TESTES DE DIAGNÓSTICO

Conceitos de validação
Características
Utilização em função do contexto epidemiológico

José Soares Ferreira Neto
Professor Titular VPS-FMVZ-USP
Centro Colaborador em Saúde Animal do MAPA

Conceitos de validação

Características

Utilização em função do contexto epidemiológico

O que é um teste?

- Qualquer dispositivo/processo desenvolvido para detectar um sinal, substância, alteração tecidual ou resposta.
- Distinguir infectados de não infectados.
- Tem que ser melhor que processo ao acaso.

resultados expressos em escalas:

- dicotômicas:
  - presença de sinal clínico (sim/não)
  - prenhez (sim/não)
  - isolamento viral (sim/não)
  - Positivo/negativo
- ordinais:
  - título sorológico (1:4, 1:8, 1:16 etc)
- contínuas:
  - contagem de células brancas
  - tamanho da reação tuberculínica

“A despeito do que creem os leigos, o resultado de um teste pode estar errado”

Ian Gardner/Matthias Greiner

erros

- pré-analíticos:
  - identitificação do animal
  - mistura de amostras
  - contaminação
  - conservação da amostra (cadeia de frio)
- analíticos:
  - pipetagem
  - medida de reagentes
  - calibração de equipamentos
  - deterioração de reagentes
- pós-analíticos:
  - identificação das amostras
  - interpretação

conceitos

- ## validade ou acurácia

Capacidade do teste identificar infectados (**S**) e não infectados (**E**). Condição verdadeira definida pelo Gold Standard.

Sobre o gold standard:

deveria ser: método ou combinação de métodos de diagnóstico que determina ***de forma inequívoca*** a presença ou ausência de infecção/doença em um indivíduo.

entretanto é: o método diagnóstico mais confiável disponível.

mais conceitos

► precisão

Capacidade do teste produzir resultados consistentes quando repetido sob as mesmas condições e interpretado sem conhecer resultado anterior. Pode ser afetada por:

- condições do animal e do laboratório,
- variação de interpretação entre pessoas,
- variação de interpretação da mesma pessoa em diferentes momentos

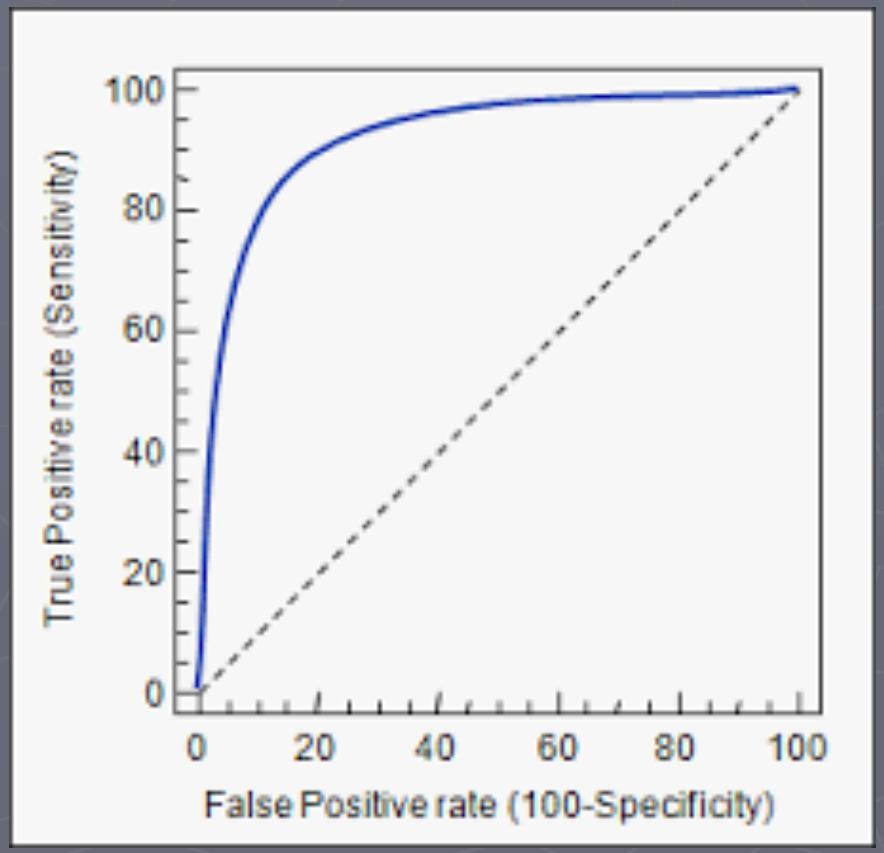
medidas de precisão

REPETIBILIDADE: grau de variação dentro de um laboratório (mesmo ensaio, dia a dia, teste a teste). Pode ser expresso pelo desvio padrão.

REPRODUTIBILIDADE: grau de variação entre laboratórios. Pode ser expresso pelo desvio padrão.

... ainda conceitos

- ROC analysis (receiver operating characteristic)



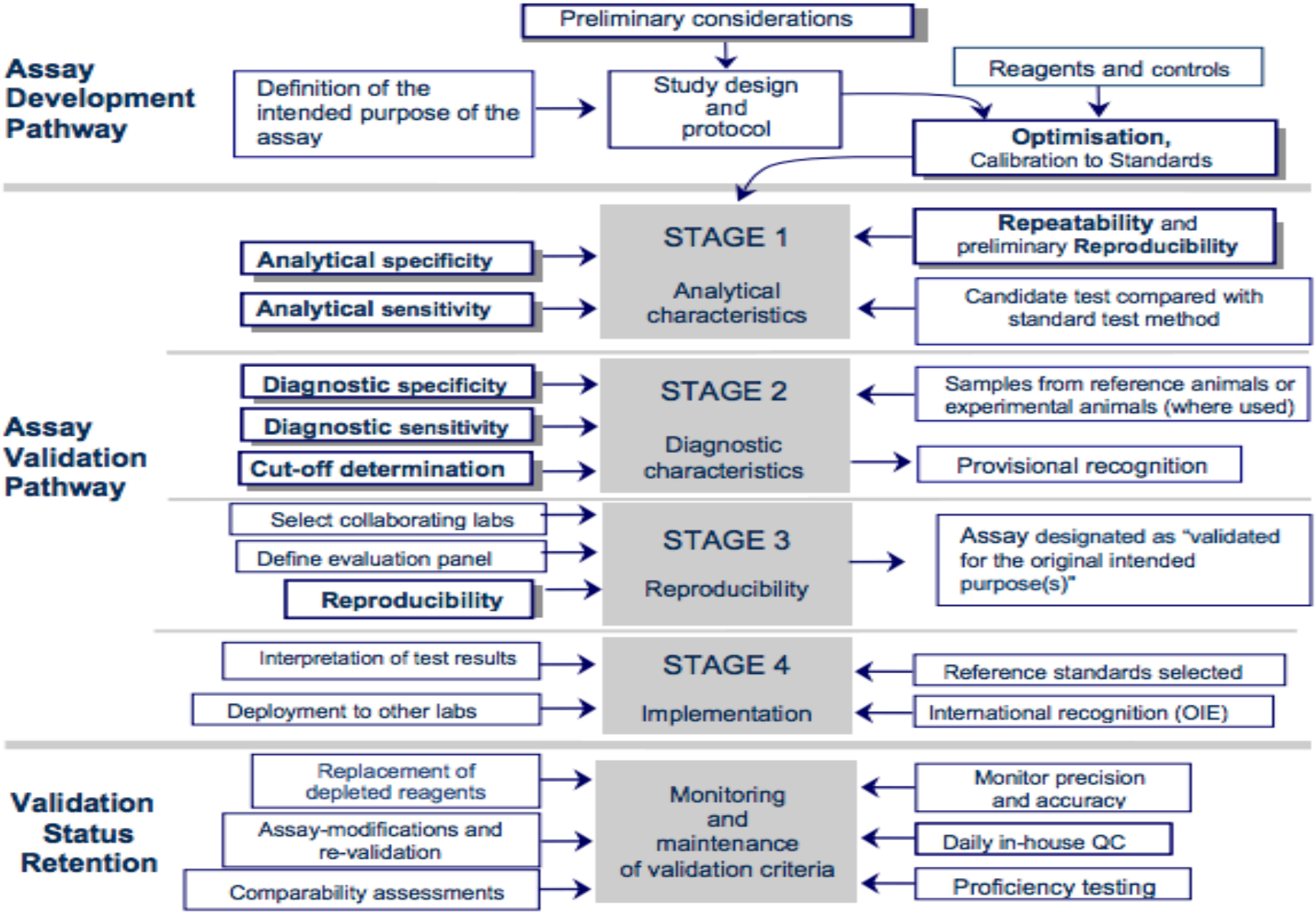


Figure 1. *The assay development and validation pathways with assay validation criteria highlighted in bold typescript within shadowed boxes.*

Conceitos de validação

Características

Utilização em função do contexto epidemiológico

Roteiro

- O diagnóstico como probabilidade de acerto – erros de diagnóstico
- Conceitos de sensibilidade e especificidade
- Conceito de valor preditivo de um teste
- Consequências da alteração do ponto de corte do teste
- Efeito da prevalência nos valores preditivos – implicações no delineamento de estratégias sanitárias
- Utilização de testes múltiplos para melhorar o diagnóstico
- Reteste periódico de rebanhos
- Sensibilidade e Especificidade agregadas

Razões para utilizar um teste de diagnóstico

- Para **confirmar a presença** de uma doença em um animal ou população
- Para estimar a **prevalência** de uma doença em uma população
- Para **confirmar a ausência** de uma doença em um animal ou população

Exemplo: diagnóstico de tuberculose bovina utilizando tuberculinização simples

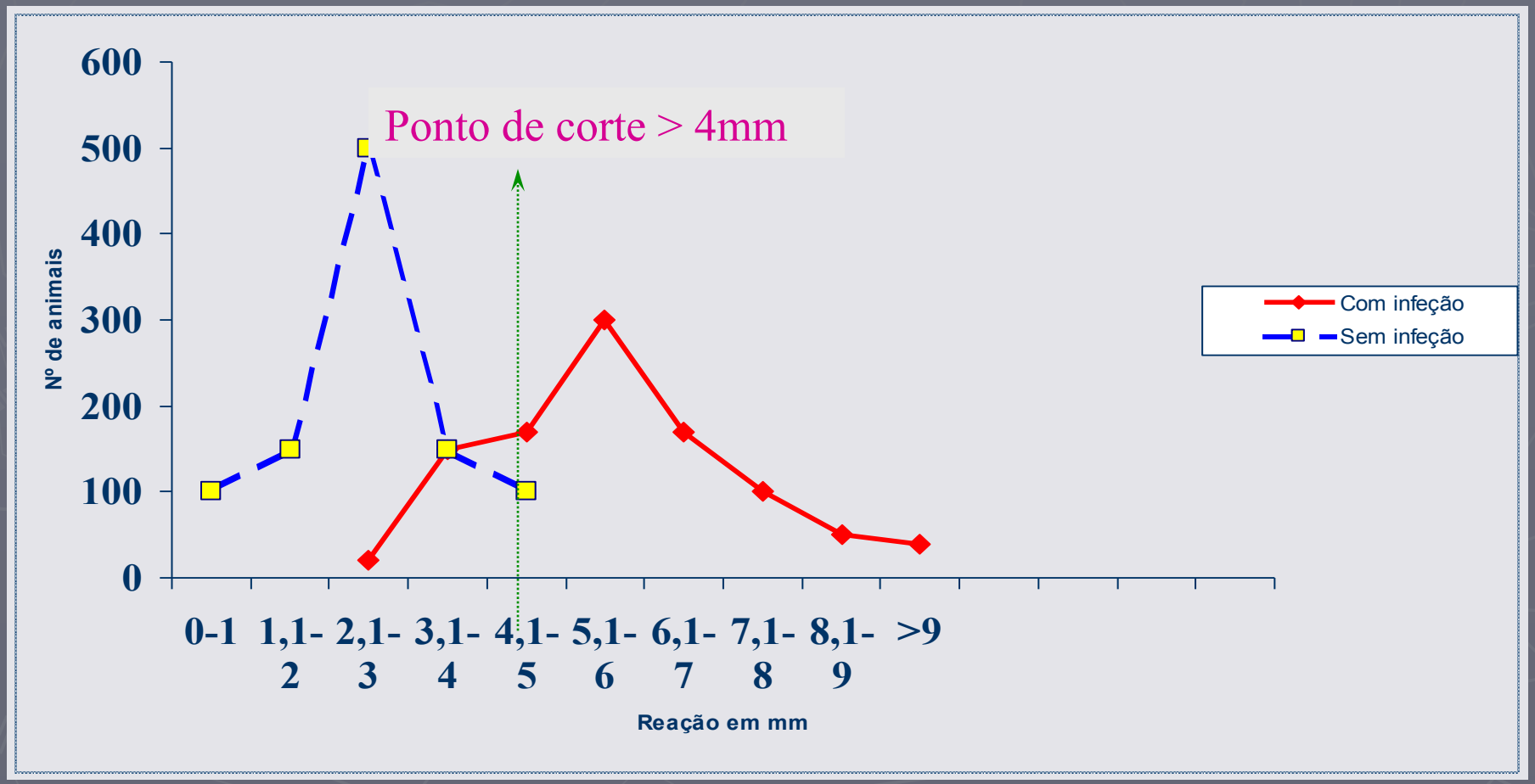
Valores observados em animais sem infecção (situação simulada)

Reação em mm	*Frequência*	*%*	*Freq. cumulativa*	*Freq. cumulativa %*
0.0-1,0	100	10.0	100	10.0
1,1-2,0	150	15.0	250	25.0
2,1-3,0	500	50.0	750	75.0
3,1-4,0	150	15.0	900	90.0
4,1-5,0	100	10.0	1000	100.0
5,1-6,0	0	0.0	1000	100.0
6,1-7,0	0	0.0	1000	100.0
7,1-8,0	0	0.0	1000	100.0

Valores observados em animais com infecção confirmada por M. bovis

Reações em mm	*Frequência*	*%*	*Freq. cumulativa*	*Cumulativa %*
0,0-1,0	0	0.0	0	0.0
1,1-2,0	0	0.0	0	0.0
2,1-3,0	20	2.0	20	2.0
3,1-4,0	150	15.0	170	17.0
4,1-5,0	170	17.0	340	34.0
5,1-6,0	300	30.0	640	64.0
6,1-7,0	170	17.0	810	81.0
7,1-8,0	100	10.0	910	91.0
8,1-9,0	50	5.0	960	96.0
9,1-20,0	40	4.0	1000	100.0

Resultados de tuberculinização em animais com e sem infecção



Conclusão

- Quando o diagnóstico é medido em uma escala contínua, existe sempre sobreposição de resultados do diagnóstico entre a população de animais infectados e a população de animais não infectados

- Portanto, um diagnóstico é um processo imperfeito, resultando em **probabilidade**, e não certeza, de identificar corretamente o estado de saúde do animal

Diagnóstico vs. situação real

		DOENÇA/**INFEÇÃO** (*gold standard*)	
		Presente	***Ausente***
TESTE	***Positivo***	Verdadeiro Positivo	Falso Positivo
	Negativo	Falso negativo	Verdadeiro Negativo

Diagnóstico vs. situação real

	Com *Infecção*	***Sem*** *Infecção*	*Total*
Teste ***Positivo***	a	b	a+b
Teste ***Negativo***	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

Definições

- ***Prevalência "real"***: proporção de animais com a doença = **(a+c)/N**
- ***Prevalência "aparente"***: proporção de animais com resultado de teste positivo = **(a+b)/N**

- ***Sensibilidade***: probabilidade de um animal infectado ser classificado como positivo no teste = **a/(a+c)**; é o inverso do *índice de falsos negativos*
- ***Especificidade***: probabilidade de um animal não infectado ser classificado como negativo no teste = **d/(b+d)**; é o inverso do *índice de falsos positivos*

e mais definições...

- ***Valor preditivo negativo***: proporção de animais negativos que estão não estão infectados = d/(c+d)

- ***Valor preditivo positivo***: proporção de animais positivos que estão infectados = a/(a+b)

Diagnóstico vs. situação real

	Com *Doença*	***Sem*** *Doença*	*Total*
Teste ***Positivo***	a	b	a+b
Teste ***Negativo***	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

Diagnóstico de tuberculose bovina utilizando tuberculinização simples (simulação)

Animais com reação >4,0mm ***(ponto de corte)*** considerados positivos

	Com infecção	*Sem infecção*	*Total*
Teste positivo	830	100	930
Teste negativo	170	900	1070
Total	1000	1000	2000

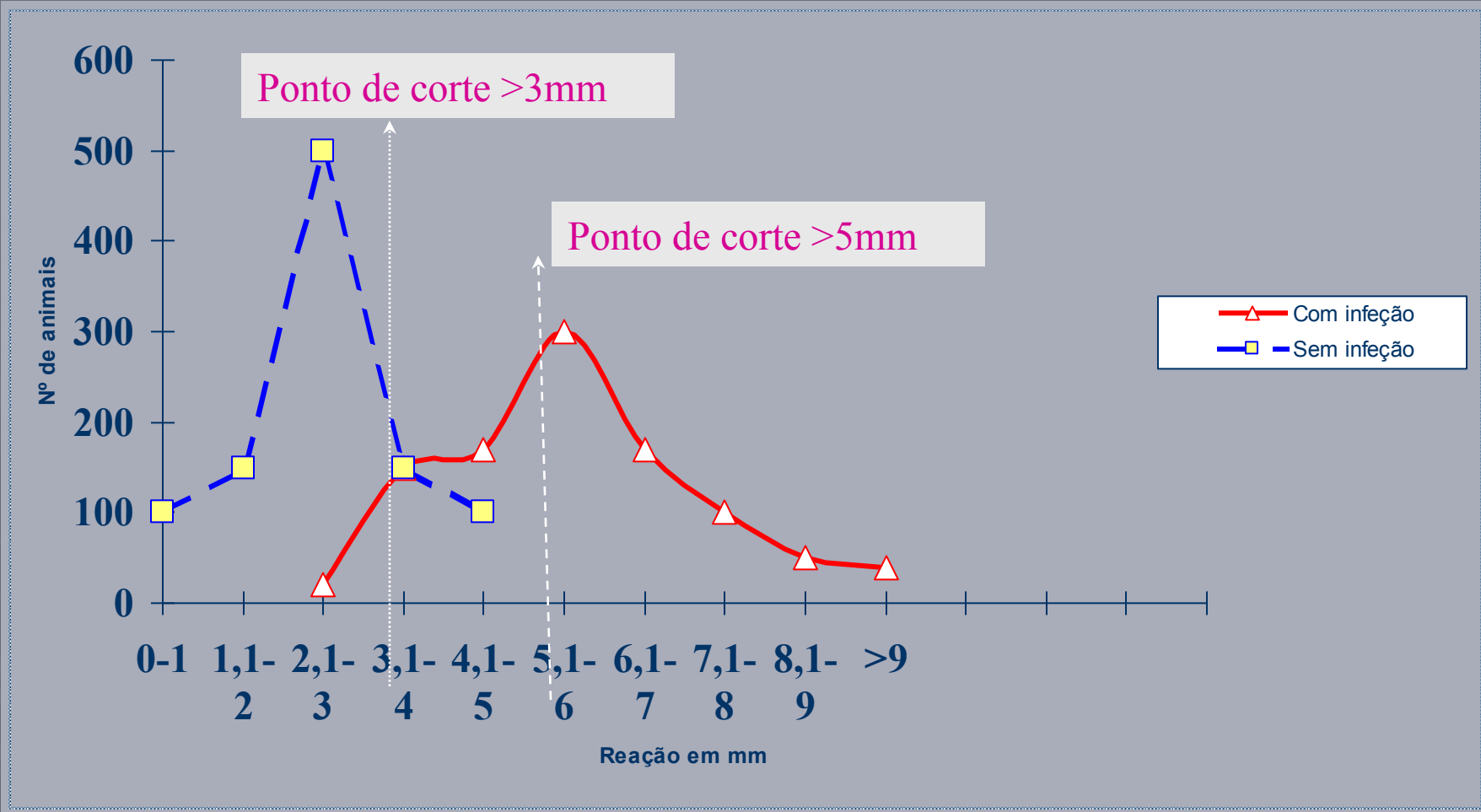
Qual foi a performance do teste?

- *Sensibilidade* (SEN): 830/1000 = 0,83 ou 83%
- *Especificidade* (ESP): 900/1000 = 0,90 ou 90%

- *Prevalência aparente* (PA): 930/2000 = 0,47 ou 47%
- *Prevalência real* (P): 1000/2000 = 0,50 ou 50%

- *Valor preditivo positivo* (VPP): 830/930 = 0,89 ou 89%
- *Valor preditivo negativo* (VPN): 900/1070 = 0,84 ou 84%

Resultados de tuberculinização em animais com e sem infecção (simulação)



Efeito de pontos de corte diferentes (*)

Ponto de corte	*SEN*	*ESP*	*PA*	*VPP*	*VPN*
3,1mm	0,98	0,75	0,62	0,80	0,98
4,1mm	0,83	0,90	0,47	0,89	0,84
5,1mm	0,66	1	0,33	1	0,75

Existe uma relação inversa ou contra-balanço entre sensibilidade e especificidade

(*) *cálculos baseados em valores fictícios*

Relação entre prevalência real e prevalência aparente

	Com infeção	*Sem infeção*	*Total*
Teste Positivo	SEN*P	(1-ESP)*(1-P)	(SEN*P)+ (1-ESP)*(1-P)
Teste Negativo	(1-SEN)*P	ESP*(1-P)	(1-SEN)*P+ ESP*(1-P)
Total	P	(1-P)	1

Conversão da prevalência aparente (PA) em prevalência real (P)

(1) PA= (SEN*P) + (1-ESP)*(1-P)

(2) PA = (SEN*P) + 1 - P - ESP + (ESP*P)

(3) PA + ESP - 1 = (SEN*P) + (ESP*P) - P

(4) PA + ESP - 1 = P (SEN + ESP - 1)

(5) P = (PA + ESP - 1) / (SEN + ESP - 1)

Simulação: PA = 0,18, SEN = 0,99, ESP = 0,91

P = (0,18 + 0,91 - 1)/(0,99 + 0,91 - 1)

P = 0,09/0,9 = 0,10 *(10%)*

Valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN)

$$VPP = \frac{SEN*P}{SEN*P + (1 - ESP) *(1 - P)}$$

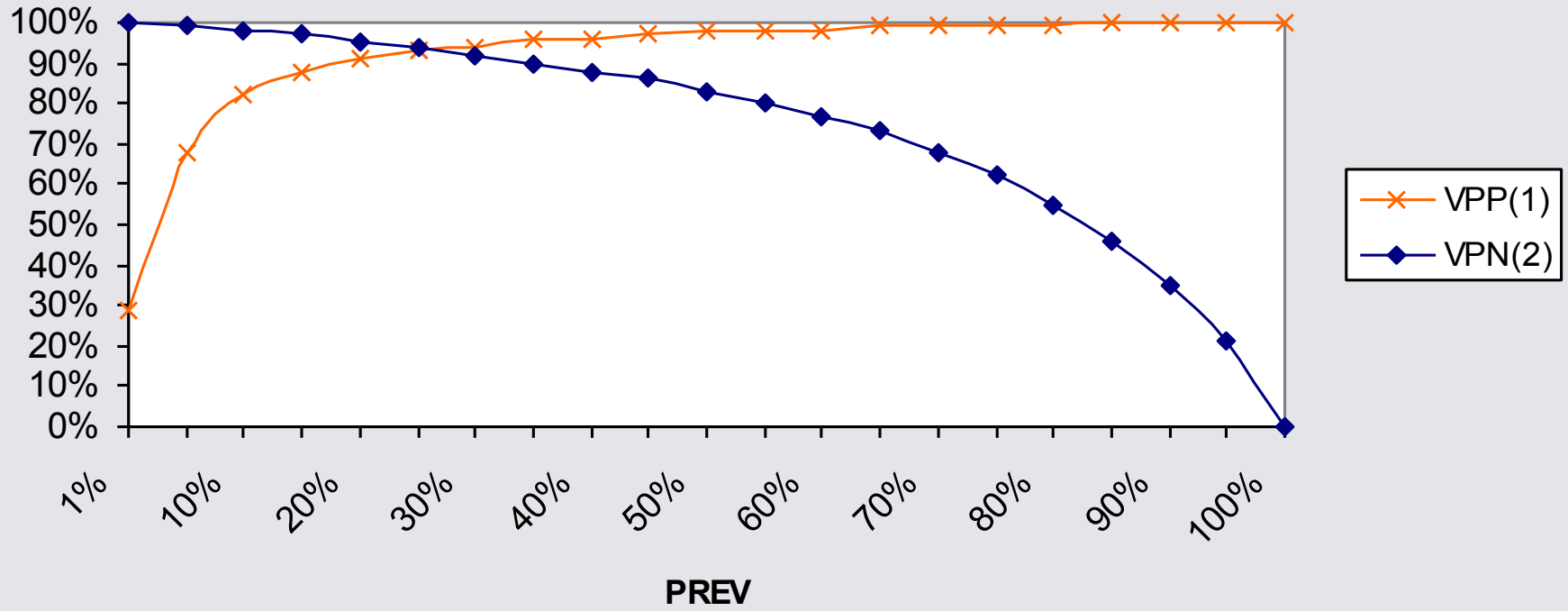
$$VPN = \frac{ESP*(1 - P)}{ESP*(1 - P) + (1 - SEN)*P}$$

Como variam VPP e VPN com a prevalência da doença?

Evolução dos valores preditivos em função da prevalência

	S=0,95	E=0,99			
prevalência real = 0,10					
	infectados	não infectados	**total**		
teste positivo	9.500	900	**10.400**	➡ VPP=	0,91
teste negativo	500	89.100	**89.600**	➡ VPN=	0,99
total	**10.000**	**90.000**	**100.000**		
prevalência real = 0,01					
	infectados	não infectados	**total**		
teste positivo	950	990	**1.940**	➡ VPP=	0,49
teste negativo	50	98.010	**98.060**	➡ VPN=	1,00
total	**1.000**	**99.000**	**100.000**		

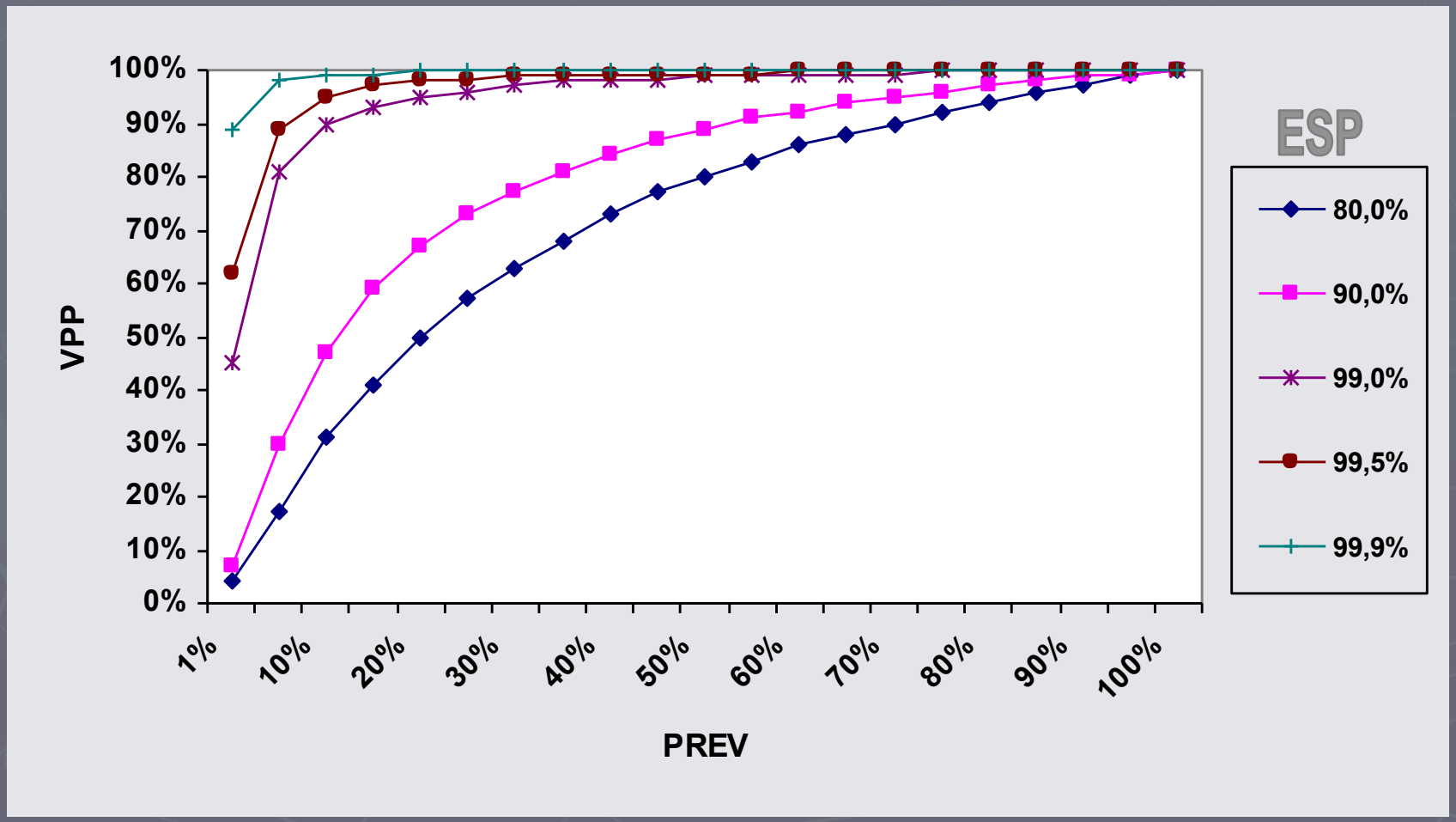
Efeito da variação da prevalência (PREV) sobre os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) de um teste diagnóstico com sensibilidade (SEN) de 80% e especificidade (ESP) de 99%



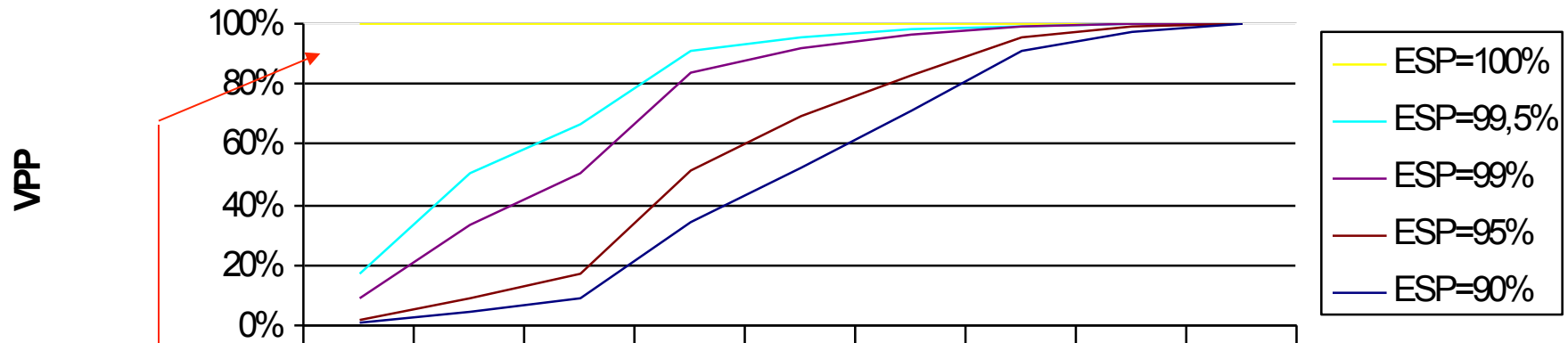
(1)VPP = (PREV x SEN) / [PREV x SEN + (1-PREV) x (1-ESP)]

(2)VPN = (1-PREV) x ESP / [PREV x (1-SEN) + (1-PREV) x ESP]

Efeito de diferentes valores de especificidade (ESP) sobre o valor preditivo positivo (VPP) de um teste com sensibilidade de 80% e prevalência (PREV) variando de 1% a 100%



Valor Preditivo Positivo (VPP) para várias combinações de prevalência e especificidade (ESP) do(s) teste(s) diagnóstico(s) (assumindo SEN=100%)



	0,1%	0,5%	1,0%	5,0%	10,0%	20,0%	50,0%	80,0%	100,0%
ESP=100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ESP=99,5%	17%	50%	67%	91%	96%	98%	100%	100%	100%
ESP=99%	9%	33%	50%	84%	92%	96%	99%	100%	100%
ESP=95%	2%	9%	17%	51%	69%	83%	95%	99%	100%
ESP=90%	1%	5%	9%	34%	53%	71%	91%	98%	100%

VPP = % dos animais com resultado positivo que estão realmente infectados

Conclusões

- Em geral, a prevalência é mais importante do que a sensibilidade e a especificidade para determinar os valores preditivos positivo e negativo
- Portanto, a utilidade de um teste depende das condições epidemiológicas em que é aplicado
- Se a doença tem prevalência muito baixa, o VPP depende essencialmente da especificidade do teste e, nesta situação, torna-se necessário utilizar teste(s) diagnósticos de especificidade próxima a 100%
- Testes diferentes, ou combinações de 2 ou mais testes, podem ser necessários em fases diferentes de um programa de controle de uma doença

Utilização de testes múltiplos para melhorar o diagnóstico

Testes em série ou sequenciais

- animais com resultado positivo em um teste inicial, são submetidos a teste confirmatório. Apenas animais positivos nos dois testes são considerados infectados

- Aumenta a *especificidade*

- Muito utilizado em programas de erradicação, quando se pratica sacrifício de animais - consequências de falsos positivos – e em situações de baixa prevalência

Utilização de testes múltiplos para melhorar o diagnóstico

Testes em paralelo

- Dois ou mais testes são utilizados ao mesmo tempo no mesmo animal. Apenas aqueles com resultado negativo em todos os testes são considerados livres de doença
- Aumenta a *sensibilidade*
- Utilizado em emergências clinicas, para avaliação rápida de doenças potencialmente graves - consequências de falsos negativos
- Pode ser útil para sanear propriedades onde um único teste não consegue detectar animais em fases distintas de evolução da doença

Exemplo

Teste	*SEN*	*ESP*	*VPP*[1]	*VPN*[1]
A	0,80	0,60	0,33	0,92
B	0,90	0,90	0,69	0,92
A e B paralelo	0,98	0,54	0,35	0,99
A e B serie	0,72	0,96	0,82	0,93

[1] para uma prevalência de 20%

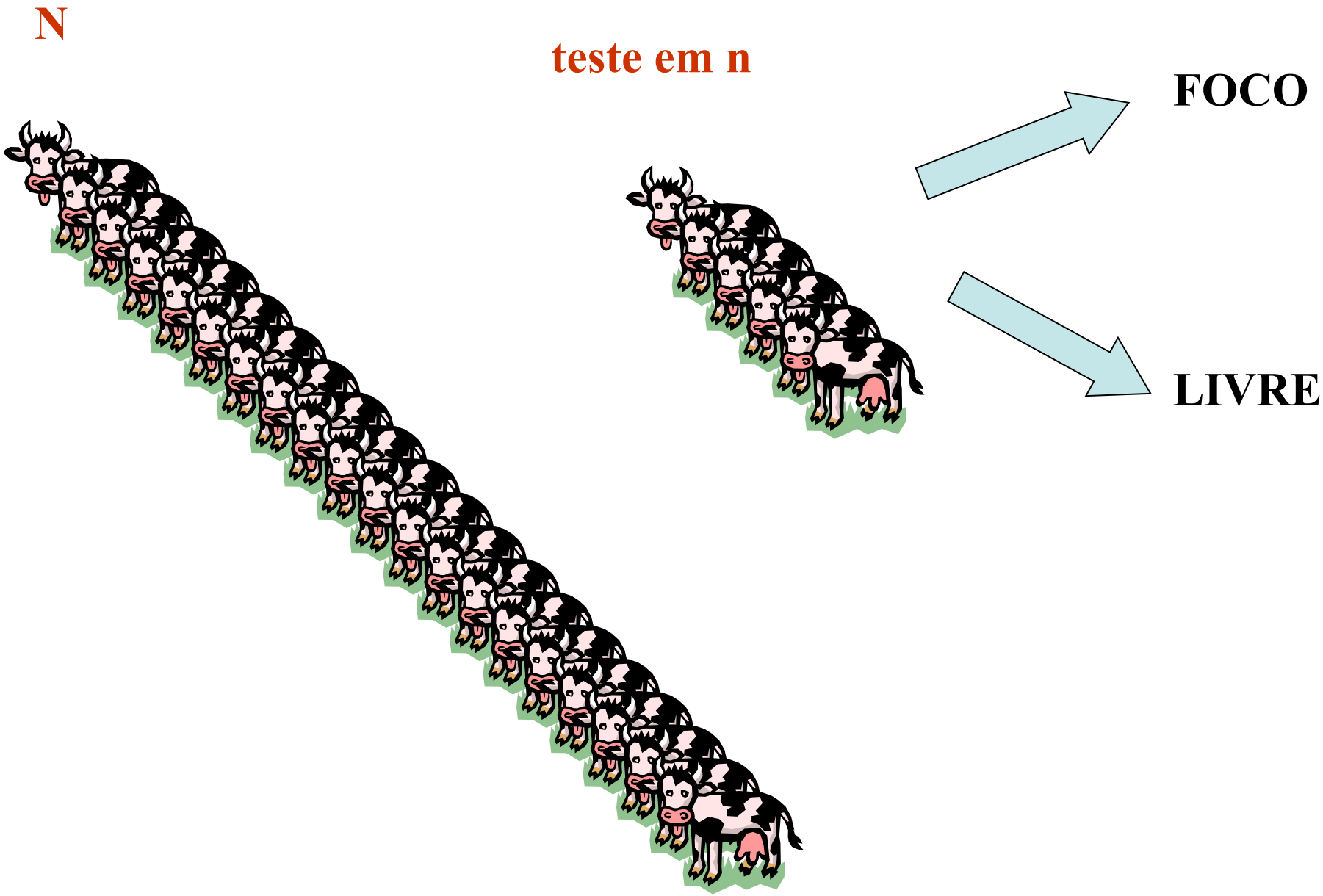
Assume-se que os resultados dos dois testes são independentes

Saneamento de rebanhos através de reteste periódico

- Assumindo sensibilidade do teste de 90%, a probabilidade de não detectar todos os animais infectados com **1 único** teste se:
  - 1 estiver infectado, será = 1-0,9 = 0,1 ou 10%;
  - 2 estiverem infectados, será = $1-(0,9)^2$ = 0,19 ou 19%;
  - 10 estiverem infectados, será = $1-(0,9)^{10}$ = 0,65 ou 65%;
  - 20 estiverem infectados, será = $1-(0,9)^{20}$ = 0,88 ou 88%
- Portanto, é necessário retestar todos os animais negativos até que a probabilidade de ainda existir algum animal infectado seja muito baixa
- Em rebanhos grandes, com muitos animais infectados, torna-se necessário usar testes de alta sensibilidade

Sensibilidade e Especificidade agregadas

- S_a: probabilidade de classificar como foco um rebanho infectado
- E_a: probabilidade de classificar como não foco um rebanho livre


N
teste em n
FOCO
LIVRE

sobre a febre aftosa…

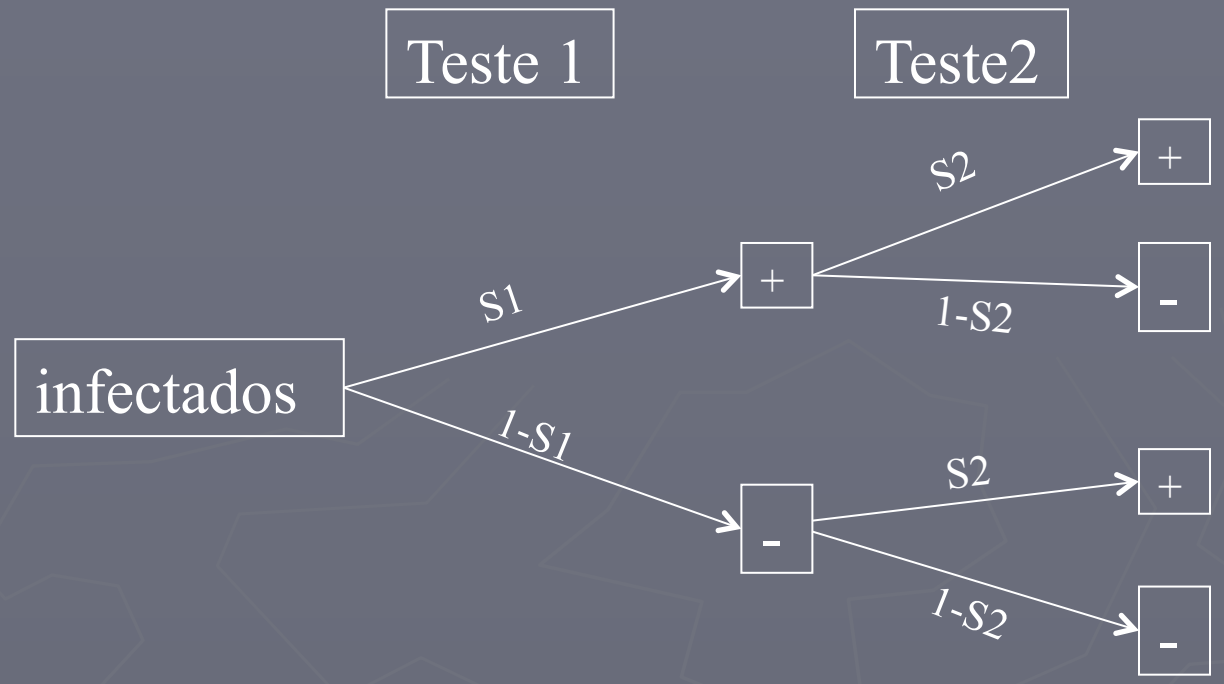
- Na demonstração de ausência de atividade viral para febre aftosa, o diagnóstico laboratorial, através de testes indiretos, só tem utilidade se for complementado por investigação epidemiológica rigorosa, que garanta especificidade de 100% ao processo de diagnóstico

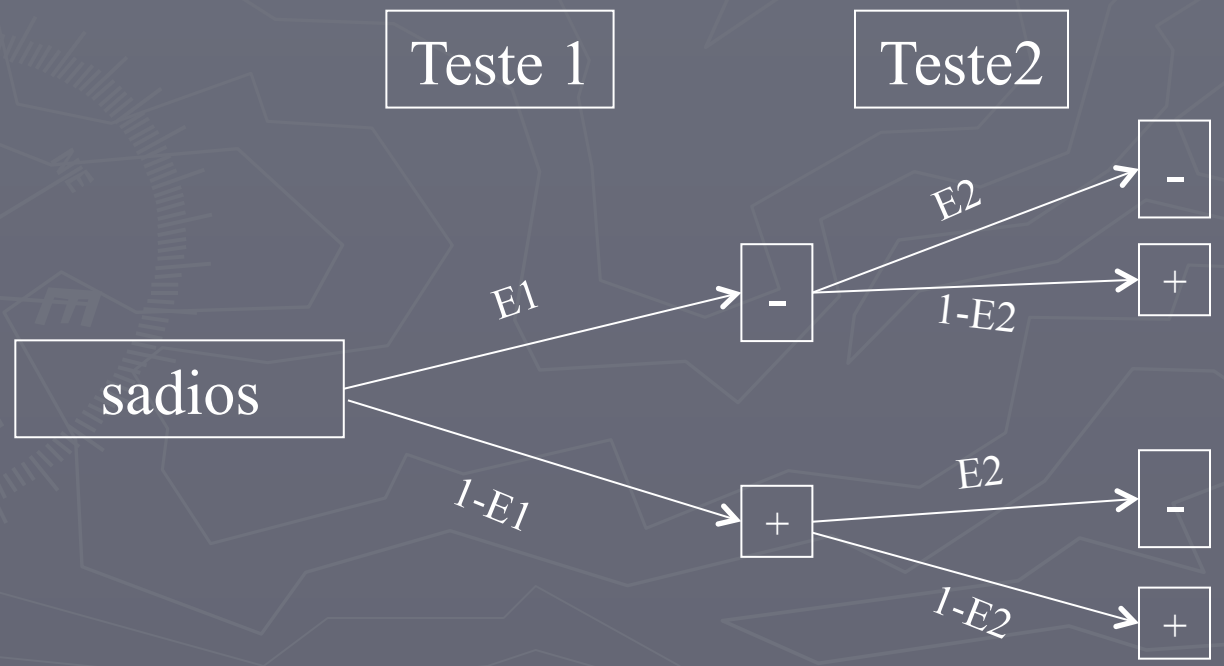
como se faz?

- planejamento amostral
- teste de triagem: ELISA 3ABC
- teste confirmatório: EITB

	S	E
ELISA 3ABC	0,972	0,98
EITB	1	0,99
em paralelo	1	0,9702
em série	0,972	0,9998

	S	E
teste a	Sa	Ea
teste b	Sb	Eb
em paralelo	1-(1-Sa)*(1-Sb)	Ea*Eb
em série	Sa*Sb	1-(1-Ea)*(1-Eb)


Teste 1
Teste2
infectados
S1
1-S1
+
-
S2
1-S2
S2
1-S2
+
-
+
-


Teste 1
Teste2
sadios
E1
1-E1
-
+
E2
1-E2
E2
1-E2
-
+
-
+

OBRIGADO!