

第10章 结果的阐释

Lan A.Gardner和 Patricia C.Blanchard

兽医通过诊断试验评估单个猪和猪群的健康、生产性能和繁殖状况。尽管诊断可采用询问病史、体格检查和妊娠试验等多种形式，但最常用的是将样本送往实验室进行诊断。实验室诊断可用于：

- ①检测与疾病暴发有关的病原或毒素；
- ②估测单个猪的感染/接触状况；
- ③测定一畜群是否感染或接触病原，以及受其所影响的年龄段或生产群(亚群)；
- ④估计对病原产生抗体的猪群或猪的百分比；
- ⑤监测畜群对免疫接种的血清学反应；
- ⑥监测疾病控制及根除程序的进展和成效。

达到上述每一目的的最佳方法可能不同，根据需要的信息可选择不同的试验、样本数目和诊断策略。针对特定目的而进行的试验选择，一部分取决于送检样本的质量和类型，一部分决定于接受实验室或其它合作实验室是否有该项试验，也应考虑其它因素，如花费、速度和试验操作的易行性，但通常在最终选择中较少考虑可靠性(有时亦称精确性)。尽管开发者通常声称他们的试验具有高度敏感性和特异性，但许多用于猪病试验的可靠性评估并未公布。同样，实验室之间以及实验室内不同试验可复制性(可重复性)数据也无法得到。

尽管试验改良技术如抗体纯化、使用单克隆抗体代替多克隆抗体、使用选择培性培养基等，常能提高试验区分感染和非感染猪的能力，但很明显并非所有试验都很完美。

本章介绍合理使用试验以及解释其结果的原则，并提供试验策略的例子和合适样本的大小。随着快速血清学、细菌学和寄生虫学诊断试剂盒的应用、PCR、免疫组织化学和原位杂交技术的发展，实验室诊断日益发展，需要人们理解每一试验的诊断原则并认真评估其优点和弱点。在猪的传染病诊断中常用血清学试验，所以作者所举的例子往往与血清学试验有关。在已发表的文章中，有关试验

解释的问题常见于一般的动物(Gerstman 和 Cappuci, 1986; Tyler 和 Cullor, 1989)和食用动物(Martin, 1988; Monfort 和 Miller, 1990), 几乎没有特别针对猪病的文章。有关屠宰监测数据的阐述见第69章。

试验结果的变化

有些试验只有阳性或阴性结果(如细菌和病毒的分离), 而有些试验(包括许多血液学、临床化学和血清学试验)则产生定量结果, 而且在猪与猪间常有差异。

定量血清学试验结果有两种类型:

①如血清中和(SN, serum neutralization)等试验, 其典型的报道结果是确定的倍比稀释度或滴度;

②如酶联免疫吸附(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays)等试验, 其理论上的结果是许多不确定的光密度(吸收值或样本) 阳性(S/P, sample-to-positive)率。

定量血清试验结果的差异有两个来源:

①感染猪和非感染猪应答上的生物学差异;

②检测或化验体系固有的差异。

来源于动物的变化

对于感染猪, 血清学反应取决于感染的持续时间、感染病原体的剂量、属于亚临床还是临床性感染、疾病属于全身性还是局部性、其它并发感染以及包括年龄在内的宿主因素。对于病原已经被免疫系统清除的急性传染病, 在进行试验时, 以前感染过的猪可能不再被感染, 因此, 把感染猪称为“暴露过”的猪更为合适。而对于非感染猪, 接触交叉反应的病原体, 免疫接种或通过非特异性免疫刺激接种其它病原体, 都可能导致一些猪免疫应答增高, 并出现假阳性的血清学结果。

来源于实验室的变化

导致实验结果变化的实验室原因很多, 包括实验室的差异、技术人员的操作(如使用试剂)和实验结果阐述的差异(实验室和观察者的差异)以及同一人在不同时间的结果阐述差异(观察者自身差异)。通过比较8个欧洲实验室免疫过氧化物酶单层测定法(IPMA, immunoperoxidase monolayer assay)检测猪繁殖呼吸综合征(PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome)病毒, 发现其检测结果存

在差异，这就能够证实上述观点。造成差异的原因在于实验室之间的试验条件并非都是标准化的(Drew, 1995)。此外，实验错误(如样本混合、结果出入误差和样本交叉污染)也可能导致假阳性或假阴性结果。但是，大多数专业实验室有内外质量保证程序，能确保造成试验结果变化的实验室内部原因小于来源于动物本身的原因。在以下的例子中，由样本质量和兽医以及实验室操作引起的变化可以忽略。本章后面将介绍这些因素的作用。

敏感性和特异性

金标准试验

我们假定每头猪的感染或疾病状况可用所谓的金标准(即通常所说的诊断标准、确定性试验或参考试验)确定。金标准是可以正确无误地测定猪是否感染和发病的一种方法或多种方法的联合。许多疾病的真实状况，只有在尸检时才可确诊，而有些疾病则没有金标准。在许多病例中，由于花费、工作强度和疾病的侵袭力等原因导致这种完善的诊断方法在临床并不实用。所以，常常采用其它花费较少、较实用的折衷方法。对于一些疾病，例如，仔猪断奶后多系统衰竭综合症(PMWS, postweaning multisystemic wasting syndrome)，用金标准试验确定就比较困难，而用一个工作标准，例如，组织病理学作为实验室诊断。随着国际贸易的发展的需要，世界动物卫生组织(OIE, Office International des Epizooties)编写的《诊断试验和疫苗标准手册》

(www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm)记录的许多检测方法都考虑用金标准试验，尽管其中许多试验不具有良好的敏感性和特异性。

有时金标准代表的是一个综合的标准，只要一个或多个完全特异的试验出现阳性结果就可认为是阳性。Bager和Petersen(1991)比较了用于分离猪粪便中沙门氏菌的3种选择培养基。由于每一培养基能检测出另外两种培养基所不能检测出的某些沙门氏菌分离物，所以检测感染的金标准是这些方法中至少有一种是阳性培养。每种试验的阳性培养数用一种或多种方法验证的阳性样本数的百分比表示。检测了115种分离物，在R-V(Rappaport-Vassiliadis)肉汤培育24h后在亮绿琼脂上平板培养，结果检测到88%(101/115)的分离物，而在亚硒酸盐肉汤培养仅检测出51%(59/115)的分离物。

若用培养或抗原检测作为金标准来评价一个新的诊断方法，对阴性结果是否

有怀疑取决于所用的方法，以及是否有未发生感染的其它证据。通过使用大量组织或材料以及从同一猪的多个部位进行培养，可增加使用阳性结果作为标准的可信度。但是，有时这些改进可能是微不足道的。White等(1996)比较了检测感染 2~27个月伪狂犬病病毒潜伏感染后的血清学试验的敏感性。根据聚合酶链式反应(PCR, polymerase chain reaction)对三叉神经和扁桃体进行检测的阳性结果判定有51头猪感染。其中46头PCR检测三叉神经和扁桃体都呈阳性，4头三叉神经是阳性扁桃体呈阴性，1头扁桃体呈阳性三叉神经呈阴性。所以在那些区域调查确认PRV感染是必要的，扁桃体样本加三叉神经的检测结果可能没有多大实际意义。如果与其它标准的阴性结果结合考虑，那么可以大大增加把阴性培养结果作为标准的可信度。对于没有猪肺炎支原体感染的确定，从没有临床或病理感染证据的猪群中的猪所得到的阴性培养结果或许比从感染群或不知道状况的猪群中的猪所得到的阴性结果更合适标准。

对于病毒病，可用SN或其它血清学试验作为标准。与新血清试验进行比较，例如，Weigel等(1992)比较了两种ELISA和SN检测PRV (pseudorabies virus) 糖蛋白X抗体的性能，Lanza等(1993)比较了单克隆抗体俘获ELISA和SN血清学诊断传染性胃肠炎(TGE, transmissible gastroenteritis)。用一种血清学试验作为标准来评价另一新的血清学试验的敏感性和特异性时所遇到的问题是：若原来的血清学方法准确性不高，且两种血清学试验所得的结果不一致，则很难确定新的血清学试验是否更准确。许多作者包括Martin(1988)在内都建议只计量试验结果相一致的范围。如果新试验的结果与标准试验的结果很接近，则可根据在费用、速度和使用方便等方面考虑用新试验来代替。但是，关于新试验的敏感性和特异性问题仍有待解决。

统计学方法(Hui和Walter, 1980; Enøe等, 2000)不需要金标准试验，且给出了一种评价慢性疾病的方法，该方法具有灵敏性和特异性。这些方法被用来评价II型胸膜肺炎放线杆菌的血清学检测(Enøe等, 2001)、丹麦猪屠宰损伤检测的灵敏性和扁桃体猪瘟病毒检测(Bouma 等 2001)。

术语定义

从已知感染和非感染猪样本中得到的定量血清学试验如ELISA的结果，可表现为两重频率分布的图表(图10.1)。特别是试验结果超出预先测定阈值或临界值

的猪，可判为阳性，结果低于临界值的猪可判为阴性。相反，诸如颗粒凝集荧光免疫测定(PCFIA, particle concentration fluorescence immunoassay)和封闭性ELISA等一些试验，低试验值更说明有感染。

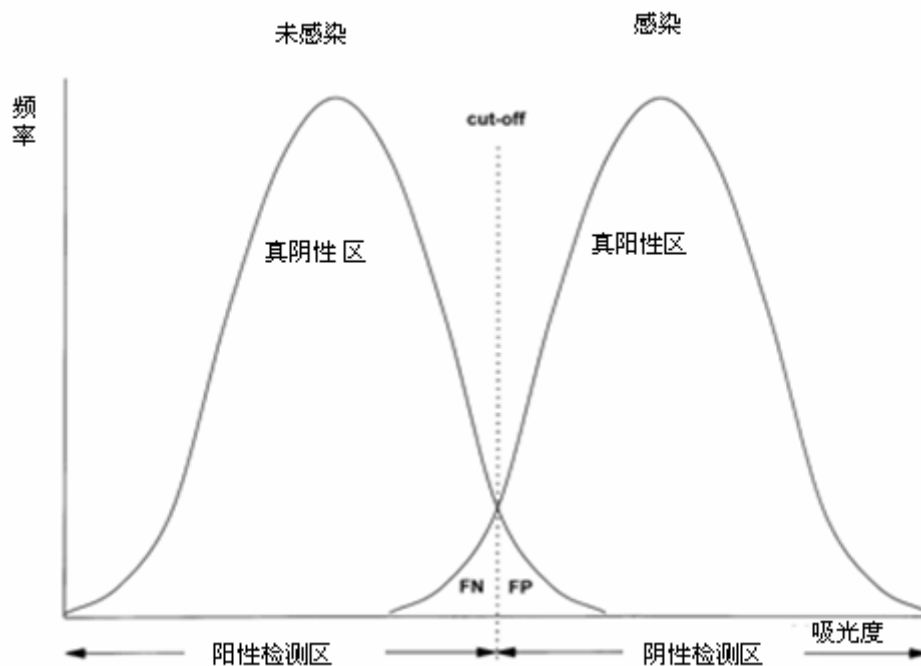


图10.1 非感染(左曲线)和感染(右曲线)猪ELISA结果频率分布。阳性结果光吸收值(光密度值)超出临界值。(FN=假阴性 FP=假阳性) 尽管频率值的描绘呈正态分布(高斯分布)，但这种分布常是斜的(非正态分布)。

由于感染和非感染猪试验结果重叠，因此临界值设置会导致一些猪感染状态的区分错误。试验结果可能出现四个互不包含的类别：真阳性(试验阳性且感染)、假阴性(试验阴性但已感染)、假阳性(试验阳性但没有感染)和真阴性(试验阴性且没有感染)。

敏感性 在诊断和流行病学上是指试验正确确定感染猪的概率。即真阳性/(真阳性+假阴性)，例如，具有80%敏感性的试验能正确确定平均80%感染猪为试验阳性，而不正确地把20%称为非感染猪，因为它们试验结果为阴性(假阴性)。诊断意义上的敏感性含义与分析意义上的敏感性不一样(Saah和Hoover，1997)。在后者，术语“敏感性”常可与试验的最低或较低检测界限相替换：即可检测到最小数量的细菌或DNA、毒素、抗体或残留。在单个猪的感染早期阶段，可能期望用一种更敏感的免疫学试验(ELISA与SN相比)来检测抗体，但当群内疾病已处

于中等到高度流行、猪已处于不同感染阶段时，猪群的诊断就不一定需要高敏感性的试验。这两种“敏感性”的比较见下面的例子。Blanchard等(1996)报道，PCR检测猪肺炎支原体的敏感性是每个试验须有400~5 000个菌体。若用于气管细支气管冲洗液，则PCR能正确检测101 /116的实验完全感染猪(诊断敏感性=87.1%)。

特异性 是指试验正确辨别出非感染猪的概率：即真阴性/(假阳性+真阴性)。具有90%特异性的试验能正确区分出平均90%的非感染阴性猪，错误地把10%的猪当作是感染的(假阳性)。分析意义上的定义是交叉反应情况（Saah和Hoover，1997），是指与呈现相似症状的疾病或病原出现交叉反应的可能性。交叉反应取决于检测试验开发者和研究者的临床和实验室的经验丰富与否。例如，确定8 PCR试验检测胸膜肺炎放线杆菌感染，若是慢性感染且检测的组织是扁桃体，就要考虑到与猪放线杆菌、少数放线杆菌、驹放线杆菌、林氏放线杆菌，豚放线杆菌以及两种常常能从扁桃体中分离到的链球菌和副猪嗜血杆菌发生交叉反应的情况（Fittipaldi等，2003）。

大多数试验情况都需要高敏感性和高特异性，但在单一试验中两者却很难同时具备。降低试验最小检测限如感染猪的细菌量、抗体浓度等，常可提高诊断敏感性。但是这一改变可能会降低试验的特异性。购猪者以及州或国家的进口管理部门通常要求试验的敏感性接近100%以减少引进新病原的危险。同样涉及公共卫生方面的病原检测试验也有这样要求，例如，沙门氏菌、旋毛虫和抗生素残留的检测。特别是种猪饲养者需要高特异性试验以扩大他们销售后备公猪和小母猪的机会。欲根据试验进行疾病消灭程序和屠宰猪的商业厂家也期望有高特异性，对他们而言由于假阳性结果带来的经济损失可能是巨大的。

使用多种特异性不强的试验后果之一是增加了其它健康无暴露猪出现异常结果的机会。当增加独立试验的数目时，至少会增加一个异常结果出现的概率。例如，当对一母猪进行10种不相关的细菌和病毒感染的筛检，如果动物从没真正接触过任何病原(兽医不知情)，且每一试验均有95%的特异性，则所有10个试验呈阴性的概率为 0.95^{10} 或60%，因此至少有一种试验产生阳性结果的概率下降为40%。

敏感性和特异性评估

敏感性和特异性是由试验研究和田间研究决定的，尽管当对传染性疾病的试

验研究用于田间时通常会过高估计该试验的敏感性和特异性。试验研究的一个优点是比较好明确地确定猪的感染状态，以及随后出现的相关暂时性血清学应答。根据这些资料数据可测得特定滴定值出现的时间以及高于阳性临界值的持续时间。Sørensen等(1997)通过气溶胶对200只SPF猪进行猪肺炎霉形体攻毒，检测临床症状、血清学和病理学变化，同时用微生物培养、荧光免疫检测法、抗原ELISA检测和PCR检测方法检测肺中抗原，进行灵敏性和特异性比较。由于经费限制，试验研究主要局限于潜伏期较短的传染病。由于选择的实验条件是主观的，因此试验研究的局限性主要是它与田间研究相似性很低甚至无任何相似之处。试验研究中，选择的病毒剂量必须确保大多数猪(如果不是所有的猪)发生临床疾病。然而，许多试验在田间应用时是检测猪群的亚临床疾病，由于受不适环境和并发感染的影响，猪只的免疫系统往往产生不同的反应。在实验研究中，非感染猪群对照组通常是健康的或限菌的，但若在田间采用此试验，非感染猪则往往是那些由试验检测范围以外的病原引起临床症状的猪。例如，在评估免疫色谱试验检测A群轮状病毒的特异性时，所取样本来自由其它病原(如大肠杆菌)引起新生仔猪腹泻的猪以及健康无轮状病毒的猪(Klingenberg和Esfandiari, 1996)。

甚至在用实验感染初步评估一种试验时，仍需对取自商品猪中有代表性的感染和非感染的猪(年龄、临床状况、感染阶段等)的样本进行分析，以保证试验操作在田间亦适用。试验结果应与金标准在全盲方式下进行比较，以防导入偏差，并计算出它们的敏感性、特异性以及各自的置信区间。与这些值有关的样本越大，敏感性和特异性估计值越精确，这可从置信区间更窄中得到反映。对检测评价研究的流行病学评估在其它文献中也有描述(Greiner和Gardner, 2000)。

实例 Dubey等(1995)评估了猪弓形虫病的5个诊断试验的敏感性和特异性。金标准是通过收集母猪屠宰后的心肌组织进行猫或鼠的生物试验，而后分离存活的弓形虫。样本产生阳性生物试验结果($n=170$)的母猪认为是感染的。样本产生阴性生物试验结果($n=830$)的母猪认为是非感染的。尽管本文没有报道感染和非感染母猪滴度值的频率，但我们给出了结果与公布资料一致的改良凝集试验(MAT, modified agglutination test)的两个假定频率分布。表10.1和图10.2说明感染猪和非感染猪的结果在广泛的滴度范围(1:20到1:800)内重叠。

在研究中，若滴度 $\geq 1:20$ 则MAT结果可判为阳性，反之则判为阴性。分类结

果可绘制成2×2交叉图表并计算出特异性、敏感性和置信区间(见表10.2)。置信区间的计算方法在它处介绍(Fleiss, 1981)。如果选择有100%特异性的临界值用于血清学诊断, 则MAT临界值要增至1:1280。但是, 在临界值1280处仅有29/170的感染母猪(敏感性=17.1%)可被正确鉴别。估计值的这些变化说明敏感性和特异性之间的协调关系与定量试验临界值的改变密切相关。将临界点换为较低的值, 通常会增加敏感性, 但却降低了试验的特异性, 反之亦然。本例中, 无法确定完全敏感的临界值。因感染和非感染猪在试验最低筛选稀释度(1:20)呈阴性结果。作者讨论了这种金标准的局限, 并指出由于刚弟弓形虫还存在于心肌以外的其它组织, 或实际存在的刚弟弓形虫没能从接种的动物分离到, 因此可能发生假阴性生物试验。同样, 如果经生物试验判定为非感染的一些试验阴性猪确实存在感染, 则可能低估了MAT的特异性。

表10.1 170头感染和830头非感染母猪的刚弟弓形虫改良凝集试验滴度

滴度	感染(n=170)	非感染(n=830)
<20	29	749
20/40	25	31
80	25	25
200	20	12
320/400	21	10
800	21	3
1 280/4 000	23	0
≥8 000	6	0

出处：摘自Dubey等, 1995。

图10.1 以表10.2(Dubey等, 1995)为基础的感染和非感染猪刚弟弓形虫改良凝集试验频率分布

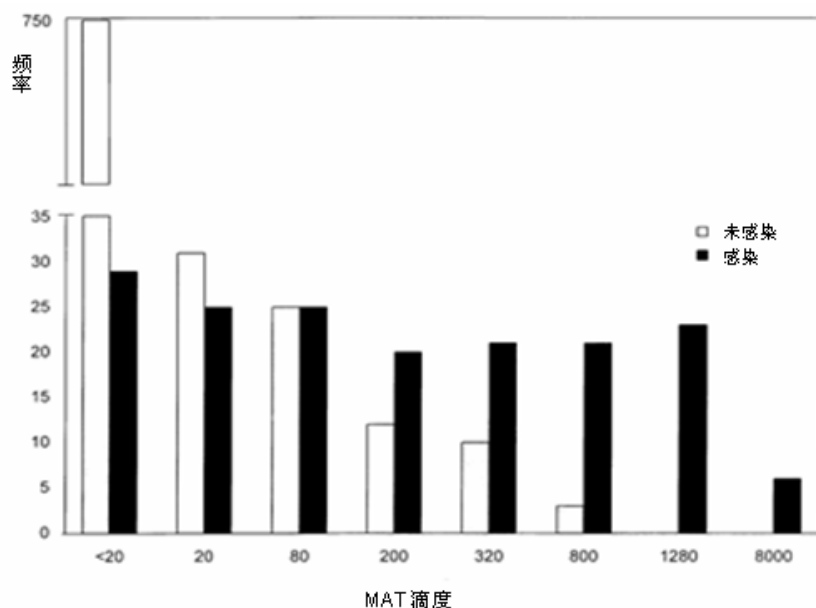


表10.2 改良凝集试验（MAT）结果假设频率分布2×2

感染状况	
+	-
MAT 结果	+
+	141
-	29
	170
	830

敏感性= $141/170=0.829$ (95%置信区间, 0.804-0.852)

特异性= $749/830=0.902$ (95%置信区间, 0.881-0.919)

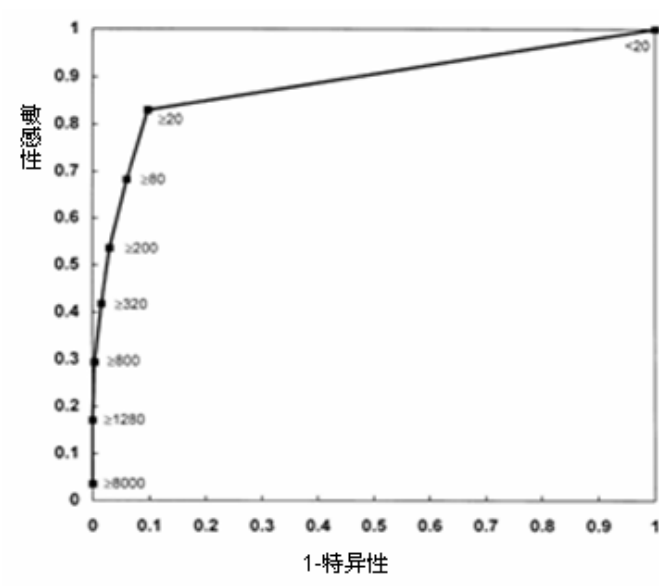
各种试验临界值评价

敏感性和特异性有益于测定试验的诊断限度和比较两个以上试验的可靠性。因为一个定量试验可能有许多临界点,所以在临界值范围内比较试验常比单一值的比较更合适。敏感性和特异性的转折点在临界值改变时可用图形表示为接受操作特征(ROC, receiver-operating characteristic)曲线(Sweig和Campbell 1993, Greiner等2000)。ROC曲线是试验所有可能临界值的敏感性(y轴)对特异性或1-特异性(x轴)的图形,在人医作为定量试验操作的方法已得到广泛承认,但兽医上却受到限制, Nodelijk等(1996)曾用ROC曲线来说明一商品ELISA检测PRRS病毒的准确性, Elbers等(2002; 2003)用ROC曲线分析评价在荷兰1997—1998年猪瘟流行期间用临床症状、尸体剖检大体病变监测猪瘟爆发。

使用表10.1刚第弓形虫MAT数据, 所有敏感性和特异性对在临界点(从1:20

到 $\geq 1:8000$)的值都可计算,并可做出ROC曲线(见图10.3)。曲线下至右边的区域(AUC, area under the curve),表示随机选择感染母猪得到的MAT结果大于随机选择非感染的MAT结果的概率。最靠近图形左上角的临界值($\geq 1:20$)是可最大限度减少错判(假阴性和假阳性)数目的点,但正如后面章节所说的,其它因素在选择临界值时也很重要。

图10.3 依据表2.2(Dubey等, 1995)的资料绘制刚弟弓形虫改良凝集试验的接受操作特征曲线



试验临界值的选择

选择试验临界值应考虑几个因素,包括试验目的(如是筛检还是确诊)、假阴性和假阳性的诊断结果所引起的相关费用(经济的、社会的或政治的)、是否有高特异性的确诊试验和疾病流行情况

(Greiner等2000)。事实上,由于试验的环境和误判的后果(假阳性结果的费用与假阴性结果费用相比较)不同,可以选择多种临界值。为了简便,许多诊断实验室仅在一个临界值处报告ELISA和其它试验结果是阳性还是阴性。这种方法有两点缺陷:第一,若临界值由实验室或试剂盒生产商确定,且结果只报道为阳性或阴性,则兽医所得的信息不全。若ELISA S/P比值或滴度值远远超出用于试验阐释的临界值,与接近临界值的试验结果相比兽医往往更相信真的已被感染。在刚弟弓形虫例子中,1:800 MAT滴度比1:20滴度值(见表10.1)更有可能来自感染母猪;第二,实验室通常选择能最大限度地减少误差总数的临界值,包括假阳性和假阴性,但并未考虑到两类误诊所带来的不同费用。在某些情况下。假阳性诊断所造成的损失要比假阴性诊断大得多,反之亦然。例如,依靠试验结果决定淘汰母猪的兽医可能想用高特异性的试验以减少假阳性诊断的机会,尤其当母猪无感染症状、处于怀孕状态,而且无其它淘汰原因时更是如此;另一方面,在对购入的种猪进行筛检时,假阳性结果给顾客带来的损害要比假阴性小得多,这是因

为假阴性可能导致感染猪进入非感染猪群。理想情况下，兽医需要根据这些信息选择在特定时间最符合他们要求的临界值。

解决在何处设定个体猪诊断的临界值这一难题的可能方法是特定两个临界值——一个值是100%的敏感性(无假阴性)，另一个值为100%特异性(无假阳性)。这两个值所限定的中间范围为假阳性和假阴性的分布范围。采用此方法，若结果比100%敏感性的临界值低，则为阴性，若比100%特异性的临界值大，则为阳性，若介于两者之间，则怀疑感染或难以判定。如有需要，可疑或难以判定的病例可用其它试验进一步鉴定。

评价已公布的敏感性和特异性的值

尽管可以从试剂盒说明书、工业出版物或实验室诊断人员中获取有关试验敏感性和特异性的资料，但是无论何时兽医文献总是最可靠的资料来源。除此之外，兽医应考虑与试验的可靠性及使用方法有关的几个问题：

1. 进行试验评价的田间条件是否与试验即将应用的条件相似？
2. 是否按照“金标准”以“盲测”方式进行过试验结果的评价？
3. 是否根据现有的技术选择合适的阳性或阴性金标准？
4. 在研究中，为确保敏感性和特异性估计值是精确的，是否有足够数量的感染和非感染猪？如有可能，在可靠性研究中必须至少用50头感染猪和50头非感染猪。
5. 选择特定临界值的原因？是否在其它临界值处报告过敏感性和特异性估计值？
6. 试验是否可用于个体或群体诊断？若进行了足够的试验，则个体水平有从低到中等敏感性的试验可能完全适用于群体诊断。
7. 试验是单独应用还是与其它试验联合应用？若联合应用，多种试验的结果如何解释？

若有报告声称某种试验具有比其它试验更高的敏感性或特异性，则这些报告必须以重复样本试验和合适的统计分析为依据。若对试验的评价较为接近，则通常表明试验之间的敏感性和特异性的数量差异较小，在统计学上不显著或无实际重要性，在这种情况下，其它条件如费用、易行性、快速等在试验选择中显得更

为重要。

预测值

敏感性及特异性是衡量试验有效性的标准，其主要优点在于它们不依赖于流行率，因此可专门用于兽医文献中报告试验性能。然而，就田间试验而言，由于试验的诊断值随试验的固有精度以及试验环境而变化，因此这些衡量标准就存在着一些缺陷。要对某头猪的感染状态做出绝对的鉴定往往不现实或者在经济上不合算，因而兽医必须估计感染或非感染的概率对试验结果的影响。这些概率就是阳性或阴性试验结果的预测值。阳性预测值(PPV, Positive predictive value) 是指实际感染的试验阳性猪的比例，而阴性预测值 (NPV, negative predictive value) 则是指实际无感染的试验阴性猪的比例。

预测值与敏感性/特异性的差别也许起初并不明显。当疾病的状况已知时，敏感性和精确性提供了对试验准确性的估计，而预测值则是在试验结果已知的情况下，对试验准确性的估计。

预测值(有时亦称为试验后或后期的概率)取决于敏感性、特异性和流行率，可根据Bayes的理论方程计算。

$$PPV = (\text{敏感性} \times \text{流行率}) / [\text{敏感性} \times \text{流行率} + (1 - \text{特异性}) \times (1 - \text{流行率})]$$

$$NPV = [\text{特异性} \times (1 - \text{流行率})] / [\text{特异性} \times (1 - \text{流行率}) + (1 - \text{敏感性}) \times \text{流行率}]$$

流行率对预测值的影响

在临床上，“流行率”的含义是在试验进行之前对疾病发生概率的最佳估计。流行率与“预试验”或“早期的”概率同义。只要有可能，对流行率的估计应基于以往积累的资料，如出现相似症状的所有病例的条件出现的频率、畜群以前的试验结果或位于相同地理区域、群体大小相似的畜群的试验结果。若缺少以前的资料，可参考下列流行率作为计算预测值合理的起始值。

1% 带有某种常见疾病的危险因素，但未表现出临床症状或无传染病史的猪群。

10% 若某种疾病正常情况下不发生，仅仅在临床上有发病的可能性，而且兽医希望将其排除。

50% 尽管在大体上无法确诊，但畜群的临床表现与某种疾病吻合。

90% 若疾病在临床上很可能发生，或猪群曾有感染历史，但兽医希望用诊断试

验排除该病。

若要“排除”某种疾病，必须使用高度敏感的试验以获得阴性结果，这可在诊断性的病情检查初期进行以减少鉴别表中的可能性数目。若要“考虑”或进一步确定某一诊断，其阳性结果必须通过近乎完全特异的试验得到。通常，当兽医认为某种疾病不可能发生(流行率=10%) 或者非常肯定疾病存在时(流行率=90%)，试验结果一般对诊断的影响不大(Martin, 1988)。而当兽医无法确定感染状况时(如感染率和非感染率相等，即相当于50%的流行率)，实验室的试验则具有很大的诊断价值。

流行率对预测值的影响可通过改良凝集试验(敏感性=82.9%，特异性=90.2%)在两个猪群进行刚第弓形虫的试验性能来说明。两群猪中一群的感染流行率为20%，这与Dubey等 1995年报道的流行率相似。而另一猪群由于能够有效地控制刚第弓形虫的感染，因而总的流行率为1%(见表10.3)，在流行率为20%时，67.9%的阳性预测值表明大约1/3的阳性试验结果是假性的。同时，其阴性预测值大约是95%，这表明感染猪在试验中被诊断为阴性(1- 阴性预测值)的概率为5%。在1%的流行率水平上进行的同一试验中，阳性预测值降至15%以下，而阴性预测值几乎达到100%。

表10.3 刚第弓形虫的改良凝集试验(MAT)性能

(敏感性=82.9%，特异性=90.2%)

流行率=20%(假定群体大小为 10 000)

		感染状态		
		+	-	
MAT 结果	+	1658	784	2442
	-	342	7216	7558
		2000	8000	10,000

流行率=2 000/10 000=0.2

阳性预测值=1 658/2 442=0.679

阴性预测值=7 216/7 558=0.955

流行率=1%(假定群体大小为 10 000)

		感染状态		
		+	-	
MAT 结果	+	97	554	651
	-	3	9346	9349
		100	9900	10000

流行率=100/10 000=0.01

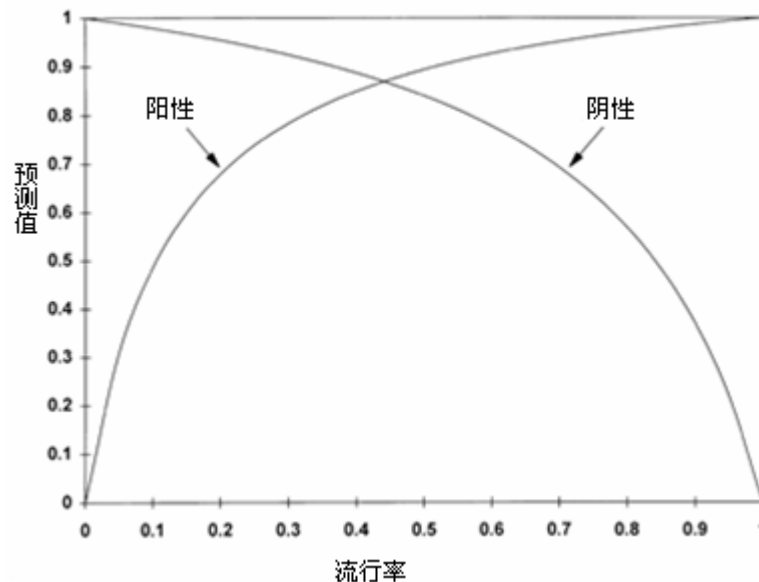
阳性预测值=97/651=0.149

预测值曲线

我们往往不可能准确了解流行率的真实值，而一定范围内的值却是可知的。通过绘制预测值曲线，可以知道试验在不同情况下的性能。就中等的流行率(30%~70%)而言，包括MAT(见图10.4)在内的大多数试验，无论其结果为阴性还是阳性，都可以良好地进行。当流行率升至70 %以上时，阳性预测值向100%增长，与此同时阴性预测值下降，而当流行率向0%下降时，阳性预测值下降，阴性预测值上升（见图10.5）。

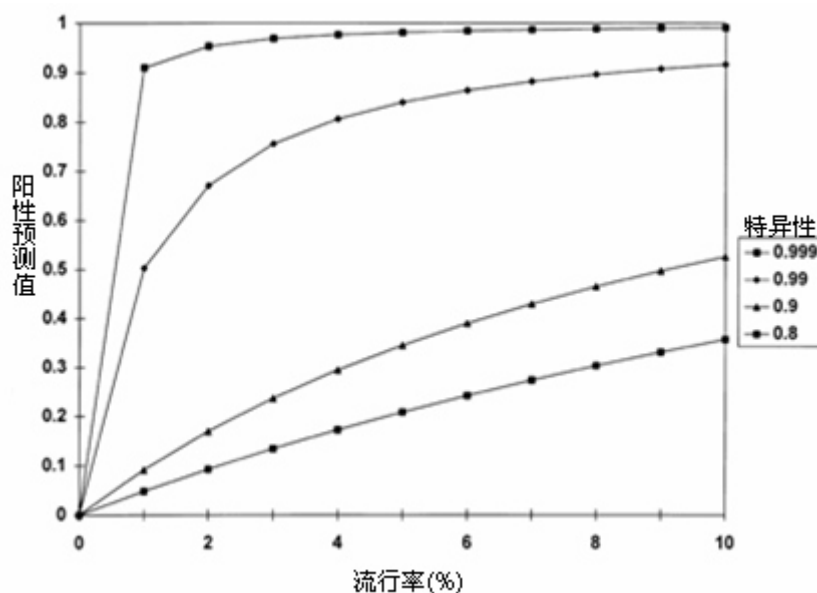
图10.4 刚地弓形虫改良凝集试验的预测值曲线

(敏感性=82.9% 特异性=90.2%)



在少数实验情况下，试验的特异性是阳性预测值最重要的决定因素。当流行率为固定值时若特异性增高，则阳性预测值增大。在感染很少的情况下，只有当试验的特异性接近100%时，才能避免阳性预测值偏低的问题。

图10.5 当敏感性等于100%、流行率为0~10%之时，实验室试验的特异性对阳性试验预测值的影响



实际含义

这些相关关系的含义可总结如下：假设给定某一试验的敏感性和特异性，对一个无临床症状与感染病史的畜群来说，对其阳性结果的解释应不同于来自地方性流行和临床疾病普遍发生的畜群。但是必须重视的是一个阳性试验结果的临床帮助和价值不是由阳性预测值(实验后的概率)而是由试验所产生的概率或确诊的变化来衡量的。例如，发生于某畜群的某一临床疾病与猪流行性感冒或繁殖呼吸综合征相吻合，而且该畜群以前并无这两种疾病感染的病史，但是在调查研究时发现两种感染在其它猪群中普遍存在。兽医可以认为试验前两种感染发生的概率各为50%。若使用完全特异的试验分离到繁殖呼吸综合征病毒，则试验后PRRS感染的概率为100%(试验前后概率增加50%)。然而，若畜群有同样的感染发生或者最近有PRRS感染的病史，则试验前的概率可能会更高，也许是80%；尽管试验后PRRS感染的概率仍为100%，但是试验前后概率的必然增加值(20%)要小得多。因此，在第二种情况下，实验室的试验值会小于第一种情况，因为第一种情况诊断的不确定性更大。同样，可用相似的推理来估计阴性试验结果在实验前后的必然增加值。

多种试验的应用及其阐释

为了提高试验的精确性，可重复试验或在诊断工作中进行附加试验。事实上，大多数诊断是建立在运用多种试验(如病史、体格检查、实验室试验等)基础之上的。多种试验可以同时或依次使用，试验结果可以系列或平行解释。一个试验组

合的灵敏性和特异性不同于单个试验的灵敏性与特异性的值。解释平行的试验组合时往往产生比任何单独试验更高的敏感性，而在解释系列的试验组合时则导致比任何单个试验更高的特异性。有时由于试验结果对感染猪或非感染猪有相关性（也称依赖性），试验组合的敏感性和特异性变化小于理论上的预测（Gardner等，2000）。在检测同一类抗体的血清学试验时，相关的结果可能是常见的，但在测量不同生物学反应的两个试验之间(例如，组织病理学和血清学试验)，出现这种相关结果的可能性很小。

平行和系列解释

当同时使用两种试验时，可能出现下列四种结果之一：两种试验均为阳性；实验1为阳性，实验2为阴性；实验1为阴性，实验2为阳性；两种试验均为阴性。在解释平行的结果时，只要某只猪对任意一种试验表现为阳性反应，则这头猪即可被认为是阳性，这种解释增大了试验组合的敏感性，但是有减小试验组合特异性的倾向。当两种试验均无特别高的敏感性，而且两种试验分别检测不同类型的疾病(如早期和晚期感染，急性感染和慢性感染)时，采用这种平行试验策略则具有很好的效果。在感染过程的早期，病原的培养可能比血清学试验更敏感，而在感染的后期，由于病原体数量减少，后者可能更为敏感。因此，尽管试验组合的特异性会低于单独使用培养试验，但病原培养和血清学的平行试验可以产生更高的敏感性。

解释系列试验的结果时，只有两种试验均为阳性反应，这头猪才可以被认为是阳性；这种增加特异性的方法是以降低敏感性为代价的。使用系列的两种试验可按下述方法做出诊断。第一种试验具有高敏感性而且费用低廉，而后试验阳性猪再用高特异性的第二种试验确定假阳性。为了节省试验费用，第一次试验的阴性猪可以认为是阴性的，不必进行第二次试验。尽管系列试验往往需要更多的时间，但运用这种试验策略有利于兽医以较少的试验来排除疾病。若两种试验均为阳性，则第一次试验后的阳性预测值可以认为与进行第二次试验前的流行率相等，从而计算出发病概率。以刚第弓形虫的MAT试验为例，当用于试验的畜群的流行率为20%时，其阳性预测值为67.9%。若再对MAT阳性的猪群进行一个附加试验，如采用敏感性为45.9%、特异性为96.9%(Dubey等，1995)的乳胶凝集试验(LAT)，则67.9%即成为进行LAT试验前的新的流行率。将这些数值代入Bayes

的理论方程中，即可计算出第二次试验的阳性预测值为96.9%。由此可以推断MAT和LAT的结果是不相关的。因此，同时使用MAT和LAT试验所得到的阳性结果比单独使用MAT试验更能作为感染的指标。

试验策略的选择

如果有两种试验可供使用，那么兽医可以决定使用一种或者两种试验来建立诊断，选择后者会增加畜主的开支。如果两种试验均被使用，那么可以根据对敏感性和特异性的不同需要来选择平行或系列解释。多种血清学方法的优点要小于人们预期的效果，这一点我们以布鲁氏杆菌病为例进一步解释。在最终选择一个试验方案时，需要考虑的因素包括：单个试验的敏感性和特异性；在进行平行解释或系列解释时，试验组合的敏感性和特异性；诊断为假阳性和假阴性的花费；感染的流行率以及增加试验所造成的额外开支。

实例 Ferris等人(1995)以从多个淋巴结中分离出布鲁氏杆菌的细菌培养结果作为金标准，在231头猪中对布氏杆菌六种血清学试验的敏感性和特异性进行了评价。敏感性的分布范围是57%(自动补体结合试验)到85%(阻断值为0.81的颗粒浓缩荧光免疫测定法 [PCFIA])特异性的分布范围为62%(标准管试验 [STT, standard tube test])到95%(竞争试验)。PCFIA和STT 的敏感性分别为85%和83%，特异性分别为74%和62%。当平行解释PCFIA和STT的结果时(任何一个试验为阳性时，即认为是阳性)组合试验的敏感性为87%，特异性为54%。在平行解释时，同时使用两种试验的敏感性可以比两种试验中敏感性较高的一个试验提高2%，而特异性却比较低的一个试验降低8%。假设这两种试验的结果不相关，组合试验的敏感性在理论上是98%，特异性是46%。对于理论值和观察值之间的差异，最可能的解释是试验结果是相关的。在此情况下，同时使用PCFIA和STT会增加诊断费用，而获得的信息却很少。实际上，即使同时考虑另外四种试验结果并对其进行平行解释，试验组合的敏感性并没有太大的增加(使用一种或更多的试验，测得的阳性结果分别为40/46)。

试验结果的畜群水平分析

通常健康评价是针对群体单位(群、栏、窝或其它形式的群体)而言的，而不是个体猪。一个尚未被人们广泛认识的要点是：对畜群水平的试验解释必须不同于个体试验，尤其是当试验并非完全特异时，对畜群试验的解释往往更为复杂。

畜群感染状况

在制定无特定病原体(SPF, specific pathogen free)或其它健康标准的方案、估计买猪过程中引入疾病的风险、以及在研究疾病的危险因素时,就一种或多种病原对群体状况进行正确分类是很重要的。与个体的试验解释情形相似,用于确定群体状况的试验同样需要有关畜群水平试验敏感性和特异性的资料。大多数试验的可靠性研究是通过评价个体的反应而后再推测出畜群的资料。用于猪病诊断的试验涉及畜群水平性能的资料很少,但是最近Sørensen等(1992、1993、1996)在丹麦SPF方案中报道了猪肺炎支原体和胸膜肺炎放线杆菌的这方面资料。

畜群的敏感性和特异性 畜群水平的敏感性是指一个感染的畜群产生阳性试验结果的概率,而畜群水平的特异性则是指一个非感染畜群产生阴性试验结果的概率。假阴性率和假阳性率可以分别通过1-畜群敏感性或特异性计算得到。群体水平的敏感性和特异性不仅取决于它们个体水平的敏感性和特异性,而且还受到其它因素的影响,诸如:试验群体的数目、感染畜群的感染流行率以及用于阳性畜群分类的阳性数目(1, 2, 3等)(Martin等, 1992; Christensen和Gardner, 2000)。通常,个体和群体水平的估计值是不同的。基于200只SPF猪感染试验的结果

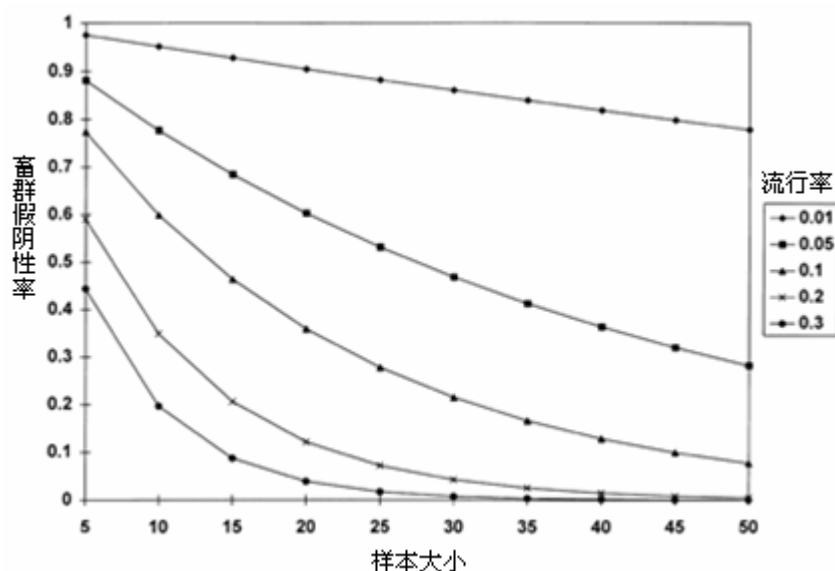
(Sørensen 等, 1997),对于猪肺炎支原体的阻断E LISA试验,在50%阻断临界值时其个体的敏感性和特异性分别为100%和100%。当抽取20头猪做畜群诊断的样本且阳性群体试验至少包括一头阳性猪时,群体水平的敏感性和特异性分别为93%和96%(Sørensen等, 1992)。因为在实验过程中仅发现15例新感染病例,所以畜群的敏感性的特异性分别为100%和100%。当抽取20头猪做畜群诊断的样本且阳性群体试验至少包括一头阳性猪时,群体水平的敏感性和特异性分别为93%和96%(Sørensen等, 1992)。因为在实验过程中仅发现15例新感染病例,所以畜群的敏感性评估是不严密的,进行重复实验其结果相似(Sørensen等, 1993)。

影响群体水平敏感性和特异性的因素之间的某些重要关系需要在此进一步说明。第一,当试验样本的数目增大时,群体水平的敏感性随之增高。因此无论畜群流行率为何值,畜群诊断结果为假阴性的概率随样本数目的增大而减小。假定已知某群体的流行率为中等而不是过小(如图10.6所示30%和1%),以敏感性为50%的完全特异的试验进行畜群诊断,当样本数目由10增至20时,畜群的假阳性率大大降低。第二,当用于阳性群体分类的猪只数目增大时,群体水平的特异性

相应增大而群体水平的敏感性则降低。例如，在群体大小为20的样本中，当试验阳性猪的数目由至少为1变化到至少为2时可导致猪肺炎支原体的群体敏感性从100%降至69%，而群体的特异性则从85%增至98%(Sørensen等，1993)。第三，当对一个数目固定的样本进行试验时，随着群体内流行率的增大，很容易区分感染畜群和非感染畜群(见图10.6)。第四，在特异性不高的试验中，当试验猪的数目增大时，能够检测出至少1头假阳性猪的概率随之增大，而群体水平的特异性则降低(见图10.7)。这种结果与使用多种特异性不高的实验来评价单个猪的暴露状态的结果相同。检测群体性样本比单个样本更有利于畜群诊断（例如，培养群体排泄物以获得沙门氏菌种类分布谱；Christensen等，2002）。影响畜群整体检测灵敏性和特异性的因素在其它文献也有描述（Christensen和Garder，2000）。

在权衡群体敏感性和群体特异性之间的取舍方面需要考虑的问题已经在个体试验解释中说明。就SPF规划而言，群体水平的敏感性比群体水平的特异性更为重要，因为在某些畜群，未检测出感染的后果常常超过假阳性诊断。

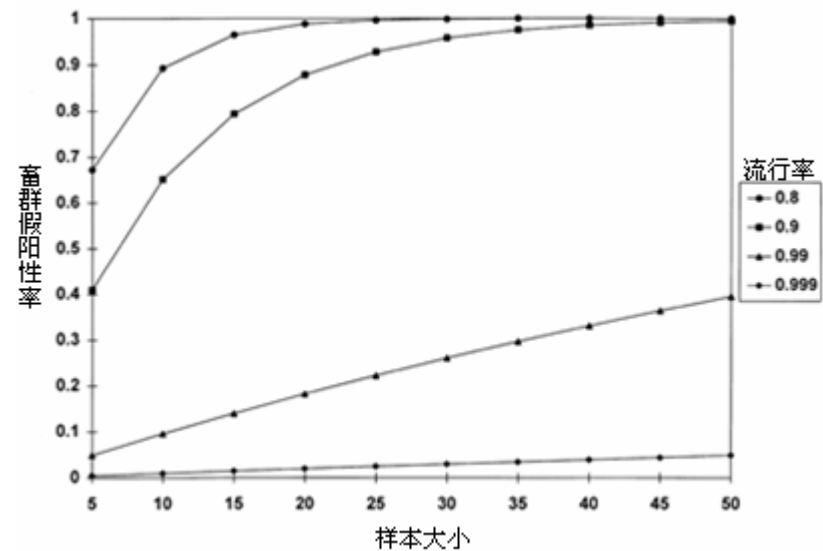
图10.6 进行个体水平敏感性为50%，特异性为100%的诊断试验时样本大小和群体内流行率对畜群假阴性率的影响



群体水平的预测值 与个体试验的预测值类似，群体水平的预测值依赖于群体特异性、敏感性以及感染畜群的流行率。在此意义上，感染畜群的流行率是指群体试验前对一个畜群感染率的最佳估测。尽管此类估计资料可以从州或全国普查中获得，但是建立在兽医对畜群感染检查基础上的区域性资料更为适用。在丹

麦，每年有10%~15%的SPF猪群重复感染猪肺炎支原体。据Sørensen等人(1996)报道，当每月抽样检查大小为20头猪的单个样本时，假定感染畜群的流行率可能是1%，那么根据Bayes的理论，敏感性和特异性的估计值分别为93%和96%，群体水平的阳性和阴性预测值分别是19%和99.9%。

图10.7 样本大小和实验室试验的特异性对群体假阳性率的影响



这些计算结果表明：按照金标准诊断，只能证实1/5的群体感染，而一个阴性群体试验 则可以有力地证明无猪肺炎支原体感染。

由于许多个体试验缺乏相关的敏感性和特异性的资料，因此通常无法了解群体水平的敏感性、特异性及预测值。这就往往要求兽医通过了解有关个体试验的不完全知识来解释群体结果。在确定畜群的感染状态时，要同时考虑阳性猪的数目及感染的近似流行率(0~100%试验阳性猪)。若阳性率较高，则群体的暴露状态已很清楚。但是若试验群体的近似流行率较低时（例如<20%），会出现何种检测结果呢?在这种情况下，仅特异性一项即有助于判断畜群的感染状态。这个问题具有重要的实际意义，因为实验室的试验是很难从“干净”的畜群中区分出低(而不是高)流行率的感染群体。

实例 某未经免疫的繁殖群有100头母猪，用补体结合试验(CFT, complement fixation test)检测血清2型胸膜肺炎放线杆菌(AP2, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2)，结果检测出5头试验阳性母猪(即血清流行率为5%)，对该繁殖群的AP2状态我们可以做出何种结论呢?如果不了解试验特性，又缺乏详细的群体病史，一种方法很可能是扑杀试验阳性母猪。培养肺、扁桃体、

鼻腔以及其它合适的组织以鉴定是否有AP2的存在，阳性培养结果可以证实感染，但阴性的培养结果并不能完全排除感染，因为培养方法的敏感性并不很高。最近,各种PCR化验已经显示出比标准的扁桃体组织（活组织检查和屠宰后整体扁桃腺）分离方法有更高灵敏性，能够作为一种诊断手段以评估血清学阳性母猪的微生物状态（Fittipaldi等，2003）。

然而，如果能获得有关CFT特异性的资料就可以做出更加合理的判断，避免对母猪不必要的扑杀和培养。解释：①如果试验的特异性为95%，在一个100头母猪的无感染群体中，阳性猪的期望值可能是5，这与试验结果相符；②如果特异性小于95%，应考虑到假阳性可能会增加，因为即使在一个无感染的群体内，假阳性的期望值也可能高于5；③如果试验特异性为99%(据Enoe等评估，2001)，则在100头的猪群中，试验阳性母猪的数目不可能超过1。据Sørensen等人(1996)报道，在对230头SPF猪的研究中发现AP2的CFT试验的特异性是100%，检出5头试验阳性猪是畜群感染的有力证明。因此，第三种解释可能更为合理。

由于对畜群感染的分析是建立在群体小的样本而不是全群基础之上的，因此这些论点并不完全符合整个群体的状况。即使从一个大畜群中随机选择30个样本，阳性样本的比例通常仍无法反映出群体中阳性猪的潜伏比例（Carpenter和Gardner，1996）。评价畜群状态时选择合适样本大小的指导原则在后面介绍。

对流行率的估计

估计感染猪的比例，通常是国家、地区健康监测规划，以及制定疫苗接种和其它疾病控制程序的必需部分(Carpenter和Gardner，1996)。如果从猪群中随机采样检测其暴露于传染病病原体的情况，试验结果阳性的比例是感染流行率的近似估计值。如为血清学试验，“血清阳性率”可以与“近似流行率”互换使用。近似流行率的估计值可能高于或低于实际流行率。这取决于所用试验的敏感性和特异性。通过对不完善的试验敏感性和特异性的校正，可由近似流行率估计实际流行率(Rogan和Gladen，1978)：

$$\text{实际流行率} = \frac{\text{近似流行率} + \text{特异性} - 1}{\text{敏感性} + \text{特异性} - 1}$$

同时应该计算出实际流行率估计值的置信区间,有关问题读者可参考其它文献(Greiner和Gardner, 2000)。估计值的精确性以及兽医对估计值准确性的信赖程度主要取决于样本大小,因为样本越大,所得估计值就越精确。在少数情况下,计算得到的实际流行率近似值是负数或零,这种结果表明畜群未发生感染。但是如果不了解敏感性和特异性就不能应用这个公式,畜群感染的实际流行率不能直接算出。

实例 假定已知血清阳性率的估计值为15%,当用敏感性=82.9%,特异性=90.2%的MAT试验对畜群进行刚第弓形虫的筛检时,畜群感染的实际流行率是多少呢?将以上各值代入等式,实际流行率
$$=(0.15+0.902-1)/(0.829+0.902-1)=0.071(7.1\%)$$
。该实际流行率的估计值大约仅为阳性试验结果的1/2,这表明大约有50%的阳性试验是假阳性。

Baggesen等1996年研究发现:在丹麦,以5g盲肠内容物的培养结果为依据,屠宰猪沙门氏菌的感染近似流行率为6.2%,尽管细菌培养的敏感性与被检内容物的体积和培养基的选择有关,但估计该方法的敏感性为50%,特异性为100%。因为仅有50%的感染可通过培养检测出,因此流行率可能被低估了2倍,即实际流行率应该为 $6.2\% \times 2 = 12.4\%$ 。

样本质量和最佳的实验分析

为很好的解释送检动物、组织的试验结果,诊断实验室应该获取有关猪群发病率、死亡率、病畜的起始年龄、临床症状的表现顺序、发病初始到康复的时间、对治疗的反应以及近期管理和环境变化方面的详细病史。由于不同年龄、不同管理条件下饲养的猪群,其发病率或流行率不同,因此从中可以得到有关疾病病原的重要信息。通过向生产者询问有关什么是他们所怀疑的病因,以及为什么近期出现健康或生产问题,通常可以得到对诊断调查有价值的信息。对询问的回答有助于实验室试验的确定,同时亦可获得农场探访中需要提问的一些其它问题的有用信息。

送检目的和样本采集

在对问题做出全面评估之后,兽医与生产者应该共同商议进行实验室试验的目的,这对从正确的猪群中选择合适的样本类型及数目是非常重要的。同样,实验室试验的目的应该及时传达给进行试验的实验室;送检前的沟通相当重要,因

为这样可以确保样本的采集处理和运输能够以获得最佳结果的方式进行(如冷冻可能会减少某些细菌和病毒的回收,但是对维持其它一些病原体的存活力却可能是必需的)。检测毒素采集样本时,不稳定毒素(如氰化物)可能需要冷冻,易扩散的毒素或与塑料(如聚丁二烯联苯)或橡胶(如锌化物)接触可能被污染的毒素需要特殊的单独保存。在向实验的诊断人员咨询时,兽医应该获得关于各种可行的试验方法及其检测有关病原体的优缺点方面的信息。因为试验方法应随所调查的综合征而不同(Benson, 2002)。此外,实验室检测病原体的能力,用于确保试验正常进行的质量控制程序,以及实验室在此之前是否检测过这种病原,都是送检前应向实验室提出的重要问题。

猪的选择

一旦明确了试验目的以及确定了样品类型和运输要求后,为达到预定目的,必须选好采样的猪并提供必要的信息。例如,当猪群暴发高发病率、低死亡率的呼吸道疾病时,若试验目的是确定起始病因,则兽医将着重考虑几种病原体。在诊断过程中,若需要分离病原,则要求抽取处于急性期的猪为样本,而从急性期和恢复期猪采集血清或由三种猪群(无暴露猪群、急性感染猪群和恢复期猪群)采集血清更适合于通过免疫学反应证实感染动物病原体的存在。然而由于大多数感染猪可以康复,如果试验的目的是要确定何种并发因素导致低死亡率,那么选择疾病发展后期的猪更为合适。因为起始病原可能不再存在,或者可能被继发侵入者所掩盖。

尽管大体病理学和组织病理学的诊断方法不易得到定量的评价结果,但这类试验仍常用于疾病诊断。理想情况下,兽医应参与挑选供尸体剖检的猪以确保它们符合预定的标准。若兽医无法亲自挑选动物,则应当与生产人员详细地交流有关试验用猪的要求以及选择的原因,这将有助于实验室对投资于诊断试验的时间和金钱做出最好的回报。大体病理学和组织病理学几种猪病(例如,猪瘟、细胞内劳森氏菌)早期检测的评估,显示出很低的灵敏性和特异性(Elbers等, 2003; Huerta等, 2003)。因此,在仅用尸体剖检诊断或者排除某些疾病时,兽医要慎重,特别是在疾病早期要更加注意。

其它方面的考虑

实验室常用PCR技术检测新鲜组织或体液或者用免疫组织化学(IHC,

immunohistodetection chemistry) 检测福尔马林固定的组织, 以检测抗原。两者都具有不要求呈递活体动物的优点, 而且都能对某器官样品采集最佳部位、采集次数、数量等提供关键信息, 以达到很高的灵敏性 (Benson等, 2002; Rossow, 1998; Yaeger, 2002)。例如, Yaeger (2002) 在确定用IHC检测肺脏对PRRSV感染作出诊断的可能性时, 当肺脏检测点从1增加到5时, 检出率由48%上升到90%以上。PCR具有能检测很低水平抗原的优点, 因此具有很高的灵敏性; 但是对某些综合征, 例如仔猪断奶后多系统损伤综合症, 却不能有效检测

(Pogranichniy等, 2002)。实际上, 增加PCR技术的应用对处于无症状、亚临床症状、病原携带者的情况能够提供有用信息, 因为它的检测界限很低, 在应用时若同一个体不同部位的交叉污染就容易出现, 例如正常的鼻部菌群污染肺脏, 或者在采集、处理样品时, 动物间通过普通器械或手套污染, 以及采集的样品污染环境中的病原, 如空气中的猪肺炎支原体 (Kurth等, 2002) 等。PCR检测的难确定性, 容易检测出相近的病原, 可能导致假阳性结果的产生, 比如牛病毒性腹泻病毒与猪瘟病毒。

完成样本的实验室试验后, 在群体基础上对试验结果的解释, 应包括评价群体病史与实验室眼观所见和送检猪的个体病史是否一致。例如, 假定有人送来适当年龄的猪要求确定断奶后腹泻的原因, 然而眼观结果却表明粪便正常但患有明显的肺炎, 或者如果送检的粪便样品来源于10周龄的瘦弱猪, 那么这两种病例的诊断结果在确定腹泻病因方面无任何价值或者说价值不大。在前面的病例中, 可能选择了未经死前观察的死猪, 结果暴露出以前未认发现的事实, 即某些猪并无腹泻但却存在呼吸道问题。在后一个病例中, 病猪的年龄和营养状况表明其生长迟缓, 而引起断奶后腹泻的几种病原体(如溶血性大肠杆菌、传染性胃肠炎病毒或轮状病毒)已不存在。剖检报告中使试验结果的解释更为复杂的另一个重要原因是见到注射部位和胃肠道的药物治疗。因为使用抗寄生虫药物或抗生素会抑制或杀死所调查的潜在病原体, 导致假阴性结果。

欲使试验结果与表现出的病理学病变或临床疾病相互关联, 应根据独特的动物特征标记样本。送检的书面资料也需标明样本数目。若样本缺少鉴别信息, 从多头猪采集的组织、拭子、粪便或血清样本就有可能被认为是来源于同一动物并混在一起, 或者仅用部分样本进行试验。

原因及影响

在养猪生产中几乎所有的传染病都是由多种病因引起的。环境和管理因素在显露疾病的临床表现及确定疾病对生产性能影响方面起着核心作用。仔猪断奶后多系统虚损综合症是一个多因素影响的很好范例（Pogranichniy等，2002）。尽管诊断实验室有助于鉴定与疾病暴发或生产问题有潜在关系的病原，但是与传染性病原有关的畜主、管理和环境等其它因素是否重要则必须由参与送检的兽医来决定。

分离出病原后的考虑

即使用特异性为100%的试验分离出病原，也只能证实病原的存在，而对于病原在疾病过程中的作用仍无法了解；若未进行预定的调查研究，多数情况下很难明确确定可疑病因(如病原体)是在结果(如发病或死亡)之前，或者证明就是引起疾病的病原。那些影响对病原在疾病过程中的作用进行因果解释的因素也必须考虑。由于存在着某些亚临床或正常的病原携带者，因此在送检样本时应明确试验的目的是要证实或排除某种潜在的致病性病原，还是要确定病原体在疾病过程中的作用（Huerta等，2003；Pogranichniy等，2002）。病原的分离部位(如鼻腔和肺)、培养物的纯度、混合培养物中微生物的类型以及病原体的数量是确定潜在的致病病原和疾病过程之间因果关系的重要因素。

分离部位 分离部位是很重要的，因为许多在病变中发现的细菌同时也存在于健康猪的皮肤、呼吸道、胃肠道或生殖道的菌群中(Amass等，1996；Dritz等，1996；Straw等，1996)。因此，在死亡期间很可能导致深部器官的污染。例如，肺脏可被吸入的鼻咽部菌群污染，导致分离出某些潜在的病原，诸如：副猪嗜血杆菌或猪链球菌，据报道这些病原原本存在于健康动物的鼻腔和扁桃体内(Amass等，1996；Dritz，等1996)。尽管大多数呼吸道病原较常见于发生肺炎的肺，但少数(2%~16%)正常肺亦存在这些病原(Straw等，1996)。器官摘除过程中也可能发生死后污染。在切除颅盖时，若用于摘除大脑的锯进入鼻腔，则脑部的混合培养物中可能有多杀性巴氏杆菌、猪链球菌或嗜血杆菌。

纯培养物或混合培养物结果 发现到单一的潜在性病原有助于解释病原与病变间的因果联系，但是在猪群中很难得到单一的病原。多重感染更加常见，Choiet等（2003）在研究2872例猪肺炎时，发现88%的猪至少有两种病原存在。

要解释混合培养物结果除了需要了解分离的细菌类型和数量外,还必须具备有关培养部位的菌群方面的知识。若无炎症表现或者有潜在病原存在于混合培养物中,则很难确定疾病的因果关系。用于评价的送检猪常常已发病数日,因此很难确定所发现的病原哪种是原发的或哪种是继发的,以及混合培养物中是否仍有初始病原的存在。

单个培养部位出现混合细菌试验结果说明可能有多种病原感染,也可能反映死后污染或临终吸入。例如,若环境中的常见细菌(如肠杆菌类细菌、链球菌、葡萄球菌)在实质器官的混合培养物中占有生长优势或者培养物中的病原菌很少,则通常表明是吸入肺内、口咽、肠道和环境中细菌的死后污染或器官采样培养时的实验操作有误。有报道证实这些微生物在正常肺和肺炎肺培养物中出现的频率相似(Straw等, 1996)。

分子特征 在某些情况下,病原分离后若分离株的致病性较低或化验出(例如,PCR技术)动物最近使用过活疫苗,可能需要进一步了解分离株的特征方可确定疾病的因果关系。

如果无法确定疾病暴发是由于引入了新的毒力更强的菌株或毒株还是由于地方性流行株重现时,需要使用分子流行病学的方法(如PRRS; Larochelle等, 2003)。有时,还需要区分致病性野毒和与其密切相关并发生交叉反应的病毒(如猪呼吸道冠状病毒和传染性胃肠炎病毒)或疫苗株(如PRRS; Wesley等, 1998),因为前者会导致临床疾病而与其有交叉反应的病毒或疫苗分离株则不会致病(Mengeling等, 1996)。

致病因子的数量 在解释毒理学和营养学试验结果时,存在的毒物数量也同样重要,低水平的毒物可能仅反映毒物的残留而不是临床中毒的剂量。然而,由于毒物可被吸收和不同速度加工处理,有些毒物又具有高度挥发性(如磷化锌),有些能迅速分解(如抗凝血素),如果出现临床症状这类毒物即使是低水平的也可能具有重要意义。某些毒物能导致组织变化且恢复较慢(如蹄部组织),以至在组织水平已经恢复正常时病变仍持续存在(如硒)。猪血浆和组织中重要物质的量低于正常可能导致临床或亚临床性营养不良。一般来说,抗原或核酸化验(如PCR、IHC、FA和病毒分离)所作出的阳性或阴性结果是不定量的。甚至半定量检测(如实时PCR, real-time PCR、细菌培养、排泄物中寄生虫数量)也受到许多因素影

响，如治疗、对样品的操作、样品中致病因子分布不均以及感染的阶段（如潜伏期）。因此，病原微生物的数量虽然应该考虑，但应该不是决定致病因子重要性的主要因素。

分离不出病原后的考虑

如前所述，实验样本的阴性结果未必能够排除某种病原成为病因的可能性，尤其是在试验的阴性预测值为中等大小时更是如此。假阴性结果，诸如不能分离出某种病毒或细菌病原，用电镜、荧光抗体(FA)、组织病理学和其它抗体检测技术或PCR技术不能检测出特异的病原等，其产生原因是多方面的。开展试验的实验室可能在分离一些这样的病原方面没有经验或者经验很少、猪的某些病原营养要求苛刻、没有选择灵敏性高的方法等。例如，一个实验室报告“支原体培养阴性”并不能排除猪肺炎支原体感染，因为多数实验室所用培养技术不能够培养出这种微生物。由于呼吸道和肠道病原分布不均匀，因此在取有限片段进行实验室试验(如用荧光抗体法检测传染性胃肠炎病毒，用免疫组织化学检测PRRS，Yaeger, 2002)时，可能影响病原的检测；发病后的时间间隔可能因化合物的排出或清除而导致低于试验的检测界限，此时需要选用像血清学技术或者选用像PCR这些更灵敏的检测方法；试验只能检测出病原特定的株(如商用ELISA仅能检测A群轮状病毒)。此外，运送媒介、时间耽搁以及运输温度等综合因素不利于某些病原的存活，影响病原分离，但是由于对温度和时间要求不严，所以PCR或抗原检测仍然有效。例如，室温下保存24h的组织样本，由其分离PRRS病毒的检出率低于50%而从保存于4°C的样本分离PRRS病毒的检出率高达100%(Van Alstine等, 1993)。然而，在样本在室温保持4天以上时用PCR技术检测PRRSV，检出阳性率仍能达到94%（Benson等, 2002）。PCR检测排泄物的各种肠道病原，在样本采集后较短的时间里出现假阴性结果的可能性，在室温或更高温度时由于正常菌群的影响假阴性结果出现的可能性增加。另外，虽然新的内部控制技术已经提高了实验室检测这些物质的能力，但是粪便中抑制性物质也能够导致PCR的假阴性结果，因此，呈递的阴性结果是无效的（Jacobson等, 2003）。许多实验室诊断只进行病理组织学检查和免疫组织化学（IHC）（例如，细胞内劳氏菌，附着性和非附着性大肠杆菌），因此送检的样本可能不合适(如粪便)。对于一些象PRRS这类病原，由于福尔马林固定时间过长用IHC检测时也能导致假阴性结果

发生（Van Alstine等，2002）。一般说来，如果在采集、送检样本之前与实验室进行协商，则可以避免因实验室无法鉴定特异病原、病变分布不均、运输条件以及样本不合适而发生的问题。

甚至在样本的选择和运输条件是最合适的情况下，并且实验室也具备检测相关病原的能力，阴性结果也不能排除猪中存在某些难以培养的病原或者少量存在于肠道病变中的细菌，如猪霍乱沙门氏菌。但是，在对猪进行详尽的病理学评价时，没有发现该病原所特有的病变或临床症状，通常可以排除该病原是疾病的病因，尽管病原可能仍然存在，但并未引起临床疾病（例如，细胞内劳氏菌，Huerta等，2003）。若在抽样前对猪进行治疗亦会出现假阴性结果。如使用青霉素或其它抗生素容易抑制或杀死G⁺菌，因此，大大减小了从治疗猪体内分离出丹毒杆菌或 β -溶血性链球菌的可能性。

有关血清学结果的其它考虑

由于血清学的结果通常是定量的，而且其数值在进行同种试验的实验间有差异，因此实验室在其送检区域内的检测经验有助于对血清学反应和疾病之间的关系做出最好的解释。实验室应该能够提供其所在区域的猪群或免疫猪群的共同免疫反应方面的信息。然而，许多疾病由自然感染所诱导的滴度与免疫滴度不易区分(Hill, 1988)。据报道，只有在PRV感染的情况下，试验才能区分野外感染和基因缺失PRV疫苗免疫猪只的免疫应答(Weigel等，1992)。此外，感染后多久可用试验检测到滴度、滴度达到高峰的时间以及感染或免疫后可检测的抗体的持续时间也很重要(Yoon等，1995)。若采样前2~4周，被采样的动物曾经发病或已经康复，使用高敏感性的试验未检测出滴度，则可以排除所怀疑的病原。

对于仔猪，重复采样有助于区分母源免疫和主动免疫。在一个慢性感染的猪群中若兽医欲用血清学检测TGE以确定断奶后腹泻的病因，则仅仅在断奶期间抽取一个血清样本是不够的，因为这种抗体经被动或主动免疫均可获得(Hill, 1988)。若在2~4周后重复取样，从滴度的升高或降低可以分别证明抗体的产生是由于主动感染或是被动获得。然而在解释这种抽样方案的结果时，还必须考虑猪呼吸道冠状病毒的母源抗体或感染的潜在作用，因为它们可诱导产生TGE的交叉反应抗体(Sestak 等，1996；Wesley 和 Woods, 1996)。

尽管建立一个明确的因果关系是很困难的，但若综合考虑上面提到的因素以

及使用干预试验以验证诊断(尤其当有未治疗的对照组时),则会提高对实验室结果进行因果解释的置信水平。

选择合适的样本大小

作为疾病的调查研究和畜群健康监测的一部分,采集样本之前必须考虑几个有关样本大小的问题。尽管收集的样本太少是最常见的错误,但是必须事先衡量送检更多样本的额外花费相对于疾病的经济损失和建立正确诊断的重要性孰重孰轻。

畜群存在感染时的检测

兽医通常需要确定畜群或其亚群是现在还是曾经被感染过。对于特异性为100%的试验而言,往往一次阳性试验结果即可充分说明畜群为阴性,而对于不完全特异的血清学试验则可能需要一次以上的阳性结果。为了估计检测感染所需的数目,有两个数值是必需的:要求的置信水平(通常是95%)以及畜群或所评价的特定猪群感染的可能流行率。选择流行率值时应尽量实际,但若有怀疑,为确保有足够数的猪供采样最好选择一个较低的流行率。如果计算得到的样本大小相对于整个群体数目过大,则样本数目可适当下调。

若兽医的目标仅是检测感染,则不需要随机抽样,可在流行率较高的群中选择样本。例如,在不同的年龄群中选择感染风险与日龄相关的群体,或者在临床感染和其它健康猪只之间进行选择。在丹麦如果猪群日龄与感染沙门氏菌相关,该信息就能确定此猪群作为样本采集的风险群体(Christensen和Garder, 2000)。若检测猪群的刚弟弓形虫感染,母猪是最适的抽样群体,因为其流行率可能高于育成猪群。同样,欲检测PRRSV,日龄较大的哺乳猪样本(6~8周龄)要优于来源于母猪或育成猪的样本。若使用粪便培养或抗原检测方法检测肠道病原,则应优先在腹泻猪中取样,而不是粪便正常猪的样本。

非随机或有目标取样的优点是可以利用较少的样本建立诊断,在进行某种暴发性疾病的调查时,若用于培养的样本来源于经剖检鉴定的典型病变(流行率接近100%),则只需少量样本。在其它情况下,若感染亚临床且流行率较低,则应送检较多的样本。例如,若感染的流行率至少为10%且试验完全敏感,则在大小为30的样本中至少检测出一个阳性样本的置信度为95%。当试验敏感性小于100%时,应增加样本数目。如若沙门氏菌的粪便培养仅有50%的敏感性,那么

样本大小约为60(是敏感性为100%试验所需数目的两倍)方可满足特定的标准。

尽管充分考虑了样本大小,但实验室结果有时仍为阴性。若猪群的样本试验结果为零阳性,则对这种结果的解释应不同于对整个畜群进行试验所得阴性结果的解释。适当的解释见以下有关流行率估计的例子。

流行率估计

通常可以用真正随机抽样的同一样本进行感染检测和流行率估计。用于流行率估计的随机样本往往是在同一时间点上采集的(截面样本)。欲使流行率估计具有理想的准确性或误差限制(通常从5%~20%)对样本大小的要求(包括对有限群体大小的校正)见表10.2和表10.3。当流行率未知且已制定了研究计划时,我们建议用50%的流行率来计算样本大小,由此可知所需要的最大数目。由于要求得到更为精确的估计会在很大程度上增加花费。因此 $\pm 10\%$ 或 $\pm 20\%$ 的误差限制比 $\pm 5\%$ 更常用。尽管如此,对误差限制的选择还是比较主观的。

关于流行率估计我们强调两点:第一,在流行率为中等大小(30%~70%)时,为准确地估计流行率,需要选择比较高或较低流行率时更大的样本大小。若样本大小固定,则估计越精确,流行率与50%相差越大。第二,若样本过小,则样本的试验结果与群体的真实值大不相同。例如,Gardner等人(1996)分别用5头猪和30头猪的样本对一个大猪群的细小病毒流行率进行估计。发现大小为5的样本不能反映猪群的流行率,在某些情况下甚至大小为30的样本对猪群流行率的估计也很差。

有时,即使事先计算出样本大小,但当用完善的试验对随机样本进行检测时,却没有阳性结果出现。从中可以得到何种结论?若无阳性结果,则95%置信限流行率上限约为 $3/n$,其中 n =抽样数(DiGiacomo和Koepsell, 1986)。因此,若对30头猪进行试验,其结果全部为阴性,则95%置信限的流行率上限为 $3/30$ 即10%。尽管兽医起初会认为猪群没有感染,但更为合适的解释是当置信度为95%时,猪群流行率 $\leq 10\%$ 。有关如何正确解释阴性结果的问题涉及到健康证明体系。只有对畜群中的所有猪只进行敏感性为100%的试验且得到阴性结果,才能仅在试验结果的基础上充分证明无此病原感染。实际上,证明通常是以畜群病史以及对畜群样本反复试验为基础的,而且是在认识到邻近畜群的病原传播是许多猪群感染的原因的情况下做出的。丹麦SPF规划的经验表明,每年猪肺炎支原体的重复感

染率为10%~15%(Sørensen等，1992；Sørensen等，1993)。

猪群间流行率或发病率差异的检测

在某些调查中，兽医也许想确定某群猪的感染流行率或发病率是否高于其它猪群。分群的因素可能是年龄、繁殖状态(妊娠对非妊娠或流产对非流产)、生产系统或管理类型或其它比较因素。若使用这种诊断方法，则可以发现在传染性病原和结果(如临床疾病、繁殖障碍或瘦弱猪的流行性)之间的重要联系，这就为病原在综合征中的致病作用提供了辅助证明。这种比较方法常用于制作血清示意图，在图中可以评价畜群中不同年龄群暴露于一种或多种传染性病原的情况。

若流行率比较是送检的首要目标，则所要求的样本大小是由畜群的置信水平以及流行率的最佳优先估计值决定的。当群体间差异的百分点下降时，需要的样本量要大得多(见表10.4)。例如，若显著水平为5%，用检验功效为80%的试验检测流行率为40%和10%之间的显著差异，需38/组，而欲检测流行率为40%和20%之间的差异则需91/组。由此可见，这些计算表明通常被推荐用于畜群血清学示意图的小样本(每年龄组5~10头)明显太小，无法用于明确的比较。进行流行率比较所需的样本大小列于表册(Fleiss，1981)，也可用公共主导计算机软件计算(Dean等，1994)。

表10.4 在95%的置信水平和检验功效为80%时，检测两组群体(一组有危险因素，一组没有)感染或疾病的流行率或发病率的显著差异所需的样本大小

危险因素阴性组的流行率(%)									
危险因素阳性组的流行率(%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
90									
10	93								
20	44	219							
30	27	71	313						
40	19	38	91	376					
50	14	24	45	103	407				
60	11	17	27	48	107	407			
70	9	12	18	28	48	103	376		
80	7	9	13	18	27	45	91	313	
90	5	7	9	12	17	24	38	71	219
100	4	5	7	9	11	14	19	27	44

注： 通常认为危险因素阳性组的流行率高于危险因素阴性组，假定样本大小不依赖于组别而随机采样，表中的数字是两组中每一组需要的数目。

结论

实验室可以帮助建立诊断，但最终兽医需要在了解其它的畜群信息有关传染性病原和其它因素在疾病发生中的相对重要性的现有知识的基础上评估实验室的结果。为了能够从实验室试验获得最大的好处，兽医应做到以下几点：

1. 明确送检目的——如确诊、筛检病原、估计病原流行率。
2. 选择的实验室应具备良好的内、外部质量控制程序并有做相关病原或试验的工作经验。
3. 应最大限度地为实验室提供达到试验目的的机会。
 - A. 选择合适的样本类型，如组织、血清；
 - B. 使用正确的送检方法，如冷藏、冷冻、室温；
 - C. 保证样本是从在问题调查中真正有代表性并在疾病合适的阶段的猪采集的；
 - D. 送检数目合适的样本以满足特定的送检目的，使增加样本所需额外开支与正确建立诊断的需要之间达到平衡；
 - E. 样本的比较群体(对照)应考虑在内。如果没有对照，解释可能会模糊不清，甚至使为建立诊断前期所付出的努力失去价值；
4. 要了解可以利用的试验的优点及局限；
5. 解释结果时应考虑阳性试验结果和阴性试验结果的预测值。

(杨秀进 译 王金秀 校)