

CHƯƠNG 5

ĐÁNH GIÁ XÉT NGHIỆM CHẨN ĐOÁN BỆNH

Khi đề cập đến dịch tễ học mô tả về bệnh hay một trạng thái nào đó liên quan sức khỏe, quan trọng nhất là xác định con thú có bệnh hay có trạng thái đó không. Để trả lời câu hỏi này, thú y cần phải thực hiện các phương pháp chẩn đoán. Các xét nghiệm chẩn đoán (diagnostic test) giữ vai trò quan trọng trong quyết định chữa trị hay trong xác định tỷ lệ bệnh. Số liệu của kết quả xét nghiệm có thể được trình bày ở 3 dạng: hạng mục, thứ tự hoặc khoảng cách. Chẳng hạn, xét nghiệm huyết thanh học có thể được trình bày dưới dạng: dương tính hoặc âm tính (dạng hạng mục), dương tính mạnh hay yếu (dạng thứ tự) hoặc phản ứng xảy ra ở những độ pha loãng nào đó của huyết thanh (dạng khoảng cách).

Cần phân biệt xét nghiệm chẩn đoán và xét nghiệm kiểm tra sàng lọc (screening test). Xét nghiệm chẩn đoán được dùng để phân biệt thú mắc căn bệnh đang nghiên cứu với những thú mắc các căn bệnh khác. Xét nghiệm chẩn đoán bắt đầu với thú đang có bệnh. Xét nghiệm sàng lọc được dùng để nhận diện (một cách phỏng đoán) căn bệnh/khuyết tật chưa được biết rõ trong một *quần thể có vẻ khỏe mạnh*. Xét nghiệm sàng lọc bắt đầu với các cá thể được cho là khỏe mạnh. Cùng một loại xét nghiệm có thể được dùng cho một trong hai mục đích này. Sự phân biệt hai loại xét nghiệm là cần thiết vì tính chất của quần thể được dùng để tiêu chuẩn hoá xét nghiệm và ảnh hưởng của tỷ lệ bệnh lên cách giải thích kết quả xét nghiệm.

Trong dịch tễ học mô tả sẽ đề cập các thông số kỹ thuật liên quan đến khả năng chẩn đoán chính xác hay không của các phương pháp nhằm có cái nhìn khái quát về việc mô tả bệnh thông qua sử dụng các phương pháp chẩn đoán.

1. Độ chính xác của xét nghiệm

Độ chính xác (accuracy) của xét nghiệm là tỷ lệ của tất cả kết quả xét nghiệm đúng (cả dương tính lẫn âm tính). Độ chính xác còn gọi là giá trị (validity). Độ chính xác thường dùng để diễn đạt khả năng chung của một xét nghiệm.

Một xét nghiệm được chọn hay không là tùy thuộc vào sự cân đối giữa nguy cơ của chẩn đoán sai và chi phí tương đối của kết quả dương tính giả cũng như âm tính giả.

1.1 Phương pháp chuẩn

Kết quả của tất cả các phương pháp xét nghiệm nên được so sánh với phương pháp chuẩn. Phương pháp chuẩn cung cấp phương tiện để xác định giá trị (phẩm chất) của một phương pháp xét nghiệm, chữa trị hay tiên lượng. Trong vài trường hợp, nuôi cấy vi sinh vật hoặc làm vết phết máu là những phương cách đủ để khẳng định sự hiện diện của một bệnh. Trong những trường hợp khác, các phương pháp xét nghiệm đắt tiền và tỷ mỉ phải được dùng.

Mổ khám sau khi chết thường được xem như phương pháp khẳng định tối hảo, cung cấp dữ liệu về diễn biến của bệnh, độ chính xác của các xét nghiệm và chữa trị. Tuy nhiên, nhiều xáo trộn khó thể được khẳng định (kể cả khi mổ khám) do bởi những xáo trộn đó chỉ bắt nguồn từ các thay đổi sinh hoá hoặc thần kinh không rõ ràng và chỉ được nhận diện ở thú sống.

Bảng 7.1 Kỹ thuật đánh giá một xét nghiệm chẩn đoán

Chỉ tiêu đánh giá	Cách đo lường	Cách diễn đạt
Giá trị	Bảng 2x2	Độ nhạy, độ chuyên biệt, giá trị tiên đoán âm tính hay dương tính, độ chính xác
Trị số cắt ngang tối hảo	Đường cong của đặc tính xét nghiệm-đáp ứng (response-operating characteristic, ROC)	Trị số cắt ngang âm tính-dương tính
So sánh các xét nghiệm	Trị cắt ngang cố định: biểu đồ Bayes	Hậu xác suất (posterior probability) và tiên xác suất (prior probability)
	Biến số liên tục: đường cong ROC	Tỷ số gần giống ở các mức khác nhau của xét nghiệm; vùng dưới đường cong
Khả năng sử dụng cho lâm sàng	Tỷ lệ dương tính thật ÷ tỷ lệ dương tính giả Tỷ lệ âm tính giả ÷ tỷ lệ âm tính thật	Tỷ số gần giống cho xét nghiệm âm tính hay dương tính

1.2 Mổ khám sau khi chết như là một xét nghiệm chẩn đoán

Mổ khám sau khi chết là phương cách thường được áp dụng trong thú y hơn là trong dân y. Trong hoạt động dân y hiện nay ở Hoa Kỳ, tỷ lệ người chết được mổ khám để tìm nguyên nhân chỉ khoảng 15% của số người chết và người ta không thể tìm được nguyên nhân trực tiếp ở 40% số người chết được mổ khám.

Bên cạnh tác dụng như một phương tiện kiểm soát chất lượng và ghi nhận sự chính xác của các xét nghiệm khác, mổ khám sau khi chết còn mang lại nhiều lợi ích khác. Khi kết hợp với lịch sử của thú bệnh, mổ khám có thể cung cấp thông tin về hiệu lực và tính độc của các yếu tố trị liệu, giúp phát hiện các tình trạng quan trọng nhưng không rõ ràng về lâm sàng khi bệnh xảy ra, và giúp ghi nhận ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên tiến trình sinh lý. Ngoài ra, mổ khám còn là phương pháp hữu hiệu trong việc phát hiện các biến đổi đa dạng của bệnh ở gia súc.

Kiểm tra tại lò mổ là một phần trong chương trình chẩn đoán và điều tra, và đã được thực hiện bởi các nhà chăn nuôi khi bán thú mổ thịt. Chương trình điều tra dịch bệnh có 3 thành phần: mổ khám sau khi chết trong xác định yếu tố gây nguy cơ, phương án lấy mẫu dựa trên cơ sở thống kê và hệ thống báo cáo về bệnh của gia súc gia cầm.

2. Độ nhạy và độ chuyên biệt của xét nghiệm

Tất cả các xét nghiệm chẩn đoán không hẳn là hoàn hảo với độ chính xác 100% do đó việc kết luận con thú có bệnh hay không có bệnh cũng không hoàn toàn chính xác. Điều này dẫn đến những con thú dương tính giả (xét nghiệm là có bệnh nhưng thực chất là khỏe mạnh) và ngược lại là âm tính giả. Sự sai biệt này được đánh giá thông qua các chỉ số “độ nhạy” (sensitivity) và “độ chuyên biệt” (specificity). Để xác định các chỉ số này người ta so sánh kết quả chẩn đoán của phương pháp cần xác định với phương pháp chuẩn (được gọi là chuẩn vàng, gold standard). Phương pháp chuẩn là phương pháp được xem như độ chính xác cao, tuy nhiên không phải là tuyệt đối hoàn toàn. Do việc sử dụng phương pháp chuẩn đôi khi rất tốn kém về thời gian cũng như tiền bạc nên người ta thực hiện các phương pháp có độ chính xác thấp hơn và xác định độ chuyên biệt cũng như độ nhạy của phương pháp mới.

Ví dụ phương pháp xác định ký sinh trùng *Trichinella spiralis* trên cơ của heo gàn như chính xác là phương pháp tiêu cơ, tức là sử dụng các enzyme để tiêu hoá mẫu cơ hoành, sau đó làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi. Tuy nhiên, phương pháp này tốn nhiều thời gian và đặc biệt là phải giết con thú nên trên thực tế người ta thường dùng phương pháp ELISA để chẩn đoán xem con thú có kháng thể chống lại ký sinh trùng này không. Phương pháp này tiện lợi ở chỗ lấy mẫu máu từ thú sống và thời gian phân tích nhanh, tuy nhiên ELISA thường cho kết quả nghi ngờ đối với những con có hàm lượng kháng thể thấp. Để đánh giá độ chính xác của phương pháp này, người ta đã tính độ nhạy Se và độ chuyên biệt Sp của phương pháp ELISA so với phương pháp chuẩn.

Độ nhạy được định nghĩa là xác suất một con thú thật sự có bệnh có thể được phát hiện bằng chẩn đoán. Còn độ chuyên biệt được định nghĩa là xác suất để một con thú không bệnh được phát hiện bằng phương pháp chẩn đoán. Định nghĩa này được thể hiện trong công thức sau:

$$Se = \frac{\text{Số con thú thực sự mắc bệnh được phát hiện bằng phương pháp chẩn đoán}}{\text{Tổng số thú thật sự mắc bệnh (phát hiện bằng phương pháp chuẩn)}}$$

$$Sp = \frac{\text{Số con thú không bệnh (phát hiện bằng phương pháp chẩn đoán)}}{\text{Tổng số thú thật sự không bệnh (bằng phương pháp chuẩn)}}$$

Để cụ thể hoá công thức trên, hãy tham khảo bảng sau đây. Đây là bảng xác định Se và Sp của một phương pháp chẩn đoán dựa vào một phương pháp chuẩn. Tổng số mẫu N được phân tích bằng cả hai phương pháp, kết quả (dương tính hay âm tính) của từng mẫu trong từng phương pháp được tổng hợp.

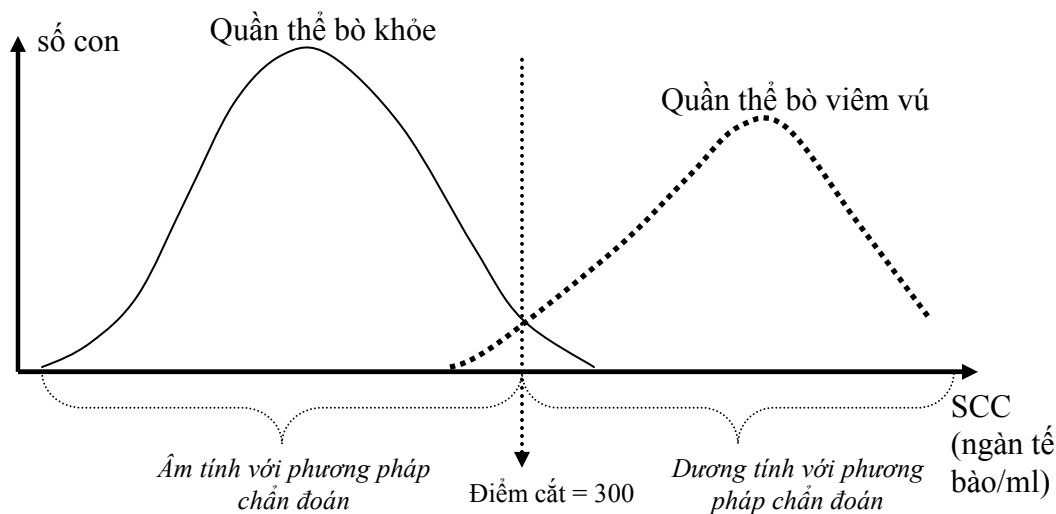
Bảng 7.2 Kết quả xét nghiệm so với kết quả của phương pháp chuẩn

		Phương pháp chuẩn		
		Bệnh	Không bệnh	Tổng
Phương pháp chẩn đoán cần xác định	Bệnh	a	b	a + b
	Không bệnh	c	d	c + d
	Tổng	a + c	b + d	N
Độ nhạy	Se = a/(a+c)	Sai biệt chuẩn SE = [Se(1-Se)/(a+c)] ^{1/2}		
Độ chuyên biệt	Sp = d/(b+d)	SE = [Sp(1-Sp)/(b+d)] ^{1/2}		

Trong trường hợp không thể dùng các phương pháp chuẩn, người ta có thể dùng một phương pháp khác không hoàn toàn tốt như phương pháp chuẩn để so sánh với phương pháp cần xác định, và tính độ nhạy và độ chuyên biệt tương đối. Tuy nhiên tốt hơn là nên dùng chỉ số kappa để tính độ tương đồng giữa 2 phương pháp chẩn đoán (sẽ được đề cập sau).

Thông thường, Se và Sp liên quan nghịch, có nghĩa là phương pháp nào có Se cao thì có thể có Sp thấp và ngược lại. Điều này được giải thích bằng cách chọn điểm cắt (cut-off). Để đánh giá thú bệnh hay không trong quần thể có nhóm bệnh và nhóm không bệnh, thường người ta đo lường một chỉ số liên tục nào đó (ví dụ mật độ quang trong phương pháp ELISA) và thiết lập một giá trị được gọi là điểm cắt (cut-off). Điểm cắt sẽ là giới hạn để phân biệt thú có bệnh hay không (ví dụ giá trị lớn hơn điểm cắt được cho là dương tính). Một ví dụ về phương pháp chẩn đoán bệnh viêm vú trên bò sữa bằng tổng số tế bào bản thể (SCC: somatic cell count), người ta chọn điểm cắt là 300 (ngàn tế bào/ml sữa) để đánh giá bò có viêm vú hay không. Như vậy trong quần thể sẽ có 2 nhóm bò: bò viêm vú và bò khỏe mạnh. Số lượng bò và giá trị SCC được khái quát trong biểu đồ sau

Chúng ta nhận thấy có một vùng SCC mà quần thể khú khôe và thú bệnh chồng lên nhau đây chính là vùng nghi ngờ (xảy ra dương tính giả và âm tính giả). Trong trường hợp chúng ta nâng điểm cắt lên cao (400 chẳng hạn), lúc này những con thú được xét nghiệm cho là dương tính chắc chắn thuộc quần thể thú bệnh hơn, hay phần trăm con thú thật sự âm tính sẽ gần tiến tới 100% điều đó có nghĩa là độ chuyên biệt tăng lên. Nhưng những con thú mà xét nghiệm cho biết là dương tính sẽ thấp hơn thực tế nhiều, điều này có nghĩa là độ nhạy sẽ giảm. Lý luận tương tự cho trường hợp giảm điểm cắt xuống (200 chẳng hạn) chúng ta sẽ thấy được sự tương quan nghịch giữa 2 đại lượng này.



Hình 7.1 Đồ thị về phân bố kết quả SCC trong quần thể

Như vậy mỗi phương pháp chẩn đoán có độ nhạy và độ chuyên biệt riêng. Vấn đề là quyết định dùng phương pháp chẩn đoán nào thì thích hợp. Thông thường các phương pháp có độ nhạy cao được sử dụng khi cần để phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm, hoặc trong một số tình huống mà việc phát hiện những bệnh là rất quan trọng, và khi tỷ lệ nhiễm thấp. Ngược lại, phương pháp có độ chuyên biệt cao được sử dụng khi muốn chắc chắn rằng kết quả dương tính đã được chẩn đoán ở giai đoạn sớm, hoặc khi kết quả dương tính giả gây hậu quả không tốt (ví dụ, phải tiêu hủy thú nếu kết quả dương tính).

Ngoài các chỉ tiêu trên, hai loại tỷ lệ còn được tính để đánh giá một xét nghiệm. Tỷ lệ dương tính giả là khả năng cho kết quả giống dương tính trên bệnh nhân không bệnh. Tỷ lệ dương tính giả bằng 1 trừ cho độ chuyên biệt. Tỷ lệ âm tính giả là khả năng cho kết quả âm tính trên bệnh nhân được biết là có bệnh (bằng 1 trừ độ nhạy).

Tóm lại, độ nhạy và tỷ lệ âm tính giả diễn đạt khả năng của một xét nghiệm chẩn đoán đối với thú có bệnh. Độ chuyên biệt và tỷ lệ dương tính giả diễn đạt khả năng của một xét nghiệm chẩn đoán trên thú không bệnh.

3. Mối liên quan giữa Se, Sp và tỷ lệ nhiễm

Xét nghiệm chẩn đoán được dùng trong quần thể với các tần số bệnh khác nhau. Điều này không ảnh hưởng đến độ nhạy và độ chuyên biệt, nhưng giá trị tiên đoán có thể thay đổi rất lớn. Khi tỷ lệ bệnh giảm, giá trị tiên đoán dương tính cũng giảm nhưng giá trị tiên đoán âm tính tăng.

Giá trị tiên đoán có thể được cải thiện bằng cách chọn các xét nghiệm có độ nhạy và độ chuyên biệt cao. Xét nghiệm nhạy sẽ cải thiện giá trị tiên đoán âm (ít kết quả âm tính giả). Xét nghiệm chuyên biệt giúp cải thiện giá trị tiên đoán dương (ít kết quả dương tính giả). Tuy nhiên, do bởi tỷ lệ bệnh biến động lớn hơn độ nhạy và độ chuyên biệt, tỷ lệ

bệnh vẫn là yếu tố chánh quyết định giá trị tiên đoán. Do đó, cải thiện độ nhạy và độ chuyên biệt không hy vọng mang lại cải thiện đáng kể của giá trị tiên đoán.

Trên thực tế đôi khi chúng ta chỉ căn cứ vào kết quả xét nghiệm để xác định tỷ lệ nhiễm. Điều này có thể chấp nhận khi phương pháp chẩn đoán đó được công nhận. Tuy nhiên, việc tính tỷ lệ nhiễm thông qua kết quả này chỉ là một dạng tỷ lệ nhiễm mà người ta gọi là tỷ lệ nhiễm biểu kiến (AP: apparent prevalence) và kết quả thật sự về tỷ lệ nhiễm tùy thuộc vào độ nhạy và độ chuyên biệt của phương pháp chẩn đoán.

Dựa vào bảng sau, AP được tính là $(a+b)/N$. Nếu gọi P là tỷ lệ nhiễm thật một bệnh nào đó trong quần thể, và Se và Sp là độ nhạy và độ chuyên biệt của phương pháp chẩn đoán thì các thành phần trong bảng được mô tả như sau:

Bảng 7.3 Kết quả xét nghiệm so với tình trạng bệnh thật sự

		Tình trạng bệnh thực sự		
		Bệnh	Không bệnh	Tổng
Phương pháp chẩn đoán cần xác định	Dương tính	$Se \times P$	$(1-Sp) \times (1-P)$	$Se \times P + (1-Sp) \times (1-P)$
	Âm tính	$(1-Se) \times P$	$Sp \times (1-P)$	$(1-Se) \times P + Sp \times (1-P)$
	Tổng	P	1-P	1

Từ đó có thể tính được là $AP = Se \times P + (1-Sp) \times (1-P)$. Thật ra, chúng ta không thể biết được tỷ lệ nhiễm thật sự P mà chỉ có thể có AP từ một khảo sát dùng phương pháp chẩn đoán đã biết trước Sp và Se của nó. Từ đó có thể xác định tỷ lệ nhiễm thật như sau:

$$P = \frac{(AP + Sp - 1)}{(Se + Sp - 1)}$$

4. Giá trị tiên đoán (predictive value)

Trong lâm sàng, bác sĩ luôn đặt ra câu hỏi là nếu một con thú được chẩn đoán (bằng phương pháp có độ nhạy Se và độ chuyên biệt Sp) là dương tính thì xác suất để con thú thật sự có bệnh là bao nhiêu. Hoặc là nếu con thú được chẩn đoán là âm tính, liệu xác suất thật sự con thú không bệnh là bao nhiêu. Chính vì vậy dịch tễ học lâm sàng đã đưa ra khái niệm giá trị tiên đoán (bao gồm giá trị tiên đoán âm và dương). Cách tính của các giá trị này như sau:

$$PV(+) = \frac{a}{(a+b)} = \frac{P * Se}{P * Se + (1-P) * (1-Se)}$$

$$PV(-) = \frac{d}{(c+d)} = \frac{(1-P) * Sp}{P*(1-Se) + Sp*(1-P)}$$

Như vậy giá trị tiên đoán phụ thuộc nhiều vào tỷ lệ nhiễm trong quần thể (P). Giá trị Se và Sp xem như không thay đổi, vậy khi đưa xét nghiệm vào chẩn đoán cho quần thể có tỷ lệ nhiễm thấp thì giá trị tiên đoán dương tính giảm nhưng giá trị tiên đoán âm tính lại tăng lên.

Giá trị tiên đoán có thể được cải thiện bằng cách chọn các xét nghiệm có độ chuyên biệt và độ nhạy cao. Xét nghiệm có độ nhạy cao sẽ cải thiện giá trị tiên đoán âm (ít kết quả âm tính giả), ngược lại xét nghiệm có độ chuyên biệt cao sẽ cải thiện được giá trị tiên đoán dương (ít kết quả dương tính giả). Tuy nhiên tỷ lệ nhiễm biến động rất nhiều và là yếu tố chính ảnh hưởng đến giá trị tiên đoán nên người ta không hy vọng thay đổi Se và Sp để cải thiện giá trị này một cách đáng kể.

Ví dụ:

Trở lại nghiên cứu về phương pháp xác định *Trichinella spiralis* bằng phương pháp tiêu cơ (xem như phương pháp chuẩn) và phương pháp ELISA. Giả sử 200 con heo được lấy mẫu để làm ELISA, sau đó giết thú lấy cơ hoành để chẩn đoán bằng phương pháp tiêu cơ, kết quả ghi nhận như sau:

Bảng 7.4 Kết quả xét nghiệm ELISA so với kết quả của phương pháp tiêu cơ để xác định *Trichinella spiralis*

		Phương pháp chuẩn (phương pháp tiêu cơ)		
		Dương tính	Âm tính	Tổng
Phương pháp chẩn đoán cần xác định (ELISA)	Dương tính	29	26	55
	Âm tính	3	142	145
	Tổng	32	168	200

$$Se = 29/32 = 90,625\% \quad Sp = 142/168 = 84,524\%$$

$$AP = 55/200 = 27,5\% \quad PV+ = 29/55 = 52,72\%$$

$$PV- = 142/145 = 97,93\%$$

Có thể tính các giá trị này bằng WinEpiscope bằng cách vào menu “Tests” chọn “Evaluation”. Điền các giá trị tương ứng theo hình 7.2.

5. Tỷ số gần giống

Tỷ số gần giống (likelihood ratio) là một chỉ số cho thấy khả năng sử dụng trong lâm sàng của một xét nghiệm. Chỉ số này diễn đạt mức độ bất thường trên thú có bệnh so

với thú không bệnh khi dùng một xét nghiệm nào đó. Tỷ số gần giống được tính từ 4 giá trị trong bảng 2x2 như khi tính các chỉ tiêu khác của một xét nghiệm (Bảng 7.5). Một xét nghiệm lý tưởng sẽ có tỷ số dương tính gần giống đạt vô hạn và tỷ số âm tính gần giống là zero.

Tỷ số gần giống có vài ưu điểm hơn khi so với các chỉ tiêu khác dùng trong đánh giá khả năng của một xét nghiệm. Tỷ số gần giống chỉ được tính từ độ nhạy và độ chuyên biệt, do đó tỷ số này không bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ mắc bệnh. Tỷ số này cũng hữu ích khi giải thích các kết quả xét nghiệm (hiệu giá huyết thanh hay chỉ tiêu sinh hoá của máu) mà trong đó bệnh có thể xảy ra khi trị số xét nghiệm càng xa trị số bình thường. Thí dụ, bằng cách nói rộng kết quả xét nghiệm từ 2 mức ($\geq 0,35$ và $<0,35$ ở Bảng 7.5) lên 10 mức (Bảng 7.6), khoảng biến động của tỷ số gần giống tăng từ 15 lần (0,32 đến 4,81) lên 327 lần (0,15 đến 49,03). Bằng cách này, kết quả xét nghiệm càng hữu hiệu trong việc xác định bệnh bằng phương cách loại trừ bởi vì chúng ta sử dụng được nhiều thông tin mà những thông tin đó có thể bị mất nếu kết quả được diễn tả là dương tính hay âm tính chỉ với một trị số cắt ngang. Cuối cùng tỷ số gần giống còn được dùng để ước tính xác suất xảy ra thật sự của một bệnh trong một danh sách gồm các bệnh cần phân biệt nếu đã biết xác suất của bệnh trước khi xét nghiệm.

Diagnostic Test Evaluation #1

Input of DATA:

		Disease		
		Yes	No	Total
Test	+	29	26	55
	-	3	142	145
Total		32	168	200

Level of Confidence:

☐ 90 %
☒ 95 %
☐ 97.5 %
☐ 99 %
☐ 99.5 %

RESULTS:

	%	Lower Lim	Upper Lim
Sensitivity	90.625	80.526	100.000
Specificity	84.524	79.055	89.993
True Prevalence	16.000	10.919	21.081
Apparent Prevalence	27.500	21.312	33.688
Predictive Value +	52.727	39.533	65.922
Predictive Value -	97.931	95.614	100.000

	Value	Lower Lim	Upper Lim
Youden's J	0.7515	0.6366	0.8663

Hình 7.2 Kết quả từ chương trình WinEpiscope để so sánh xét nghiệm ELISA với kết quả của phương pháp tiêu cơ để xác định *Trichinella spiralis*

Bảng 7.5 Cách tính tỷ số gần giống của xét nghiệm ELISA để tìm kháng thể chống lại bệnh giả lao ở bò

		Phân lập mẫu phân			
		Có	Không		
E L I S A	+	102	40	142	Tỷ số gần giống cho một xét nghiệm dương tính (102/140)/(40/264) = 4,81
	(≥ 0,35)				
	-	38	224	262	Tỷ số gần giống cho một xét nghiệm âm tính (38/140)/(224/264) = 0,32
	(< 0,35)				
		140	264		

Cách tính tỷ số gần giống dương tính và âm tính của xét nghiệm ELISA để tìm kháng thể chống lại bệnh giả lao ở bò:

Tỷ số gần giống cho một xét nghiệm dương tính ($\geq$ điểm cắt ngang 0,35) = độ nhạy ÷ (1 - độ chuyên biệt), hoặc = tỷ lệ dương tính thật ÷ tỷ lệ dương tính giả.

Tỷ số gần giống cho một xét nghiệm âm tính (ở mức < điểm cắt ngang) = (1 - độ nhạy) ÷ độ chuyên biệt, hoặc = tỷ lệ âm tính giả ÷ tỷ lệ âm tính thật.

Bảng 7.6 Mối quan hệ giữa mật độ quang (OD) của ELISA và khả năng phát hiện *Mycobacterium bovis* trong phân ở bò

Điểm cắt ELISA	Nuôi cấy phân		Tỷ số gần giống	
	Số dương tính	Số âm tính	Giữa các điểm cắt *	$\geq$ Điểm cắt #
< 10	3	39	0,15	1,00
10	16	91	0,33	1,15
20	11	73	0,28	1,70
30	14	33	0,80	3,40
40	20	11	3,43	6,47
50	15	7	4,04	8,43
60	12	5	4,53	11,50
70	9	3	5,66	18,48
80	14	1	26,40	37,71
≥ 90	26	1	49,03	49,03
Tổng cộng	140	264		

Trị số biểu thị kết quả ELISA được diễn đạt là % của OD của huyết thanh dương tính

Nguồn: Spangler, C., Bech-Nielsen, S., Heider, L.E. and Dorn, C.R. 1992. Interpretation of an enzyme-like immunosorbent test using different cut-offs between positive and negative samples for diagnosis of paratuberculosis. Prev. Vet Med. 13: 197-204.

* Tỷ số gần giống giữa các điểm cắt =

$$\frac{\text{Số mẫu ELISA (+)/nuôi cấy phân (+) giữa các điểm cắt}}{\text{Số mẫu ELISA (+)/nuôi cấy phân (-) giữa các điểm cắt}} \div \frac{\text{tổng số mẫu phân nuôi cấy (+)}}{\text{tổng số mẫu phân nuôi cấy (-)}}$$

* Tỷ số gần giống với trị số $\geq$ điểm cắt =

$$\frac{\text{Số mẫu ELISA (+)/nuôi cấy phân (+) ở mức } \geq \text{điểm cắt}}{\text{Số mẫu ELISA (+)/nuôi cấy phân (-) ở mức } \geq \text{điểm cắt}} \div \frac{\text{tổng số mẫu phân nuôi cấy (+)}}{\text{tổng số mẫu phân nuôi cấy (-)}}$$

6. Chọn lựa điểm cắt (cut-off) thích hợp

Trong các xét nghiệm dạng chuỗi, nghĩa là kết quả ở dạng số liệu liên tục chẳng hạn như kết quả OD của phản ứng ELISA, điểm cắt (cut-off) là giá trị quyết định độ nhạy và độ chuyên biệt của xét nghiệm. Như đề cập ở trên thì việc lựa chọn điểm cắt tùy thuộc vào mục đích muốn đạt được độ nhạy cao hay độ chuyên biệt cao trong từng trường hợp cụ thể. Nhưng thông thường thì nên chọn điểm cắt như thế nào là thích hợp nhất. Để giải thích câu hỏi này, ví dụ sau sẽ mô tả cách chọn.

Người ta dùng phản ứng ELISA để phát hiện kháng thể chống *Mycobacterium paratuberculosis* trên bò. Phương pháp phân lập vi khuẩn trong phân được xem là phương pháp chuẩn. Giá trị phần trăm OD mẫu so với dương tính chuẩn là số liệu thu thập được từ phản ứng ELISA. Chọn điểm cắt ở nhiều mức khác nhau và thống kê lại với phương pháp phân lập chúng ta được bảng 7.7

Việc chọn điểm cắt sẽ ảnh hưởng đến độ nhạy và độ chuyên biệt của phản ứng như được trình bày trong bảng trên. Để chọn điểm cắt thích hợp, người ta căn cứ vào các phí tổn gây ra do các kết quả dương tính giả và âm tính giả. Ngoài ra người ta còn sử dụng đường cong ROC (receiver operation characteristic). Biểu đồ này cho thấy tỷ lệ dương tính thật (độ nhạy) trên trục dọc và tỷ lệ dương tính giả (1 - độ chuyên biệt) trên trục ngang. Biểu đồ ROC là một phương pháp đơn giản để đánh giá khả năng của một phương pháp xét nghiệm trong việc phân biệt *khỏe* và *bệnh* khi xét nghiệm đó được thực hiện trong những điều kiện đầy đủ. Ngoài ra, ROC còn được dùng để chọn lựa điểm cắt (ngưỡng quyết định) hoặc dùng để so sánh các xét nghiệm chẩn đoán.

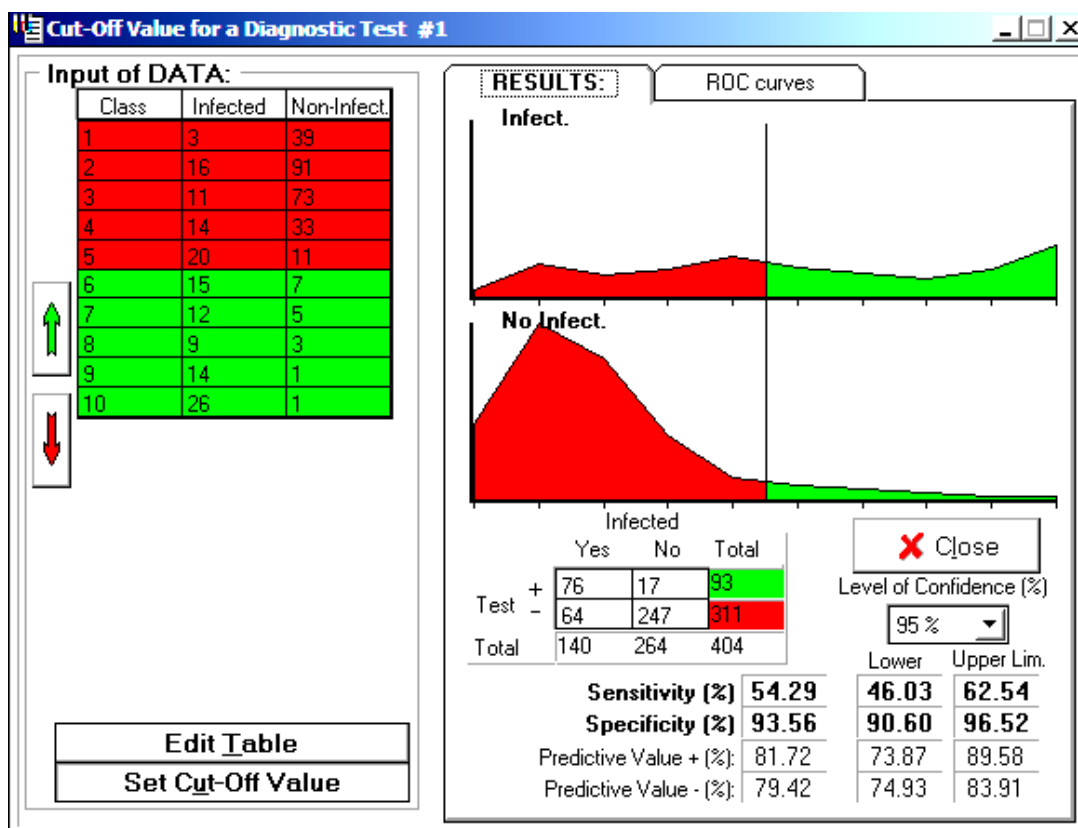
Sự thay đổi các giá trị Se và Sp theo điểm cắt và đường cong ROC có thể tính bằng WinEpisope như sau: vào menu “Tests”, chọn “cut-off value” sau đó nhập số liệu tương ứng.

Một đường cong ROC biểu thị cho số liệu của Bảng 7.7 được vẽ ở hình 7.3. Mỗi điểm trên đường cong xác định đặc tính hoạt động của xét nghiệm dựa trên độ nhạy và độ chuyên biệt. Người đọc sẽ nhận thấy rằng đường cong thật ra chỉ là một loạt các tỷ số gần

giống trong đó trị số của các điểm cắt được dùng như tiêu chuẩn để giải thích kết quả xét nghiệm. Vì tỷ số gần giống không bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ bệnh, đường cong ROC là phương tiện cơ bản trong việc đánh giá và sử dụng các phương pháp xét nghiệm.

Bảng 7.7 Mối quan hệ giữa mật độ quang (OD) của ELISA và độ nhạy và độ chuyên biệt trong xét nghiệm *Mycobacterium bovis* ở bò theo giá trị điểm cắt

Nhóm	%OD	Điểm cắt	Kết quả phân lập		Độ nhạy Se (%)	Độ chuyên biệt Sp (%)
			Số mẫu (+)	Số mẫu (-)		
1	0-10	10	3	39	98	15
2	10-20	20	16	91	86	49
3	20-30	30	11	73	79	77
4	30-40	40	14	33	69	89
5	40-50	50	20	11	54	94
6	50-60	60	15	7	44	96
7	60-70	70	12	5	35	98
8	70-80	80	9	3	29	99
9	80-90	90	14	1	19	99,6
10	90-100	100	26	1	0	100
			140	264		



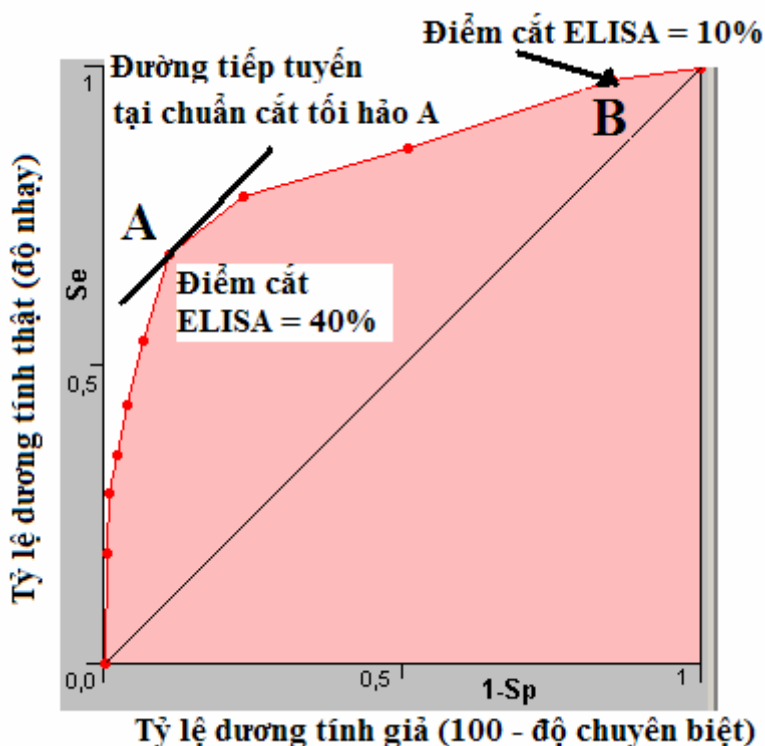
Hình 7.3 Giá trị Se và Sp tại một điểm cắt xác định được tính bằng WinEpiscopo

Điểm cắt dương tính/âm tính thường được dùng để xác định mức kết quả mà dựa vào đó một phương pháp chẩn đoán được thiết lập hoặc bị bác bỏ. Khi xác định điểm cắt tối hảo, người ta cố gắng làm giảm hậu quả của kết luận dương tính giả hay âm tính giả. Về mặt lý tưởng, khi chọn điểm chuẩn dương tính, cần xem xét các yếu tố sau: (1) phân bố của kết quả ở hai quần thể khác nhau - bệnh nhân có vẻ bình thường và bệnh nhân có bệnh, (2) tỷ lệ bệnh trong quần thể khảo sát, và (3) phí tổn do âm tính giả và do dương tính giả. Cách làm trực tiếp nhất là chọn điểm cắt sao cho có sai sót trong chẩn đoán thấp nhất (ít dương tính giả và âm tính giả). Tỷ lệ bệnh phải được biết hoặc được ước tính. Với tỷ lệ bệnh 50%, điểm cắt tối hảo là điểm nằm gần với góc trên phía tay trái của đường cong ROC nơi mà độ nhạy và độ chuyên biệt đạt tối đa, nghĩa là khi (độ nhạy + độ chuyên biệt)/2 có trị số cao nhất. Trong thí dụ ở Bảng 7.6 (tỷ lệ bệnh 34,7%), tổng số chẩn đoán sai thấp nhất khi điểm cắt ELISA ở khoảng 40%.

Một phương cách khác là chọn điểm cắt tại điểm mà hệ số góc của đường cong bằng với trị số của công thức sau:

$$\frac{pD- \times \text{phí tổn của một chẩn đoán dương tính giả}}{pD+ \times \text{phí tổn của một chẩn đoán âm tính giả}}$$

trong đó pD- là tỷ lệ thú khỏe và pD+ là tỷ lệ thú bệnh.



Hình 7.4 Đường cong biểu diễn đặc tính xét nghiệm – đáp ứng (ROC) của xét nghiệm bằng ELISA dùng trong chẩn đoán tình trạng nhiễm *Mycobacterium bovis* ở bò. A và B xác định điểm cắt tối hảo. Tại A, phí tổn do âm tính giả = phí tổn do dương tính giả. Tại B, phí tổn do âm tính giả gấp 10 lần phí tổn do dương tính giả. Điểm cắt ELISA ở khoảng 40% và 10%

Trong thí dụ ở Bảng 7.7, nếu sai lầm trong chẩn đoán âm tính giả và dương tính giả đều gây hậu quả như nhau khi tỷ lệ bệnh 34,7%, điểm cắt tối hảo trên đường ROC sẽ có hệ số góc là $(0,653 \times 1) / (0,347 \times 1) = 1,882$, tương ứng với điểm cắt ELISA 40% (điểm A trong Biểu đồ 7.4). Lúc ấy, độ nhạy của xét nghiệm là 69% và độ chuyên biệt 89%. Nếu âm tính giả gây hậu quả xấu gấp 10 lần dương tính giả (tai hại lớn khi không phát hiện được bệnh dù thú mắc bệnh), điểm cắt sẽ có hệ số góc là $(0,653 \times 1) / (0,347 \times 10) = 0,188$, tương ứng với điểm cắt ELISA 10% (điểm B trong hình 7.4). Khi ấy độ nhạy của xét nghiệm là 98% và độ chuyên biệt 15%. Với thí dụ này, chúng ta chấp nhận một tỷ lệ dương tính giả khá cao bởi vì hậu quả sẽ trầm trọng khi kết quả âm tính giả.

7. Xét nghiệm kết hợp

Đôi khi trong lâm sàng người ta thực hiện nhiều xét nghiệm trên mẫu với mục đích bảo đảm kết quả xét nghiệm. Như vậy, với kiểu xét nghiệm kết hợp này, độ nhạy và độ chuyên biệt chung cho cả xét nghiệm sẽ thay đổi như thế nào. Có hai cách kết hợp là kết hợp song song và kết hợp tuần tự.

Kết hợp song song (parallel testing) là kiểu kết hợp mà 2 xét nghiệm đều được thực hiện trên một mẫu. Kết luận cuối cùng là sự phối hợp kết quả của hai xét nghiệm

trên. Bất cứ một trong 2 hay cả 2 xét nghiệm cho kết quả dương tính thì xem như mẫu được kết luận là dương tính. Như vậy con thú chỉ được cho là âm tính khi cả 2 xét nghiệm đều cho âm tính. Điều này làm cho xét nghiệm kết hợp song song gia tăng độ nhạy một cách đáng kể. Công thức tính độ nhạy và độ chuyên biệt của xét nghiệm song song như sau

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

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

Trong khi đó, kiểu kết hợp tuần tự là 2 xét nghiệm được thực hiện trước sau. Xét nghiệm 1 có độ nhạy cao được thực hiện trước. Những mẫu cho kết quả dương tính mới được tiến hành xét nghiệm 2 (thường có độ chuyên biệt cao). Mục đích chung cho kiểu phối hợp này là làm tăng độ chuyên biệt cho xét nghiệm chung. Công thức tính độ chuyên biệt và độ nhạy của xét nghiệm kết hợp tuần tự như sau

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

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

Ví dụ

Trong một đàn bò sữa 200 con, tỷ lệ bệnh viêm vú khoảng 5%. Dùng xét nghiệm CMT có độ nhạy 86% và độ chuyên biệt 65% để chẩn đoán. Có thể dùng phương pháp phân lập vi sinh vật gây viêm nhiễm trong sữa để chẩn đoán. Phương pháp phân lập này có độ nhạy là 70% và độ chuyên biệt là 89%. Sự kết hợp 2 xét nghiệm này với nhau sẽ làm thay đổi độ nhạy và độ chuyên biệt thế nào?

Kết hợp song song

$$Se_{par} = 1 - (1-Se_1) \times (1-Se_2) = 1 - (1-0,86) \times (1-0,7) = 95,8\%$$

$$Sp_{par} = Sp_1 \times Sp_2 = 0,65 \times 0,89 = 57,85\%$$

Kết hợp tuần tự

$$Se_{Ser} = Se_1 \times Se_2 = 0,86 \times 0,7 = 60,2\%$$

$$Sp_{Ser} = 1 - (1-Sp_1) \times (1-Sp_2) = 1 - (1-0,65) \times (1-0,89) = 96,15\%$$

Có thể tính các giá trị này bằng WinEpiscope như sau: vào menu “Tests”, chọn “Multiple tests” rồi điền các thông số thích hợp

Multiple Diagnostic Test #2

Input of DATA:

Nº of Animals:

Prevalence (%):

Test 1 Test 2

Sensitivity (%):

Specificity (%):

RESULTS: 1

Test 1

Disease			
	Yes	No	Total
Test +	9	66	75
Test -	1	124	125
Total	10	190	200

Predictive Value + (%): 11.450
Predictive Value - (%): 98.880

Test 2

Disease			
	Yes	No	Total
Test +	7	21	28
Test -	3	169	172
Total	10	190	200

Predictive Value + (%): 25.090
Predictive Value - (%): 98.260

RESULTS: 2

PARALLEL Tests

Disease			
	Yes	No	Total
Test +	10	80	90
Test -	0	110	110
Total	10	190	200

Sensitivity (%) **Predictive Value + (%)**
95.800 10.680

Specificity (%) **Predictive Value - (%)**
57.850 99.620

SERIAL Tests

Disease			
	Yes	No	Total
Test +	6	7	13
Test -	4	183	187
Total	10	190	200

Sensitivity (%) **Predictive Value + (%)**
60.200 45.140

Specificity (%) **Predictive Value - (%)**
96.150 97.870

Hình 7.5 Se và Sp của kết quả xét nghiệm kết hợp CMT và phân lập vi khuẩn xác định bằng WinEpiscope

8. Mức độ phù hợp của hai xét nghiệm

Có một loại trắc nghiệm thống kê thường được dùng để kết luận về sự thống nhất trong kết quả của các xét nghiệm. Mức độ thống nhất được gọi là trị số thống kê kappa (K). Trị số K biến động từ -1 (không thống nhất) qua zero (thống nhất do ngẫu nhiên mà thôi) đến +1 (thống nhất hoàn toàn). Thông thường K từ 0 đến 0,2 là nhẹ, 0,2 đến 0,4 = được, 0,4 đến 0,6 = vừa, 0,6 đến 0,8 = nhiều, 0,8 đến 1 = hoàn toàn thống nhất.

Thí dụ về 2 xét nghiệm (ELISA và Knott cải tiến) để đánh giá tình trạng nhiễm giun tim (*Dirofilaria immitis*) ở chó (Bảng 7.2). Tình trạng nhiễm được khẳng định lại bằng phương pháp mổ khám (phương pháp chuẩn), 341 chó nhiễm và 206 chó không nhiễm. Kết quả cho thấy có sự thống nhất nhiều giữa hai phương pháp xét nghiệm. Nên lưu ý rằng tỷ lệ phù hợp và phương pháp thống kê kappa không cho chúng ta biết phương pháp xét nghiệm nào đúng, mà chỉ cho biết sự thống nhất giữa hai phương pháp. Trong nghiên cứu này, 41% (341-201= 140 trong số 341) trường hợp nhiễm giun không được phát hiện bởi phương pháp Knott cải tiến. Trong 140 trường hợp, ELISA phát hiện được 91 trường hợp (65%), con số này thể hiện gần hết kết quả trong ô b.

Bảng 7.8 Bảng 2x2 so sánh sự phù hợp giữa kết quả của phương pháp ELISA và Knott cải tiến trong chẩn đoán bệnh giun tim ở chó

Knott

ELISA	Dương tính	(a) 201	Âm tính	(b) 98	(a+b) 299
	Âm tính	(c) 1	(d) 247	(c+d) 248	
		(a+c) 202	(b+d) 345	(a+b+c+d) 547	

Nguồn: Courtney, C.H., Zeng, Q.Y. and Tonell, Q. 1990. Sensitivity and specificity of the CITE heartworm antigen and a comparison with the Diro check heartworm antigen test. J. Am. Hosp. Assoc. 26: 623-628.

$$\text{Phù hợp quan sát được: } \frac{a+d}{a+b+c+d} = \frac{201 + 247}{547} = 82 \%$$

$$\text{Phù hợp kỳ vọng ở a: } \frac{(a+b) \times (a+c)}{a+b+c+d} = \frac{299 \times 202}{547} = 110$$

$$\text{Phù hợp kỳ vọng ở d: } \frac{(c+d) \times (b+d)}{a+b+c+d} = \frac{248 \times 345}{547} = 156$$

$$\text{Phù hợp kỳ vọng bình quân: } \frac{110+156}{547} = 49\%$$

Sự thống nhất không phải do ngẫu nhiên giữa 2 phương pháp (kappa) :

$$\frac{\text{Phù hợp quan sát} - \text{Phù hợp kỳ vọng b/q}}{100 \% - \text{Phù hợp kỳ vọng b/q}} = \frac{82 - 49}{100 - 49} = 0,65$$

Trên thực tế lâm sàng, nhiều khi chúng ta không biết chính xác độ nhạy và độ chuyên biệt của xét nghiệm đang thực hiện. Nếu một xét nghiệm khác muốn được đưa vào sử dụng chúng ta có thể xem kết quả của nó có tương đồng với xét nghiệm đang được sử dụng, hay không bằng cách tính một chỉ số đặc trưng cho mức độ tương đồng, gọi là chỉ số Kappa. Ngoài ra chúng ta còn có thể dùng chỉ số này để đánh giá kết quả chẩn đoán của 2 người thực hiện trên cùng một xét nghiệm xem có phù hợp nhau không.

Bảng 7.9 Bảng 2x2 so sánh kết quả của 2 phương pháp xét nghiệm

		Xét nghiệm 2 / người chẩn đoán 2		
		<i>Dương tính</i>	<i>Âm tính</i>	Tổng
Xét nghiệm 1 / người chẩn đoán 1	<i>Dương tính</i>	a	b	a+b
	<i>Âm tính</i>	c	d	c+d
	Tổng	a+c	b+d	N

$$\text{Kappa (K)} = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

Trong đó P_o : tỷ lệ quan sát 2 xét nghiệm đều cho kết quả giống nhau (cả hai cùng âm hoặc cùng dương); P_e : tỷ lệ phù hợp mong muốn

$$P_o = (a+d)/n$$

$$P_{e(+)} = (a+b) \times (a+c) / n$$

$$P_{e(-)} = (c+d) \times (b+d) / n$$

$$P_e = [P_{e(+)} + P_{e(-)}] / n$$

Ngoài ra, chỉ số Kappa còn tính được cho các dạng xét nghiệm phân loại. Cách tính này có thể thực hiện dễ dàng bằng phần mềm WinEpiscopo

Ví dụ

Trong một bệnh xá thú y, người ta ghi nhận 120 ca bệnh nghi ngờ viêm phổi trên mèo và được chẩn đoán bằng phương pháp nghe trực tiếp trên lâm sàng. Kết quả ghi nhận từ 2 bác sĩ thú y như sau: bác sĩ thú y 1 cho là 31 con bị viêm phổi (chỉ có 10 con được bác sĩ thú y 2 đồng ý) và 89 con không bị viêm phổi (trong khi bác sĩ thú y 2 cho là có 6 con viêm phổi). Xác định mức độ tương đồng của 2 nhận định từ 2 bác sĩ thú y trên.

Bảng 7.10 Bảng 2x2 so sánh kết quả chẩn đoán viêm phổi trên mèo của 2 Bác sĩ thú y

		Bác sĩ thú y 2		
		<i>bệnh</i>	<i>không bệnh</i>	Tổng
Bác sĩ thú y 1	<i>bệnh</i>	10	21	31
	<i>không bệnh</i>	6	83	89
	Tổng	16	104	120

$$P_o = (a+d)/n = (10+83)/120 = 0,775$$

$$P_{e(+)} = (a+b) \times (a+c) / n = 31 \times 16 / 120 = 4,13$$

$$P_{e(-)} = (c+d) \times (b+d) / n = 104 \times 89 / 120 = 77,13$$

$$P_e = [P_{e(+)} + P_{e(-)}] / n = (4,13+77,13) / 120 = 0,677$$

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e) = (0,775 - 0,677) / (1 - 0,677) = 0,303$$

Kết luận là chẩn đoán của 2 bác sĩ thú y trên không tương đương nhau đối với bệnh viêm phổi trên mèo. Kết quả này có thể được tính bằng WinEpiscope như sau: vào menu “Tests”, chọn “Agreement” điền các thông số trong cửa sổ này. (Hình 7.6)

		Standard Test				Total
		A	B	C	D	
Alternative Test	a	10	21	0	0	31
	b	6	83	0	0	89
	c	0	0	0	0	0
	d	0	0	0	0	0
	Total	16	104	0	0	120

Level of Confidence: ☒ 90 % ☒ 95 % ☐ 97.5 % ☐ 99 % ☐ 99.5 %

RESULTS:

Observed proportion of agreement: 0.775

Expected proportion of agreement: 0.677

Observed minus chance agreement: 0.098

Max. possible agreement beyond chance: 0.323

Calculate Close

Confidence Intervals

Kappa: 0.303

	Lower Lim.	Upper Lim.	
se(0)	0.138	0.468	0.084
se(1)	0.087	0.519	0.110

Hình 7.6 Mức độ phù hợp về chẩn đoán viêm phổi trên mèo của 2 Bác sĩ thú y được tính bằng WinEpiscope

9. Đánh giá các xét nghiệm chẩn đoán ở mức độ đàn

Ở các phần trước chúng ta thường đánh giá Se và Sp cho các xét nghiệm ở mức độ cá thể. Khi đánh giá một đàn gia súc có bệnh hay không, chúng ta phải kiểm tra bệnh trên một số thú đại diện cho đàn. Khi có số lượng thú bệnh vượt qua một giá trị nào đó thì xem như công bố là đàn có bệnh. Chính vì mục đích như vậy mà chúng ta có khái niệm độ nhạy và độ chuyên biệt ở mức độ đàn (HSe và HSp). HSe là xác suất một đàn thật sự nhiễm bệnh được phát hiện là dương tính bằng xét nghiệm. HSp là xác suất mà một đàn không nhiễm bệnh được xác định là âm tính bằng xét nghiệm. Hai giá trị này không chỉ phụ thuộc vào Se và Sp của xét nghiệm dùng mà còn phụ thuộc vào số lượng thú đưa vào xét nghiệm ở mỗi đàn và *giá trị thú dương tính ngưỡng* để kết luận đàn nhiễm bệnh (chẳng hạn như nếu kiểm tra 10% đàn mà có 5 con dương tính thì coi như đàn nhiễm bệnh - thường thì người ta chọn là 1).

Nếu một đàn có tỷ lệ nhiễm thật sự dự đoán là P, AP là tỉ lệ bệnh biểu kiến dựa xét nghiệm có độ nhạy và độ chuyên biệt là Se và Sp, “n” là số thú chọn xét nghiệm cho đàn thì độ nhạy và độ chuyên biệt ở mức độ đàn được tính theo công thức sau.

$$HSp = Sp^n$$

$$HSe = 1 - (1-AP)^n$$

$$AP = Se \times P + (1-Sp) \times (1-P)$$

10. Sai lệch trong đánh giá các xét nghiệm

10.1 Tính tương đối và tuyệt đối của độ nhạy và độ chuyên biệt

Rất khó xác định tình trạng bệnh thật sự của những thú dùng trong việc chuẩn hoá các xét nghiệm. Tuy nhiên, *độ nhạy tương đối* và độ chuyên biệt của một xét nghiệm có thể được ước tính bằng cách so sánh kết quả của xét nghiệm này với kết quả của các xét nghiệm đã được dùng như xét nghiệm 'chuẩn' trong nhiều năm. Cách này có thể được dùng bởi các thú y viên để so sánh xét nghiệm huyết thanh và kỹ thuật Knott truyền thống trong định bệnh giun tim chó. Khi không có xét nghiệm chuẩn, sự so sánh khả năng của một xét nghiệm này với một xét nghiệm khác được xem như đo lường *sự phù hợp* mà không là đo lường sự chính xác. So sánh độ chính xác tương đối của một xét nghiệm này so với xét nghiệm khác chỉ có giá trị khi biết chính xác tình trạng sức khỏe của thú được xét nghiệm.

Trong việc đánh giá xét nghiệm ELISA ở bò nhiễm *M. paratuberculosis*, khả năng của xét nghiệm chỉ có tính tương đối mà không tuyệt đối vì bản thân xét nghiệm chuẩn - phân lập từ phân, đã có khuynh hướng sai lệch. Tuy nhiên, tiêu chuẩn cứng rắn trong việc xác định đàn bò không bị nhiễm (đàn bò có lịch sử âm tính trong 15 năm, kết quả âm tính khi phân lập vi khuẩn từ phân, không có những dấu hiệu bệnh và kết quả âm tính khi phân lập vi khuẩn từ ít nhất 3 mẫu sữa) đã cho thấy không có sai lệch trong nghiên cứu này.

10.2 Tính đa dạng của thú bệnh

Độ nhạy và độ chuyên biệt phải được xác định với một quần thể thích hợp. Cần thực nghiệm độ nhạy trên nhiều loại thú bệnh, và độ chuyên biệt cũng được xác định với nhiều loại thú không bệnh.

Thách thức đối với nhóm thú bệnh là phát hiện liệu (và khi nào) xét nghiệm tạo nên kết quả âm tính giả. Thú bệnh nên gồm các cá thể có nhiều dạng bệnh lý lâm sàng và kể cả những cá thể có bệnh lý phức tạp đến nỗi có thể gây nên kết quả âm tính giả.

Thách thức đối với nhóm thú không bệnh là xác định liệu (và khi nào) xét nghiệm tạo nên kết quả dương tính giả. Cần phân biệt xét nghiệm sàng lọc (thực hiện ngẫu nhiên trên đàn thú có vẻ khỏe mạnh bên ngoài) và xét nghiệm chẩn đoán (thực hiện trên nhóm thú có dấu hiệu lâm sàng giống nhau). Với xét nghiệm sàng lọc, thú có vẻ bên ngoài khỏe mạnh được dùng như thú không bệnh. Trong xét nghiệm chẩn đoán, thú không bệnh nên gồm những thú không có bệnh mà xét nghiệm cần được đánh giá nhưng có những bệnh khác mà những bệnh đó được chú ý trong chẩn đoán phân biệt.

10.3 Sai lệch liên quan đến kết quả xét nghiệm dương tính hay âm tính

Sai lệch có thể xảy ra khi kết quả của xét nghiệm - dương tính hay âm tính, và

tình trạng bệnh - hiện diện hay không hiện diện, không được xác định độc lập. Hai sai lệch đầu xảy ra khi kết quả xét nghiệm đã có trước khi chẩn đoán được tiến hành.

Sai lệch gia công (work-up bias) xảy ra khi đã có kết quả xét nghiệm thì mới tiến hành chẩn đoán. Như thế kết quả đã có sẽ ảnh hưởng đến khả năng chẩn đoán. Chẳng hạn, khi đã biết kết quả trước đó là dương tính thì người ta cố gắng theo đuổi chẩn đoán và như thế làm tăng khả năng phát hiện bệnh nếu có bệnh thật sự.

Sai lệch duyệt lại (review bias) xảy ra sau khi đã chẩn đoán và kết quả chẩn đoán ảnh hưởng đến tiến trình xem xét số liệu. Chẳng hạn, kết quả huyết thanh học dương tính có thể ảnh hưởng đến cách giải thích kết quả X quang lồng ngực thường được dùng để hỗ trợ cho chẩn đoán tình trạng giun tim không rõ ràng.

Sai lệch phối hợp (incorporation bias) xuất hiện khi xét nghiệm được đánh giá nhưng lại được dùng để chẩn đoán chính bệnh đó.

Tính đa dạng của bệnh, chẳng hạn phân bố của các giai đoạn bệnh trong quần thể có thể ảnh hưởng đến sự đo lường độ nhạy và độ chuyên biệt của xét nghiệm.

11. Các xét nghiệm chẩn đoán khác

Bệnh nhiễm trùng hay không nhiễm trùng có thể được chẩn đoán cho cá thể hoặc quần thể. Chẩn đoán cho quần thể là một phần quan trọng trong dịch tễ học, đặc biệt khi quần thể được kiểm tra sàng lọc. Ở đây, chúng ta thảo luận về chẩn đoán bệnh nhiễm trùng bằng huyết thanh học, nhưng nhiều nguyên tắc và phương pháp có thể được mở rộng cho các phương pháp chẩn đoán khác và các tình huống khác.

11.1 Dịch tễ huyết thanh học

Dịch tễ huyết thanh học chú trọng điều tra về tình trạng nhiễm trùng và bệnh trong quần thể bằng cách đo lường các biến số của máu. Một trong những thành phần chính của máu thường được đo lường là kháng thể đặc hiệu. Sự hiện diện của kháng thể cho thấy có sự tiếp xúc với tác nhân gây bệnh trong quá khứ hay hiện tại.

Phương pháp thống kê dùng để phân tích kết quả trong đo lường kháng thể cũng giống phương pháp thống kê dùng phân tích những chỉ tiêu huyết học khác như chất khoáng hoặc enzym. Trong trường hợp đo lường chất khoáng hoặc enzym, kết quả có thể được so sánh với các khoảng trị số tham khảo. Các trị số tham khảo này bao gồm (1) trị số trung bình ± 2 SD cho số liệu có phân phối chuẩn (lấy từ quần thể bình thường) và (2) 95% trị số ở giữa (từ phân vị thứ 2,5 đến phân vị thứ 97,5) của dãy số liệu lấy từ quần thể bình thường khi số liệu không phân bố chuẩn. Mặc dù các trị số tham khảo đã được ấn hành, mỗi phòng thí nghiệm nên thiết lập bảng trị số tham khảo cho chính mình. Nếu số liệu đo lường có phân phối chuẩn (hoặc được chuyển dạng thành phân phối chuẩn), trắc nghiệm t một yếu tố có thể được áp dụng để so sánh trị số của mẫu với trị số của quần thể tham khảo. Ngoài ra, phương pháp phi tham số một yếu tố có thể phù hợp.

Chẩn đoán huyết thanh học về bệnh dựa vào sự phát hiện kháng thể/kháng nguyên. Phần thảo luận sau đây chú trọng số liệu liên quan đến kháng thể.

11.2. Xét nghiệm kháng thể

*** Phương cách diễn đạt lượng kháng thể**

Lượng kháng thể được diễn đạt là hiệu giá kháng thể. Đó là độ pha loãng cao nhất của huyết thanh để có phản ứng xét nghiệm. Như thế, nếu độ pha loãng 1/32 cho phản ứng xét nghiệm thì hiệu giá kháng thể là 1/32. Khi thú có phản ứng huyết thanh âm tính trước kia và sau đó lại có phản ứng huyết thanh dương tính, ta gọi là chuyển đổi huyết thanh (seroconverted).

- **Chuyển dạng logarit của hiệu giá**

Huyết thanh thường được pha loãng một loạt theo hình học, nghĩa là pha loãng liên tục theo một tỷ số cố định. Tỷ số thông thường là 2. Như thế huyết thanh pha loãng 1/2, 1/4, 1/8, 1/32... Điều này cho thấy hiệu giá có thể được đo lường theo hệ thống logarit. Có hai lý do cho cách đo lường này:

- Phân bố tần số của hiệu giá thường gần như phân phối chuẩn của log; do đó trắc nghiệm thống kê với giả định phân phối chuẩn có thể được áp dụng.

- Đó là một loạt pha loãng hình học với khoảng pha loãng đều nhau theo hệ thống logarit. Như thế, độ pha loãng 1/2, 1/4, 1/8, 1/16... tương ứng với chuyển dạng thành $\log_2$. $\log_2$ của nghịch đảo của độ pha loãng sẽ là 1, 2, 3, 4.... Độ pha loãng có thể được mã hoá giống các trị số 1, 2, 3, 4... này. Trong vài trường hợp, nồng độ huyết thanh cao có thể cho phản ứng không đặc hiệu, khi ấy huyết thanh lúc đầu có thể pha loãng bằng $\log_{10}$ và sau đó pha loãng theo $\log_2$, như vậy độ pha loãng là 1/10, 1/20, 1/40, 1/80...

- **Hiệu giá trung bình**

Nếu có vài trị số hiệu giá được mã hoá như trên, trung bình số học của chúng có thể được tính. Đơn giản là lấy tổng của các trị số và chia cho số mẫu. Thí dụ, 5 trị số hiệu giá 1/2, 1/4, 1/2, 1/8 và 1/4; hiệu giá mã hoá tương ứng sẽ là 1, 2, 1, 3 và 2; khi ấy trung bình mã hoá số học là $(1+2+1+3+2)/5 = 1,8$.

Hiệu giá trung bình hình học (geometric mean titre, GMT) là đôi $\log_2$ của trung bình mã hoá. Thí dụ, nếu trung bình số học của vài hiệu giá mã hoá là 4,7; như thế $\log_2 \text{GMT} = 4,7$ và $\text{GMT} = 2^{4,7} = 26$.

Nếu độ pha loãng ban đầu là $\log_{10}$ rồi sau đó pha loãng theo $\log_2$, các trị số phải chia cho 10 trước khi lấy $\log_2$. Thí dụ, độ pha loãng 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 sẽ được mã hoá là 0, 1, 2, 3 (1/10 được mã hoá 0 vì nó tương đương huyết thanh không pha loãng). Trung bình số học sẽ là 1,5; $\text{GMT}/10 = 2^{1,5} = 2,8$ và $\text{GMT} = 28$.

Log của zero là vô cực âm. Do đó khi tính trung bình của hiệu giá mã hoá, chỉ có thể tính từ hiệu giá của thú có phản ứng huyết thanh dương tính. Có thể cộng tất cả các trị số (âm tính cũng như dương tính) với 0,5 hoặc 1 trước khi chuyển dạng. Khi so sánh hiệu giá kháng thể, hai chỉ tiêu cần phải tính là tỷ lệ thú có phản ứng huyết thanh dương tính và GMT.

- *** Xét nghiệm**

Hai hệ thống thường được dùng là thử độ pha loãng đơn loạt (single serial dilution assay) và thử độ pha loãng đa loạt (multiple serial dilution assay). Hệ thống thứ nhất thường được dùng hơn.

Cả hai hệ thống đều sử dụng pha loãng hình học (logarit). Khoảng pha loãng tùy thuộc độ nhạy của xét nghiệm. Độ nhạy ở đây được xem là khả năng phát hiện lượng kháng thể hoặc kháng nguyên. Xét nghiệm càng nhạy thì kháng thể/kháng nguyên có thể được phát hiện với lượng càng nhỏ. Do đó độ nhạy ở đây được gọi chính xác là *độ nhạy phân tích*, còn độ nhạy của một xét nghiệm chẩn đoán gọi là độ nhạy chẩn đoán.

- **Thử độ pha loãng đơn loạt**

Trong hệ thống thử độ pha loãng đơn loạt, mỗi độ pha loãng được thử chỉ một lần. Thí dụ trong phản ứng HI, độ pha loãng cao nhất để ngăn cản sự ngưng kết của hồng cầu là hiệu giá ức chế ngưng kết. Đây là dạng đo lường tương đối không mạnh. Nếu hiệu giá là 1/32, điều đó ám chỉ rằng 1/31 sẽ không tạo nên ảnh hưởng. Tuy nhiên, vì 1/16 là độ pha loãng kế cận thấp nhất được thử, hiệu giá thật sự có thể nằm giữa 1/17 và 1/32. Như thế, loại hiệu giá này chỉ thể hiện khoảng pha loãng và có thể được diễn tả là 'lớn hơn' hoặc 'nhỏ hơn', chẳng hạn $<1/8$, $>1/256$. Số liệu dạng này chính là dạng thứ tự.

- **Thử độ pha loãng đa loạt**

Trong hệ thống thử đa loạt, mỗi độ pha loãng được thử vài lần (thường được thử ít nhất 5 lần). Mục tiêu là đo lường tốt hơn. Điểm cuối là độ pha loãng của một chất mà ở đó một số thành viên của nhóm thú được xét nghiệm biểu lộ một hậu quả cụ thể (chẳng hạn chết hoặc sống). Điểm cuối thường được dùng và hữu ích trong xử lý thống kê là 50%. Chẳng hạn, độc tính của một loại thuốc có thể được diễn tả là LD₅₀ (lethal dose₅₀), đó là lượng thuốc có thể giết chết 50% số thú được xét nghiệm.

Hiệu giá cuối 50% cũng được dùng để ước tính lượng kháng thể, ở đó hiệu giá kháng thể dùng để chỉ độ pha loãng huyết thanh sao cho ngăn cản được ảnh hưởng lên 50% thành viên của nhóm xét nghiệm. Ảnh hưởng đó được tạo nên bởi tác nhân gây bệnh và tác nhân này kích thích tạo nên kháng thể được xét nghiệm. Thí dụ, độ pha loãng huyết thanh để ngăn ngừa sự nhiễm trùng bởi nồng độ chuẩn của virus trên 50% mô cấy có thể được ước tính bằng 'liều tác dụng₅₀' (effective dose₅₀, ED₅₀). Vài phương pháp tính ED₅₀ được đề nghị, bao gồm phương pháp Reed-Muench và phương pháp Spearman-Kärber. Phương pháp Reed-Muench không được khuyến cáo dùng vì không thể đánh giá độ chính xác và ít hữu hiệu bằng phương pháp khác. Phương pháp thứ nhì (Spearman, 1908; Karber, 1931) gồm các phép tính đơn giản sau đây.

Thí dụ về cách định hiệu giá Spearman-Kärber cho kháng thể chống lại một virus. Đáp ứng cần đo lường là tác dụng gây bệnh lý (cytopathic effect, CPE) của virus trên tế bào mô cấy. Huyết thanh cần xét nghiệm được pha loãng theo log₂. Một phần mười ml của mỗi độ pha loãng được đưa vào 5 lớp tế bào cấy. Các tế bào được ủ với một liều virus có khả năng gây bệnh như nhau. Điểm cuối 50% là độ pha loãng của huyết thanh ở đó CPE xảy ra trong 50% lớp tế bào. Bảng 7.11 trình bày kết quả xét nghiệm.

Bảng 7.11 Thí dụ của cách định hiệu giá điểm cuối 50%

Độ pha loãng huyết thanh	Log ₁₀ của pha loãng	Số lớp tế bào có CPE	Số lớp tế bào nguyên vẹn	Tỷ lệ dương tính (nguyên vẹn) P	1 - P
1/1	0,0	0	5	1,0	0,0
1/2	- 0,3	0	5	1,0	0,0
1/4	- 0,6	0	5	1,0	0,0
1/8	- 0,9	1	4	0,8	0,2
1/16	- 1,2	1	4	0,8	0,2
1/32	- 1,5	3	2	0,4	0,6
1/64	- 1,8	4	1	0,2	0,8
1/128	- 2,1	5	0	0,0	1,0

Theo công thức của Spearman-Kärber, có thể tính ED₅₀ như sau:

$$\log ED_{50} = L - d(\sum P - 0,5)$$

Trong đó

L = độ pha loãng (log) cao nhất ở đó tất cả các tế bào sống sót nguyên vẹn

d = log của mức khác biệt giữa các độ pha loãng

$\sum P$ = tổng của các tỷ lệ của phản ứng dương tính (dương tính = tế bào nguyên vẹn) được tính từ độ pha loãng cao nhất để cho *một* kết quả dương tính đến độ pha loãng cao nhất để cho *tất cả* các kết quả dương tính ($P = 1$)

từ Bảng 9.4 ta có:

$$L = - 0,6$$

$$d = \log_{10} 2 = 0,3$$

$$\sum P = 0,2 + 0,4 + 0,8 + 0,8 + 1,0 = 3,2$$

do đó:

$$\log_{10} ED_{50} = -0,6 - [0,3 (3,2 - 0,5)] = -1,4$$

suy ra: ED₅₀ = đối log của -1,4 = 1/đối log 1,4 = 1/25,1

Như thế 0,1 ml của huyết thanh chứa 25,1 ED₅₀ và 1 ml chứa 251 ED₅₀.

Sai số của ED₅₀ được tính theo công thức:

$$SE (\log_{10} ED_{50}) = d \sqrt{\sum [P(1-P)] / (n-1)} \quad \text{trong đó } n = \text{số mẫu trong mỗi nhóm}$$

$$SE (\log_{10} ED_{50}) = 0,3 \sqrt{[(0,2 \times 0,8) + (0,4 \times 0,6) + (0,8 \times 0,2) + (0,8 \times 0,2)] / (5-1)} = 0,13$$

Ngày nay, phương pháp thử độ pha loãng đa loạt ít thông dụng hơn trước kia vì mắc tiền, chậm hơn phương pháp thử độ pha loãng đơn loạt và hiệu giá chỉ được định trên từng độ pha loãng. Tuy nhiên, chúng vẫn giữ vai trò quan trọng trong đo lường hiệu lực vắc-xin.

11.3 Tỷ lệ của huyết thanh được phát hiện kháng thể

Sự hiện diện của kháng thể là một chỉ dẫn cho thấy thú hoặc mẹ nó có tiếp xúc với kháng nguyên. Khi không còn tiếp xúc với kháng nguyên, lượng kháng thể sẽ giảm. Tốc độ giảm có thể được đo lường và xem như là thời gian bán rã của kháng thể (thời gian để lượng kháng thể còn một nửa).

Hiệu giá của vài kháng thể tồn tại trong một thời gian khá dài vì kháng thể có thời gian bán rã dài hoặc thú tiếp xúc dai dẳng với kháng nguyên (chẳng hạn nhiễm trùng dai dẳng). Thời gian bán rã dài là yếu tố quan trọng trong đánh giá tính hữu hiệu của một vắc-xin hoặc của miễn nhiễm thụ động ở thú non. Tuy nhiên, người ta ít ước lượng thời gian bán rã của kháng thể trong nhiễm trùng tự nhiên.

Khi xét lượng kháng thể của thú trong một quần thể, thú thường được chia hạng là ‘dương tính’ hoặc ‘âm tính’. Điểm cắt của hiệu giá (bên dưới điểm cắt là âm tính và bên trên điểm cắt là dương tính) thường được xác định bằng phương pháp như đã thảo luận.

Tỷ lệ của huyết thanh được phát hiện kháng thể tùy thuộc tỷ lệ nhiễm trùng, tốc độ mất kháng thể và thời điểm mà tốc độ mất kháng thể đang xảy ra. Do đó khi nhiều mẫu huyết thanh được phát hiện kháng thể, điều này không có nghĩa là tỷ lệ nhiễm trùng cao mà có thể do tốc độ mất kháng thể chậm.

Nếu hiệu giá không được diễn đạt ở dạng ‘lớn hơn hoặc nhỏ hơn’ mà được trình bày ở nhiều mức khác nhau, log của hiệu giá có thể xem như gần phân phối chuẩn. Khi ấy, ta có thể tính trung bình, độ lệch chuẩn và khoảng tin cậy của các hiệu giá. Tuy nhiên, nếu log của hiệu giá không phân phối chuẩn, có thể tính trung vị và khoảng phân vị.