencontrolestudie).

Opeenvolging in de tijd

Vooreerst is het duidelijk dat er een logische opeenvolging in de tijd moet zijn wat betreft oorzaak en gevolg. Een associatie gevonden in een cohortstudie is bijgevolg meer overtuigend aangezien gezonde dieren die blootgesteld worden aan een risicofactor vervolgens de ziekte krijgen, wat niet noodzakelijk het geval is bij de twee andere studietypes.

Voor de BSE-studie is de opeenvolging in de tijd niet zo duidelijk, gezien het vleesbeendermeel (VBM) verwerkt is in het krachtvoeder en het gedurende meerdere jaren wordt gevoederd.

Sterkte van de associatie

Als algemene regel kan ervan uitgegaan worden dat naarmate het gevonden verband sterker is, de kans groter wordt dat het ook een oorzakelijk verband is. De reden hiervoor is dat wanneer er een sterk verband wordt waargenomen de kans klein is dat dit enkel wordt veroorzaakt door een onbekende confounding factor.

In de BSE-studie was het voederen van VBM de risicofactor met het duidelijkste verband met kans op BSE. De OR was 4,74 (2,70-8,33), wat wijst op een duidelijk significant effect.

Biologische verklaarbaarheid

Wanneer een gevonden verband op een biologische manier kan verklaard worden, is dit uiteraard een goede aanwijzing dat het verband causaal is. Anderzijds is het echter niet steeds zo dat wanneer een gevonden verband niet onmiddellijk biologisch verklaard kan worden dit wil zeggen dat het verband niet causaal is. Het kan zijn dat de biologische verklaring gewoon nog niet gekend is op dat moment.

Voor BSE is de biologische verklaring dat prionen aanwezig in slachtafval of karkassen van BSE-geïnfecteerde dieren niet geneutraliseerd worden in het verwerkingsproces en aldus in het VBM terechtkomen. Dieren die met dit VBM worden gevoederd, kunnen via orale weg geïnfecteerd worden. Deze biologische verklaring was in 1991 (moment van de studie) nog niet volledig opgehelderd.

Coherentie

Wanneer de gevonden verbanden coherent zijn met kennis uit andere wetenschappelijke takken dan is dit ook een aanwijzing voor causaliteit.

Wanneer bijvoorbeeld gevonden wordt dat hoge stofconcentraties in varkensstallen leiden tot een verhoogde incidentie van chronische longontstekingen, dan is deze bevinding coherent met histologische bevindingen waaruit blijkt dat stof een nefaste invloed heeft op het trilhaarepitheel van bronchen en bronchiolen.

Dosisresponscurve

Wanneer een toenemend voorkomen van de risicofactor resulteert in een toename van het voorkomen van de ziekte is dit ook een aanduiding voor causaliteit. De afwezigheid van een dergelijke dosisresponscurve is evenwel geen bewijs voor de afwezigheid van causaliteit daar een ziekte vaak pas zal optreden als gevolg van een combinatie van factoren, en dan resulteert de toename van één van deze factoren bij afwezigheid van de tweede niet in een toename van het voorkomen van de ziekte.

Voor BSE is uit verdere studies gebleken dat dieren die een rantsoen kregen met een hoger aandeel VBM ook een hoger risico hadden op het ontwikkelen van BSE.

Herhaalbaarheid (consistentie)

Wanneer verschillende studies uitgevoerd op verschillende tijdstippen en onder verschillende omstandigheden, consistent hetzelfde resultaat opleveren, dan is dit ook een goede aanwijzing dat er een causaal verband aanwezig is. Herhaalbaarheid is een zeer belangrijk criterium omdat het ook de externe validiteit van de studie vergroot.

Voor BSE is herhaaldelijk en in verschillende landen aangetoond dat het voederen van VBM, afkomstig uit landen waar karkassen of slachtafval van BSE-geïnfecteerde dieren verwerkt werd tot VBM, het risico op BSE significant deed toenemen.

Experimenteel bewijs

Wanneer verbanden die worden gevonden in observationeel onderzoek, naderhand kunnen worden bevestigd in een klinische veldstudie (Maes *et al.*, 2005) is dit een sterke aanduiding voor een causaal verband.

In verschillende experimentele studies is gebleken (bij verschillende diersoorten) dat het voederen van met prionen gecontamineerd VBM de kans op BSE verhoogt.

Voorspellende waarde

Een goede voorspellende waarde houdt in dat het voorkomen van een bepaalde risicofactor in grote mate het voorkomen van een bepaalde ziekte kan voorspellen, onafhankelijk van het voorkomen van andere factoren. Anderzijds is het natuurlijk zo dat het niet is omdat de voorspellende waarde van een bepaalde risicofactor klein is, er dan ook geen causaal verband is. Vaak is het zo dat verschillende risicofactoren gezamenlijk moeten voorkomen (voldoende factoren; Laevens *et al.*, 2005) vooraleer er ziekte optreedt.

Naar aanleiding van de ontdekking dat het voederen van VBM aan runderen een belangrijke invloed heeft op het voorkomen van BSE, werd dit verboden. Het verbod heeft een duidelijke daling van de incidentie van BSE-gevallen tot gevolg gehad. Dit geeft dus aan dat het wegnemen van de risicofactor een goede voorspellende waarde had op de incidentie van BSE-gevallen.

BESLUIT

Als algemeen besluit kan worden gesteld dat observationeel, epidemiologisch onderzoek de methode bij uitstek is om in het veld op zoek te gaan naar mogelijke verbanden tussen ziekten en risicofactoren. Specifiek voor het observationeel onderzoek is dat het gebeurt onder natuurlijke omstandigheden. Dit heeft als groot voordeel dat de resultaten relatief goed extrapoleerbaar zijn naar de werkelijke situatie. Het heeft anderzijds als nadeel dat er zeer veel al dan niet belangrijke omgevingsfactoren aanwezig zijn die het resultaat van de studie kunnen beïnvloeden. Hierdoor moeten de resultaten van observationele studies steeds voorzichtig geïnterpreteerd worden en dienen zij voornamelijk om hypothesen te genereren. De resultaten van observationeel onderzoek kunnen nooit een causaal verband bewijzen.

DANKBETUIGING

De opmerkingen van Jef Laureyns en Mark Coryn hebben bijgedragen om deze tekst beter leesbaar en verstaanbaar te maken. Hartelijk dank!

REFERENTIES

- Dohoo I., Martin W. en Stryhn H. (2003) Introduction and causal concepts, Introduction to observational studies. In: I. Dohoo, W. Martin, H. Stryhn (eds.). *Veterinary Epidemiologic Research*. Prince Edward Island Canada, ACV Inc. pp 1-21 en 139-147.
- Frankena K. en Graat E.A.M. (1997) Multivariate analysis, logistic regression. In: J.P.T.M. Noordhuizen, K. Frankena, C.M. van der Hoofd, E.A.M. Graat (eds.). *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Press, pp 135-178.
- Laevens H., Boelaert F., Verloo D., Dewulf J., Maes D., Mintiens K. (2005). Inleiding tot de veterinaire epidemiologie: Historiek, doel, basisprincipes en interpretatie van epidemiologische informatie. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 74, 3-13.
- Laevens, H. (1999) Risk factors for the transmission of classical swine fever virus to herds in the close neighbourhood of an infected herd. In: *Epizootiology of classical swine fever: Experimental Infections Simulating Field Conditions, and Risk Factors for Virus Transmission in the Neighbourhood of an Infected Herd*. PhD thesis, Ghent, Ghent University. pp. 103 – 122.
- Maes D., Mintiens K., Laevens H., Boelaert F., Verloo D., Dewulf J. (2005). Gerandomiseerde klinische veldstudies in de veterinaire epidemiologie. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 74, 46-53.
- Martin S.W., Meek A.H. en Willeberg P. (1994) Disease Causation. In: S.W. Martin, A.H. Meek, P. Willeberg (eds.). *Veterinary epidemiology, principles and methods*. USA, Iowa state university press, pp 121-148.
- Pinchbeck G.L., Clegg P.D., Proudman C.J., Stirk A., Morgan K.L. en French N.P. (2004) Horse injuries and racing practices in National Hunt racehorses in the UK: the results of a prospective cohort study. *Veterinary Journal* 167, 45-52.
- Rothman, K.J. (1986) Causal inference in epidemiology. In: K.J. Rothman (editor). *Modern Epidemiology*. Boston USA, Little Brown and Company, pp 7-21.
- Susser, M. (1986) The logic of Sir Karl Popper and the practice of epidemiology. *American Journal of Epidemiology* 124, 711-718.
- Thrusfield (1995) Observational studies. In: M. Thrusfield (editor). *Veterinary Epidemiology*. Oxford UK, Blackwell Science, pp 220-255.
- Wilesmith J.W., Ryan J.B.M. en Hueston W.D. (1992) Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Research in Veterinary Science* 52, 325-331.