



Test Diagnostici

Marco Martini

Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute, Università di Padova

FATTORI CHE CONDIZIONANO LA QUALITA' DI UNA PROCEDURA DIAGNOSTICA 1.

➤ A monte del laboratorio:

- scelta del campione (quale materiale da quali animali)**
- modalità di prelievo (quanto materiale, con quale mezzo, sterilità)**
- modalità di inoltro (tempi e modi)**

FATTORI CHE CONDIZIONANO LA QUALITA' DI UNA PROCEDURA DIAGNOSTICA 2.

➤ In laboratorio:

- la misurazione
 - * scelta del campione
 - * scelta dei reagenti
 - * applicazione della tecnica (strumenti, locali, personale)
 - * lettura dei risultati
- il rilascio
 - * modalità espressione risultati
 - * tempi e prezzi
 - * riservatezza
- l'interpretazione

FATTORI CHE CONDIZIONANO LA QUALITA' DI UNA PROCEDURA DIAGNOSTICA 3.

➤ A valle del laboratorio:

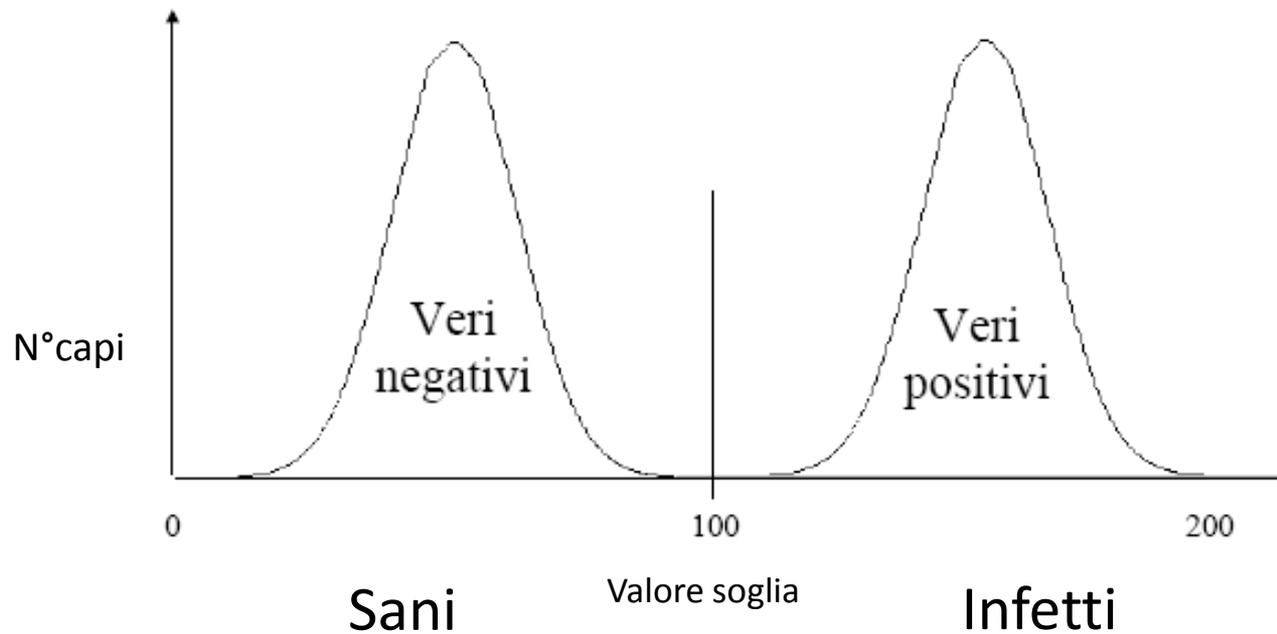
▪ l'interpretazione

*** l'applicazione dei
risultati**

ELEMENTI DA CONSIDERARE NELLA SCELTA DI UN TEST IN INDAGINI DI MASSA

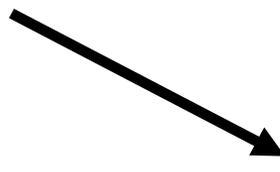
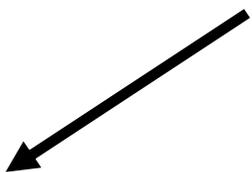
- **VALIDITA'** (sensibilità, specificità)
- **SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA**
- **POSSIBILITA' DI STANDARDIZZAZIONE E RIPETIBILITA'** (entro e fra operatori/laboratori)
- **FACILITA' DI PRELIEVO DEL MATERIALE E DI ESECUZIONE**
- **COSTI**
- **ALTRO:** politica sanitaria, legislazione, accettazione da parte degli utenti

Un test *ideale* dovrebbe permettere di individuare in modo corretto gli animali malati/infetti e identificare i soggetti sani come non malati/non infetti



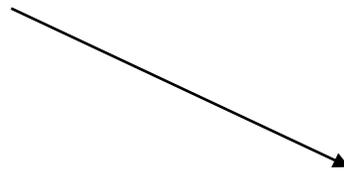
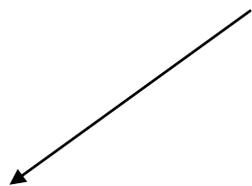
In realtà...

POPOLAZIONE



MALATI

SANI

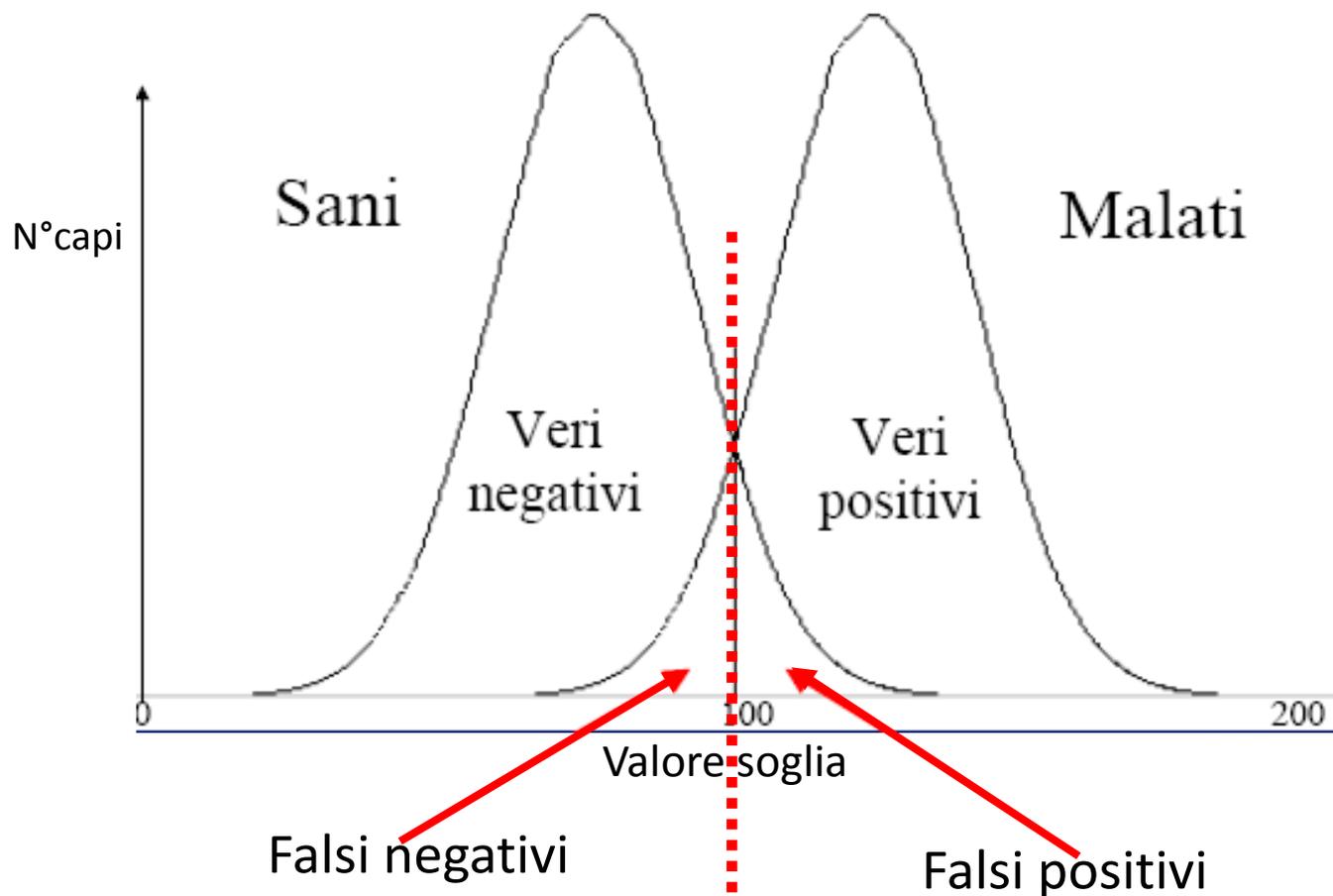


**TEST+
corretto
(veri positivi)**

**TEST-
non corretto
(falsi negativi)**

**TEST+
non corretto
(falsi positivi)**

**TEST-
corretto
(veri negativi)**



| | Malati | Sani | |
|---------------|---------------|-------------|------------|
| Test + | A | B | A+B |
| Test - | C | D | C+D |
| | A+C | B+D | N |

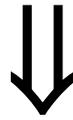
A: veri + D: veri - B: falsi + C: falsi -

$$\text{Sensibilità} = A / (A + C) * 100$$

$$\text{Specificità} = D / (B + D) * 100$$

SENSIBILITA'

**probabilità di un test
di identificare come +
i soggetti infetti**



**test molto sensibile = pochi falsi
negativi**

SPECIFICITA'

**probabilità di un test
di identificare come –
i soggetti sani**



**test molto specifico = pochi falsi
positivi**

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-----|
| Test + | A | B | A+B |
| Test - | C | D | C+D |
| | A+C | B+D | N |

Prevalenza reale: $(A + C) / N$

Prevalenza apparente: $(A + B) / N$

$$PR = \frac{PA + SP - 1}{SE + SP - 1}$$

PR = Prevalenza Reale

PA = Prevalenza Apparente

SE = Sensibilità

SP = Specificità

Perchè un animale non infetto può risultare falso positivo?

- **contatti con microorganismi antigenicamente simili**
→ **cross-reazioni**
- **scorretto campionamento**
 - **Ab materni**
 - **contaminazione siero**
 - **errori di identificazione dell'animale**
- **scorretta misurazione**
 - **inadeguata standardizzazione di tecnica e/o antigeni**
- **fattori casuali**

Perchè un animale infetto può risultare falso negativo?

- **particolare stato fisiologico**
- **fase iniziale dell'infezione**
- **terapie / patologie immunodepressive**
- **scorretto campionamento**
 - **cattiva conservazione del siero**
 - **errori di identificazione dell'animale**
- **scorretta misurazione**
 - **inadeguata standardizzazione di tecnica e/o antigeni**
- **fattori casuali**

| Metodica | SE% | SP% | Autori |
|---------------------------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| SAR brucellosi bov. | 82.0 | 99.0 | Van Aert, 1985 |
| FdC brucellosi bov. | 87.9 | 99.8 | Nielsen et al., 1996 |
| PPD caudale | 81.8 | 96.3 | Francis et al., 1978 |
| PPD cervicale | 91.2 | 75.5 | Francis et al., 1978 |
| " | | 90.0 | Metin, 1983 |
| " | | 97.7 | Khonen, 1983 |
| " | | 96.9 | Collin, 1987 |
| " | | 94.7 | Claude, 1988 |
| " | | 96.2 | Simon, 1990 |
| " | 68.1 | 96.7 | Wood et al., 1992 |
| IFN-γ | 90.9 | 95.8 | Wood et al., 1992 |
| IFN-γ | | 88.8 | Lauzi et al., 2000 |
| IFN- γ | 84.9 | | Gonzalez et al., 1999 |
| AGID LBE | 96.0 | 99.8 | Monke et al., 1992 |
| ELISA LBE | 99.7 | 99.9 | |
| PRRS | 100 | 99.0 | Torremorell et al., 2002 |

**IMPIEGO DI 2 TESTS DIVERSI NELLA STESSA SITUAZIONE
EPIDEMIOLOGICA:
PREVALENZA REALE 1 %**

| | Malati | Sani | |
|---------------|---------------|-------------|-------|
| Test + | 82 | 366 | 448 |
| Test - | 18 | 9534 | 9552 |
| | 100 | 9900 | 10000 |

1. PPD CAUDALE
SE = 82%; SP = 96%

2. PPD CERVICALE
SE = 91%; SP = 76%

| | Malati | Sani | |
|---------------|---------------|-------------|-------|
| Test + | 91 | 2425 | 2516 |
| Test - | 9 | 7475 | 7484 |
| | 100 | 9900 | 10000 |

IMPIEGO DELLO STESSO TEST (SE=95%; SP=90%) IN SITUAZIONI EPIDEMIOLOGICHE DIVERSE:

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|------|
| Test + | 190 | 80 | 270 |
| Test - | 10 | 720 | 730 |
| | 200 | 800 | 1000 |

**1. PREVALENZA
REALE: 20%**

**2. PREVALENZA
REALE: 2%**

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|------|
| Test + | 19 | 98 | 117 |
| Test - | 1 | 882 | 883 |
| | 20 | 980 | 1000 |

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' A LIVELLO DI ALLEVAMENTO (SE_A)

$$SE_A = (1 - SE_i)^n$$

$n = n.$ capi infetti

Es.: $SE_i = 0.90$

| capi infetti presenti (n) | Probabilità di non individuare 1 capo infetto | SE_A |
|----------------------------------|--|--------------------------|
| 1 | 0.1 | 0.9 |
| 2 | $0.1 * 0.1 = 0.01$ | 0.990 |
| 3 | $0.1 * 0.1 * 0.1 = 0.001$ | 0.999 |
| ... | ... | ... |

VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITA'

A LIVELLO DI ALLEVAMENTO (SP_A)

$$SP_A = (SP_I)^n$$

n = numero capi testati

Es.: test con $SP_I = 0.95$

in allevamento di 10 capi (tutti testati): $SP_A = 0.95^{10} = 0.6$

in allevamento di 100 capi (tutti testati): $SP_A = 0.95^{100} = 0.01$

**Passando dal livello individuale
a quello di allevamento:**

**LA SENSIBILITA' AUMENTA ALL'AUMENTARE
DEL NUMERO DI CAPI INFETTI PRESENTI**

**LA SPECIFICITA' DIMINUISCE ALL'AUMENTARE
DEL NUMERO DI CAPI TESTATI**

METODI PER MODIFICARE SE e SP DI UNA PROCEDURA DIAGNOSTICA

➤ Modifica della soglia di positività del test

abbassamento \Rightarrow aumento SE; innalzamento \Rightarrow aumento SP

➤ Impiego di un nuovo test

➤ Uso di 2 (o più) tests

interpretazione in serie: un soggetto, per essere giudicato positivo, deve risultare positivo ad entrambi i tests \Rightarrow aumento SP

interpretazione in parallelo; un soggetto, per essere giudicato negativo, deve risultare negativo ad entrambi i tests \Rightarrow aumento SE

IMPIEGO DI 2 TESTS IN SUCCESSIONE: RIESAME DEI POSITIVI (prevalenza = 1%)

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-------|
| Test + | 70 | 297 | 367 |
| Test - | 30 | 9603 | 9633 |
| | 100 | 9900 | 10000 |

1. TEST A: SE = 70%

SP = 97%

2. TEST B: SE = 90%
SP = 95%

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-----|
| Test + | 63 | 15 | 78 |
| Test - | 7 | 282 | 289 |
| | 70 | 297 | 367 |

Risultato finale:

37 falsi - (SE = 63%); 15 Falsi + (SP = 99.8%)

IMPIEGO DI 2 TESTS IN SUCCESSIONE: RIESAME DEI NEGATIVI (prevalenza = 10%)

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-------|
| Test + | 900 | 450 | 1350 |
| Test - | 100 | 8550 | 8650 |
| | 1000 | 9000 | 10000 |

1. TEST A: SE = 90%

SP = 95%

2. TEST B: SE = 70%
SP = 97%

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|------|
| Test + | 70 | 256 | 326 |
| Test - | 30 | 8294 | 8324 |
| | 100 | 8550 | 8650 |

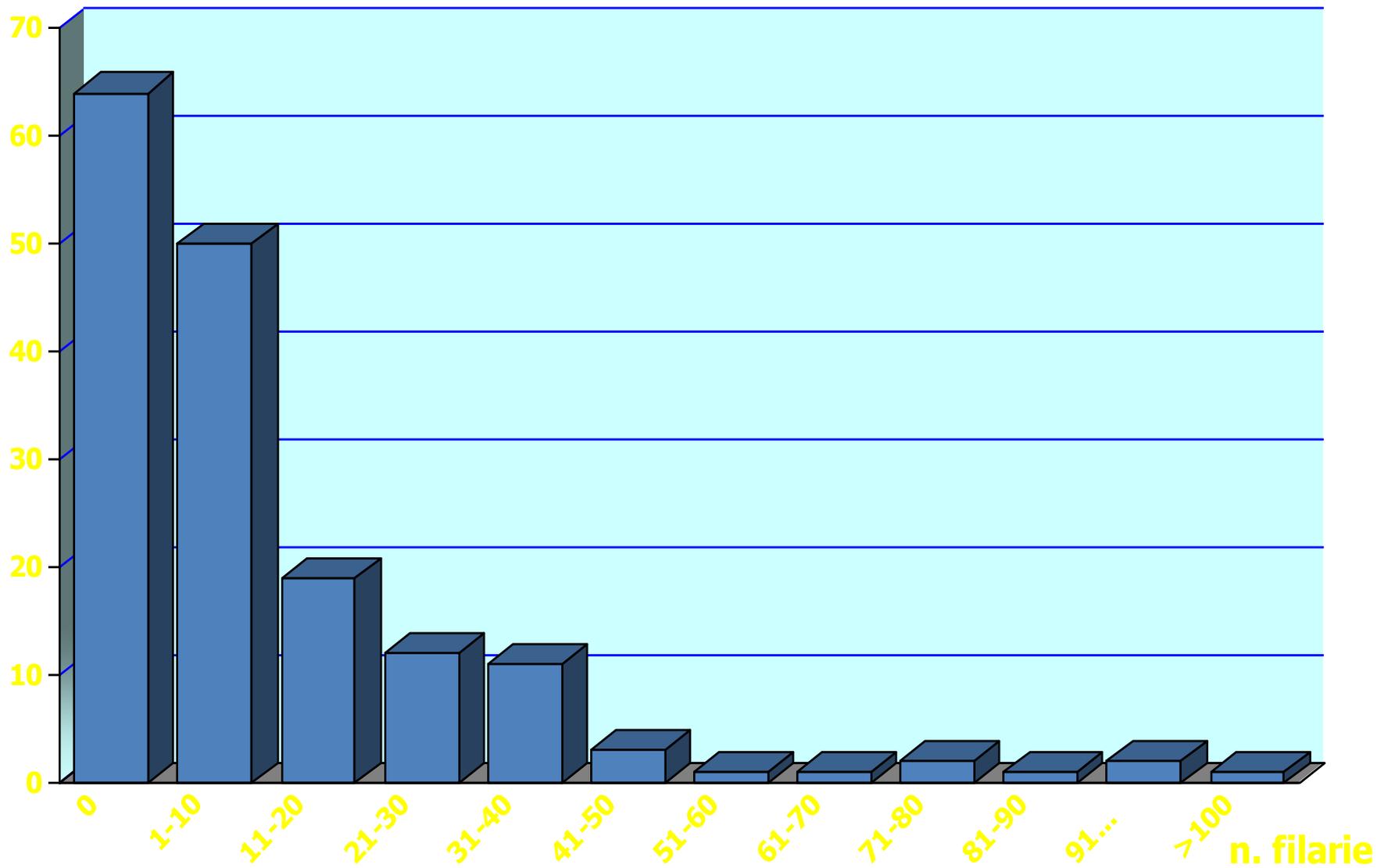
Risultato finale:

30 falsi - (SE = 97%); 706 Falsi + (SP = 92%)

SE di alcuni metodi diagnostici per filariosi canina

| | SE % | SP % |
|-------------------------|-------------|-------------|
| Impronta Diretta | 64.5 | 96.9 |
| Filtrazione | 72.7 | 87.7 |
| Knott | 66.4 | 95.4 |
| Coagulo | 65.5 | 96.9 |
| Capillare | 60.0 | 96.9 |
| PetChek | 98.4 | 98.4 |
| Diasystem | 95.2 | 95.2 |
| Unitec | 96.8 | 96.8 |

n. cani



SE di alcuni metodi diagnostici per filariosi canina per diversi livelli di carica parassitaria

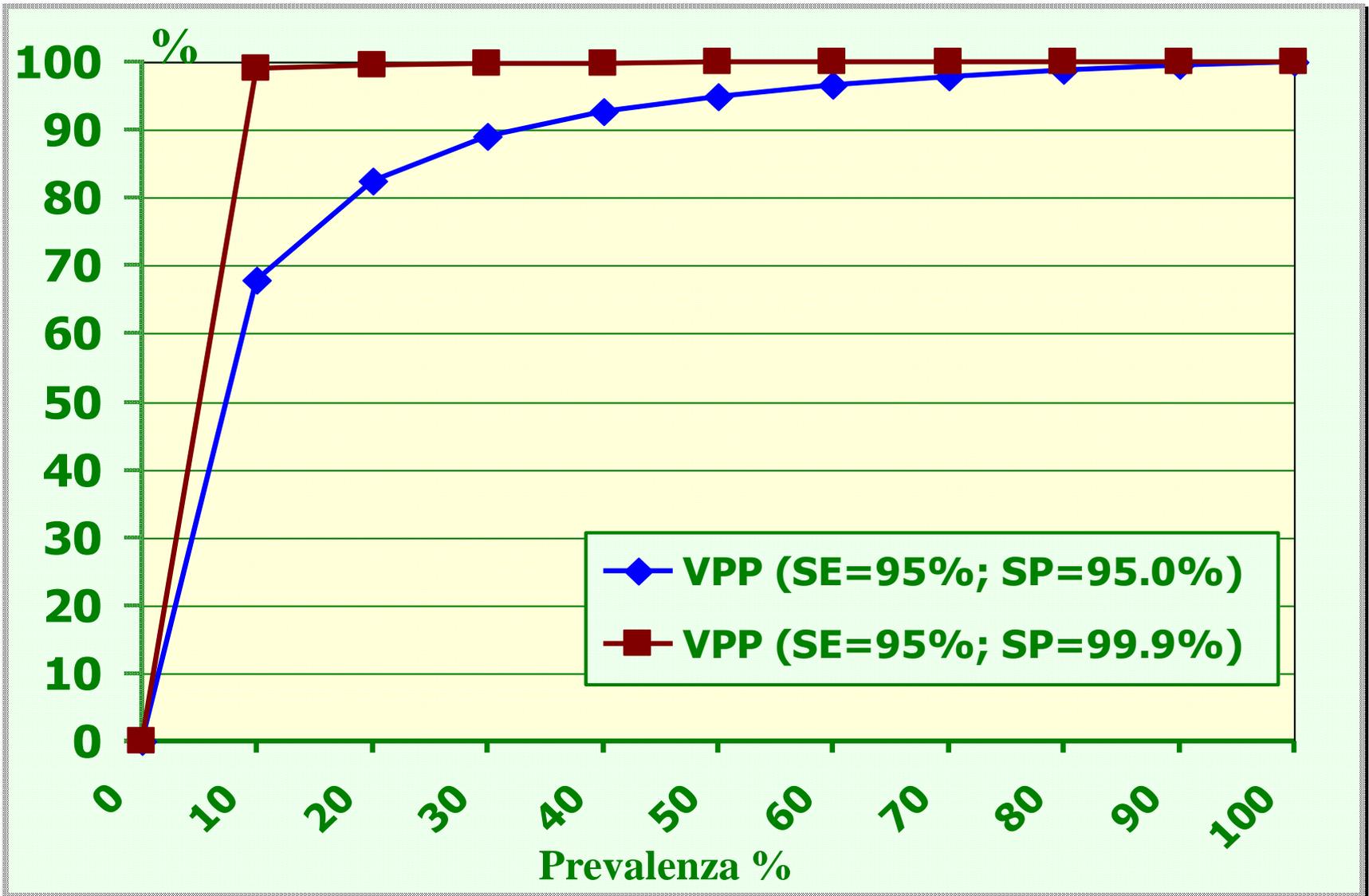
| n. filarie | 1-5 | 6-10 | 11-20 | >20 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| n. cani | 39 | 12 | 20 | 39 |
| Impronta Diretta | 38.5 | 66.7 | 80.0 | 82.1 |
| Filtrazione | 46.2 | 83.3 | 90.0 | 87.2 |
| Knott | 38.5 | 75.3 | 80.0 | 84.6 |
| Coagulo | 38.5 | 83.3 | 80.0 | 79.5 |
| Capillare | 28.2 | 50.0 | 85.0 | 82.1 |
| PetChek | 43.6 | 83.3 | 85.0 | 97.4 |
| Diasystem | 50.0 | 100 | 90.0 | 100 |
| Unitec | 46.9 | 90.9 | 94.1 | 100 |

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-----|
| Test + | A | B | A+B |
| Test - | C | D | C+D |
| | A+C | B+D | N |

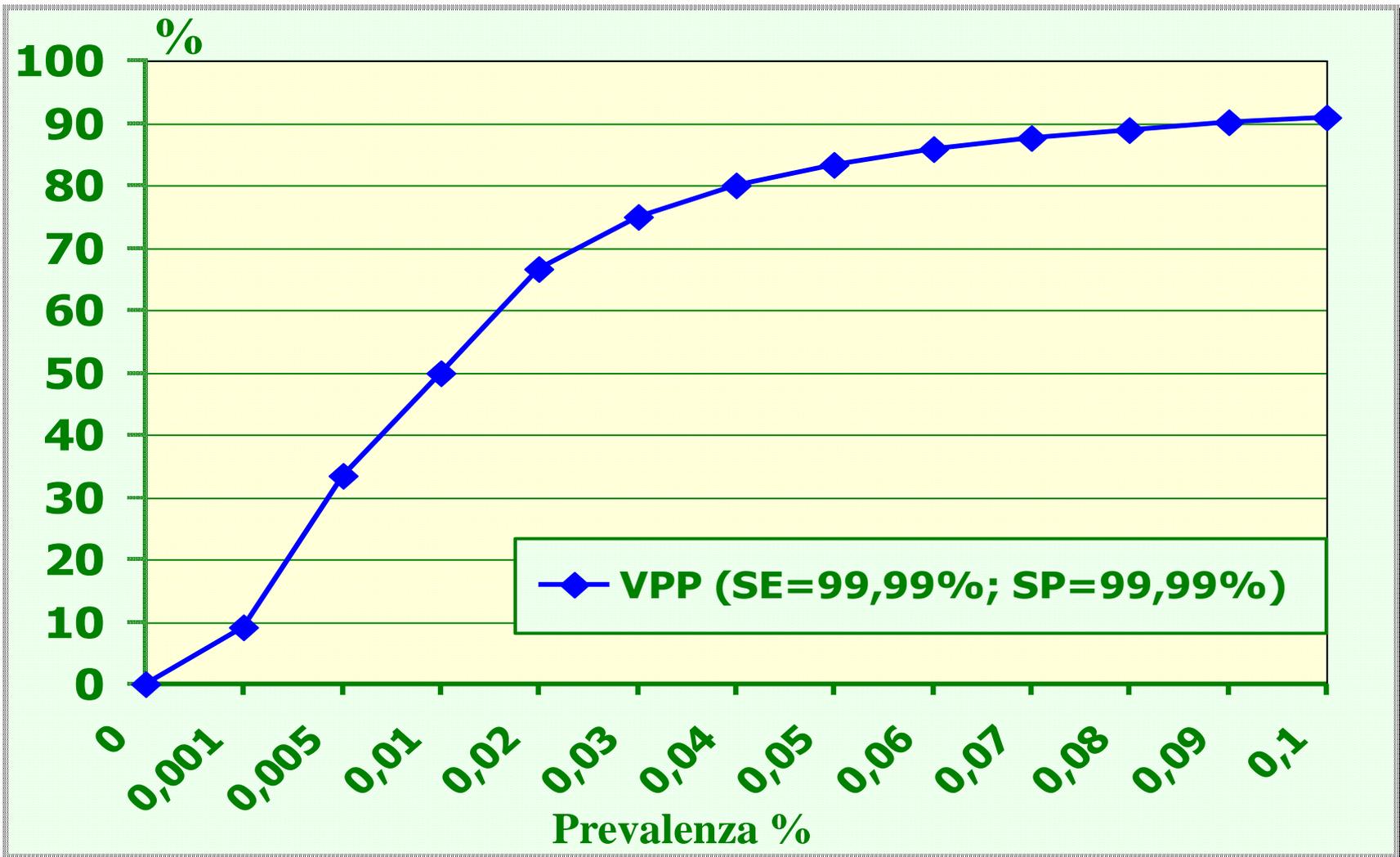
Valore Predittivo Positivo = $A / (A + B)$

Probabilità di un soggetto positivo al test di essere infetto. Dipende dalla Specificità e dalla Prevalenza

ANDAMENTO di VPP IN FUNZIONE DI SP E P



ANDAMENTO di VPP A PREVALENZE MOLTO BASSE, ANCHE CON SP MOLTO ELEVATA

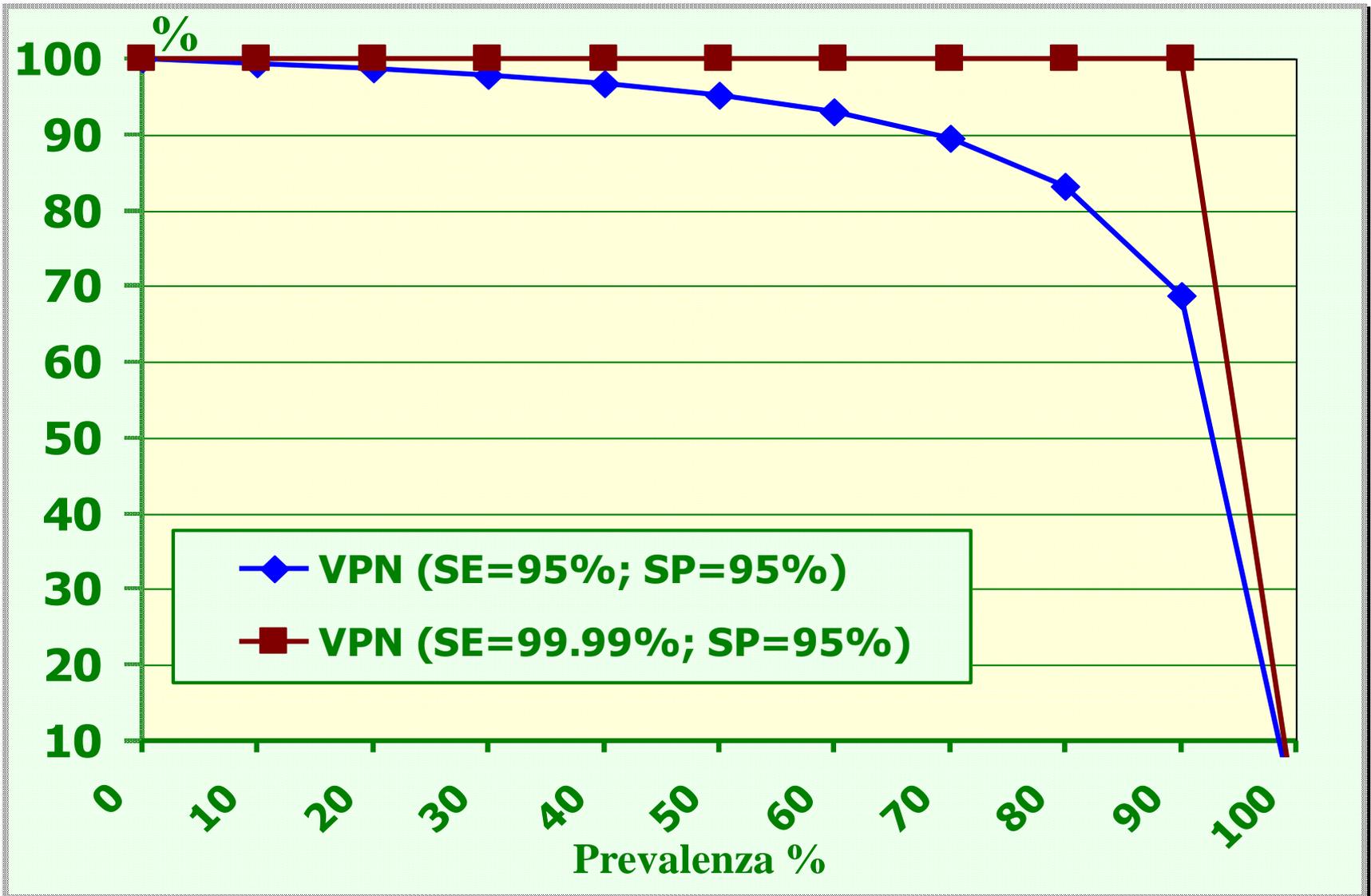


| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-----|
| Test + | A | B | A+B |
| Test - | C | D | C+D |
| | A+C | B+D | N |

Valore Predittivo Negativo = $D / (C + D)$

Probabilità di un soggetto negativo al test di essere sano. Dipende dalla Sensibilità e dalla Prevalenza.

ANDAMENTO di VPN IN FUNZIONE DI SE E P



LIKELIHOOD RATIOS (LHR)

| | Malati | Sani | |
|--------|--------|------|-----|
| Test + | A | B | A+B |
| Test - | C | D | C+D |
| | A+C | B+D | N |

$$\text{LHR} + = \frac{A / (A+C)}{B / (B+D)}$$

$$\text{LHR} - = \frac{C / (A+C)}{B / (B+D)}$$

Il valore di LHR + ($0 \div \infty$) indica quante volte è più probabile un risultato + del test in soggetti infetti rispetto a soggetti sani. Il test perfetto dovrebbe avere valore ∞ (individua tutti i veri + senza dare falsi +)

Il valore di LHR – ($0 \div 1$) indica quante volte è meno probabile un risultato - del test in soggetti infetti rispetto a soggetti sani. Il test perfetto dovrebbe avere valore 0 (non dà falsi – e individua tutti i veri -)

VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA FRA 2 TESTS TRAMITE χ^2 DI Mc NEMAR

Esempio: Listeriosi bovina

Test 1: FdC

Test 2: ELISA

| | | Test 1 | | |
|--------|---|--------|-----|-----|
| | | + | - | |
| Test 2 | + | 58 | 22 | 80 |
| | - | 6 | 860 | 866 |
| | | 64 | 882 | 946 |

Concordanza osservata = $\frac{(58 + 860)}{946} * 100 = 97\%$

$$\chi^2 = \frac{(22 - 6 - 1)^2}{22 + 6} = 8.04 \quad (P < 0.01)$$

| Valutazione concordanza tramite <i>kappa</i> | Test 1 | | |
|---|--------|-----|------|
| | + | - | |
| Test 2 + | 42 | 58 | 100 |
| Test 2 - | 38 | 862 | 900 |
| | 80 | 920 | 1000 |

- a) **Concordanza osservata: $(42 + 862) / 1000 = 0.91$**
- b) **Concordanza dovuta al caso (entrambi +) = $0.1 * 0.08 = 0.008$**
- c) **Concordanza dovuta al caso (entrambi -) = $0.9 * 0.92 = 0.83$**
- d) **Concordanza totale dovuta al caso (b + c) = 0.84**
- e) **Differenza fra concordanza osservata e casuale (a - d) = 0.07**
- f) **Massima concordanza possibile oltre il caso (1 - d) = 0.16**

$$\mathbf{kappa = e / f = 0.07 / 0.16 = 0.41}$$

Valori di *kappa*

Interpretazione

≥ 0.81

concordanza quasi perfetta

0.61 – 0.80

concordanza sostanziale

0.41 – 0.60

concordanza discreta

0.21 – 0.40

concordanza moderata

0.1 – 0.20

concordanza debole

0

concordanza assente

Cross-classification of results of ELISA A and ELISA B for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from serum samples of cows that were tissue culture-positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

| ELISA A | ELISA B | | Total |
|----------|----------|----------|-------|
| | Positive | Negative | |
| Positive | 6 | 8 | 14 |
| Negative | 5 | 141 | 146 |
| Total | 11 | 149 | 160 |

$\kappa = 0.45$ (95% CI, 0.23–0.67), p -value for McNemar test < 0.001 .

VALUTAZIONE DEI TEST DIAGNOSTICI

Vanno considerati:

- **Validità**
- **Riproducibilità**
- **Standardizzazione**
- **Costi**
- **Esecuzione ed interpretazione**
- **Prelievo del materiale organico occorrente**
- **Accettazione (utenti ed esecutori)**
- **Legislazione**
- **Prevalenza infezione da diagnosticare**
- **Provvedimenti conseguenti al risultato del test**