

MÉTODOS PARA CONTROLO DE QUALIDADE EM TESTES SEROIMUNOLÓGICOS NAS DOENÇAS INFECCIOSAS

P. ABRANCHES, J.P. FERNANDES

Disciplina de Protozoologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Laboratório de Patologia Clínica, Hospital da Marinha, Lisboa.

RESUMO

Um teste imunológico deve ser avaliado em relação aos seguintes parâmetros: reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade, limiar de significância, eficácia e valor predictivo. Os autores explicam e definem a reprodutibilidade e a forma como corrigi-la. São também definidas a sensibilidade e a especificidade, explicando-se como podem ser determinadas e dando exemplos concretos do seu interesse. O limiar de significância pode ser determinado por dois métodos; ou pela comparação com os resultados do exame microbiológico ou com o auxílio da curva de distribuição do título de anticorpos de uma amostra de soros da doença em estudo. É, em seguida, explicado o valor preditivo positivo e exemplificada a sua utilização. Por fim refere-se a necessidade de comparação com outros testes já existentes e são mencionados os métodos estatísticos a aplicar em diversas situações.

SUMMARY

Quality control in seroimmunological tests of infectious diseases

The different quality control methods which should be used in seroimmunological assays for detection of antibodies in infectious disease are analyzed. The concepts of reliability, sensitivity, specificity, cut off, efficacy and predictive value are described, explained how they can be calculated and exemplified. The statistics which can be used for comparing results in different situations it is also referred.

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do fenómeno de Pfeiffer, em 1894, que diversos investigadores se interessaram pelos elementos presentes no soro (anticorpos) que agiam sobre substâncias estranhas (antígenos), provocando uma resposta imunológica. Esses elementos foram designados, de acordo com a actividade que demonstravam, por aglutininas, precipitinas, etc.

Estava aberto o caminho para a elaboração de engenhosos testes de diagnóstico indirecto de várias doenças infecciosas, pela pesquisa de anticorpos. São exemplos clássicos destes testes as reacções de Wassermann para o diagnóstico de sífilis e de Widal para o diagnóstico de febre tifóide, surgidas na transição do séc. XIX para o séc. XX.

Com o desenvolvimento da imunologia que a levou a transpor as fronteiras da microbiologia, a que no início se circunscrevera, o seu papel no diagnóstico de várias doenças infecciosas tem, sucessivamente, crescido. A todo o momento o médico se vê confrontado com o aparecimento de novos métodos imunológicos de diagnóstico que são utilizados, também, em inquéritos epidemiológicos.

Infelizmente a competição desenfreada que se verifica neste domínio, muitas vezes com objectivos económicos evidentes ou apenas subjacentes, faz com que alguns testes, tentadores pela sua simplicidade e propagandeada eficácia, descritos em publicações científicas, alguns deles já comercializados, não sejam suficientemente testados no que diz respeito a parâmetros de qualidade que deveriam ser obrigatórios.

Por estas razões resolvemos elaborar o presente trabalho que tem como objectivo chamar a atenção para provas de controlo de qualidade que deveriam ser aplicadas a todos os

testes laboratoriais de pesquisa e/ou titulação de anticorpos nas doenças infecciosas, antes da sua divulgação no meio científico ou nos circuitos comerciais.

MÉTODOS DE ESTUDO

Um teste imunológico deverá ser sempre avaliado em relação às seguintes qualidades ou características: FIABILIDADE, SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, LIMAR DE SIGNIFICÂNCIA, EFICÁCIA e VALOR PREDITIVO, para além da COMPARAÇÃO com outras provas já existentes, porque todo o teste está sujeito a interferências intrínsecas — que afectam o seu desempenho e que se reportam às condições em que ele é executado, ao material usado, etc — e a interferências extrínsecas que dizem respeito ao modo como o resultado é interpretado.

A fiabilidade analisa o conjunto de interferências intrínsecas enquanto as outras características (sensibilidade, especificidade, etc) analisam as várias componentes das interferências extrínsecas.

FIABILIDADE

Acrescida às determinações específicas ligadas à natureza do teste, como sejam a determinação do título de um conjugado fluorescente, o teor de proteínas de um antígeno, etc, surge a reprodutibilidade.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade de um teste é a sua capacidade de dar os mesmos resultados com os mesmos soros em sucessivas

determinações realizadas nas mesmas condições de experiência.

Para estudar a reprodutibilidade é necessário possuir um soro positivo de referência, com título conhecido^{1*}. Este soro pode ser testado de duas maneiras². No processo mais comum fazem-se sucessivas determinações do título em diferentes sessões, comparando os resultados entre si. É conveniente usar o soro testemunha, mais de uma vez em cada sessão, distribuído de maneira aleatória. Neste último caso será a média dos valores obtidos numa sessão que será comparada com a das outras sessões. No segundo processo constrói-se uma curva de calibração com o soro de referência diluído em progressão geométrica. A curva obtida é comparada com a de outras sessões. Este método, se bem que mais trabalhoso no início, tem a vantagem sobre o anterior de ser mais rápido pois não serão necessárias, em princípio, tantas sessões.

Alguns autores, como Boudin et al², aplicam um coeficiente de correcção (K) quando a reprodutibilidade da reacção não é boa. K obtém-se dividindo o valor médio da testemunha positiva no conjunto das determinações, pelo valor médio da testemunha positiva na sessão em causa. Em seguida, cada valor dos soros-problema é multiplicado pelo factor K.

SENSIBILIDADE

Um teste 100% sensível é aquele que é capaz de detectar todos os casos de infecção.

Para estudar a sensibilidade de uma reacção é necessário possuir uma amostra significativa de soros correspondentes a casos comprovados da doença em estudo. A sensibilidade, expressa em percentagem, é determinada pela proporção de resultados positivos obtidos, em relação à totalidade dos soros testados. Com um teste 100% sensível não existem falsos resultados negativos.

A título de exemplo mencionaremos uma reacção de aglutinação (DAT), para o diagnóstico das leishmaníases, ensaiada recentemente e que foi recomendada, pela sua facilidade de execução técnica, em estudos no terreno³. Utilizada nas condições preconizadas pelos autores mostrou ser 100% sensível em relação à amostra por eles testada, tal como a reacção de imunofluorescência indirecta (IF) que serviu de método de referência, sendo superior ao método ELISA (96.3%)⁴.

ESPECIFICIDADE

A especificidade de um teste caracteriza a sua capacidade de dar resultados positivos apenas nos casos comprovados de infecção.

A especificidade é determinada numa amostra significativa de soros de indivíduos sãos ou com outra(s) infecção (ões) que não a estudada. Os resultados exprimem-se em percentagem, como a sensibilidade, e o seu cálculo é feito pela proporção de resultados negativos obtidos em relação com a totalidade de soros testados. Um teste 100% específico não apresenta falsos resultados positivos.

Para estudar esta característica é necessário possuir amostras significativas de dois tipos de soros. A primeira amostra refere-se a indivíduos sãos e a segunda a indivíduos com doenças diferentes da que está em estudo. Este grupo deverá ser ainda diferenciado em dois sub-grupos. Um deles será constituído por soros de indivíduos com doenças provocadas por microrganismos que, tanto quanto se sabe, são muito diferentes do que causa a doença em estudo. No outro sub-

grupo juntam-se doenças provocadas por microrganismos que têm antígenos comuns com aquele que se pretende estudar.

A título de exemplo, referimos um trabalho de Afchain et al⁵ em que os autores verificaram, por imunoelectroforese de antígenos extraídos da cultura de *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania donovani*, que estas três espécies tinham 10 a 13 antígenos comuns representando cerca de 1/3 dos componentes observados. Como, em geral, as reacções imunológicas usadas no diagnóstico das doenças provocadas por estes protozoários utilizam mosaicos de antígenos, não surpreende que as reacções cruzadas no diagnóstico serológico da doença de Chagas, da doença do sono e do kala-azar sejam frequentes e apresentem muitas vezes títulos elevados⁴. Harith et al⁴, ao compararem três testes (DAT, IF e ELISA) no diagnóstico de leishmaníase visceral, verificaram que a especificidade era, respectivamente, de 72.9, 94.3 e 79.4% quando os soros de doentes com tripanossomiase (africana e americana) estavam incluídos na amostra. Caso esses soros fossem retirados, a especificidade elevava-se, respectivamente, a 100% para as duas primeiras reacções e a 87.3% para a ELISA.

LIMIAR DE SIGNIFICÂNCIA

Em serologia, a separação entre doentes e não doentes está sujeita a dificuldades resultantes da existência de anticorpos referentes a infecções antigas, infecções muito recentes com baixo teor de anticorpos e reacções cruzadas inespecíficas, o que obriga a seleccionar um limiar de significância ou valor crítico do teste (cut off) que se define como o título que permite a decisão entre a presença ou ausência de infecção.

Para o seu cálculo recomendam-se 2 processos. — O método analítico e o método global⁶.

O primeiro é o mais conhecido e mais fácil de executar e consiste na comparação dos resultados da reacção com um método de referência, que é, em geral, o exame microbiológico em todas as suas modalidades (directo, cultural e por inoculação). Este método é 100% específico mas é, habitualmente, pouco sensível, o que vai determinar um limiar de significância muito elevado — muitos doentes são dados como negativos — além de nem sempre ser fácil de executar.

O segundo método baseia-se na curva de distribuição do título de anticorpos de uma amostra de soros da doença em estudo, curva que, em zona endémica, é bimodal^{7,8}. A primeira curva, constituída por títulos baixos, corresponde a reacções inespecíficas ou a anticorpos residuais (eventualmente também a casos detectados no início da doença). A segunda curva diz respeito a anticorpos específicos. Este fenómeno, descoberto pelos autores atrás citados, foi verificado com anticorpos hemaglutinantes e repete-se, para o mesmo antígeno, com colecções diferentes de soros. Lanotte⁶ provou que o fenómeno era independente da natureza dos anticorpos pesquisados e da espécie animal estudada. O título limite será aquela diluição que fica situada na fronteira das duas curvas, se bem que em geral se prefira a diluição seguinte, situada já na área dos anticorpos específicos, como título significativo, com o que se obtém resultados mais seguros, ou seja, menor número de falsos positivos^{6,9}.

Nos nossos estudos sobre o reservatório animal das leishmaníases em Portugal, o cão, a curva de distribuição de anticorpos que obtivemos com a reacção de imunofluorescência indirecta é de carácter bimodal, ficando a diluição 1/64 situada entre as duas curvas¹⁰ (Fig. 1). Por sua vez o exame parasitológico, confirmado nalguns casos pelo *follow-up* significativo (subida de títulos de, pelo menos, duas diluições) foi positivo em 84.1% (sensibilidade) dos casos com $IF \geq 1/128$. Poderíamos aumentar a sensibilidade adoptando como título limite a diluição de 1/64. No entanto a especificidade diminuiria significativamente, o que não é aconselhável.

* Segundo Hudson, título de um soro define-se como a capacidade de ligação do anticorpo ao antígeno; no entanto, na maior parte dos casos este termo aplica-se à diluição do soro testado¹.

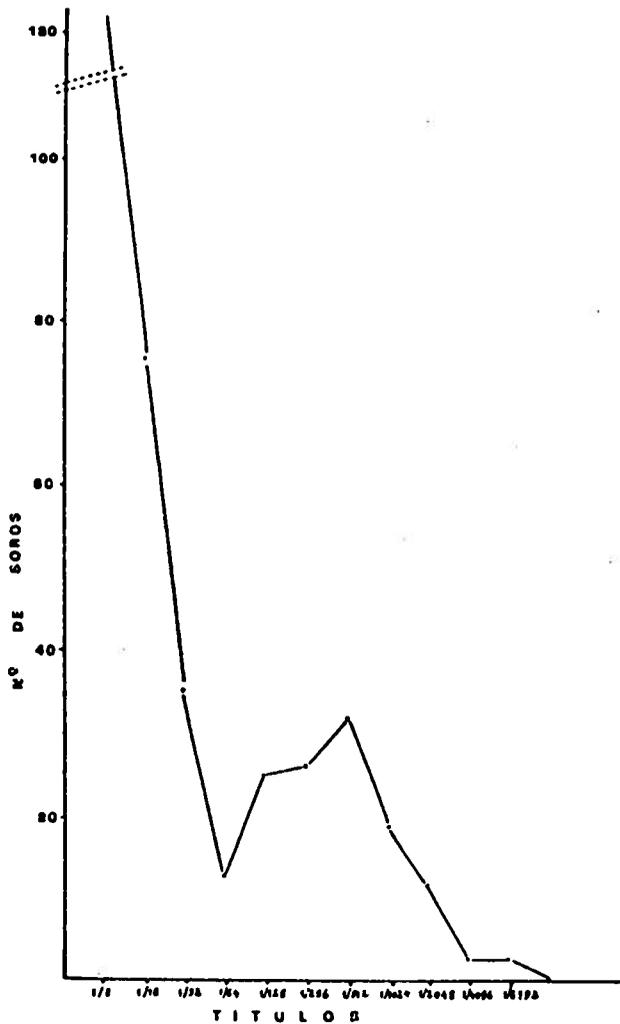


Fig. 1 — Área rural da Arrábida. Distribuição da população canina em função dos títulos de anticorpos (curva bimodal). (in Abranches et al, 1986).

EFICÁCIA OU VALOR GLOBAL DA PROVA

A eficácia é definida pela totalidade de doentes da amostra correctamente classificados pelo teste (positivos ou negativos), ou seja, o somatório dos verdadeiros positivos e negativos dividido pela amostra ¹¹. A eficácia depende não só da relação sensibilidade-especificidade mas também da prevalência da doença, aumentando ou diminuindo com esta.

Esta prova é utilizada principalmente em epidemiologia, servindo para avaliar a utilidade de um teste no rastreio de uma doença em grupos populacionais.

VALOR PREDICTIVO

Sob o ponto de vista clínico é mais utilizado o valor predictivo positivo (V.P. +) de um teste imunológico que se define como a proporção de casos comprovados de doença (verdadeiros positivos), em relação ao número total de testes positivos. Como é evidente, o V.P. + varia em sentido inverso do número de falsos resultados positivos observados com o teste.

Se utilizarmos uma reacção que não é 100% específica vamos obter alguns falsos resultados positivos. Numa população com baixa prevalência da doença o aparecimento de um falso resultado positivo vem diminuir drasticamente o valor predictivo da prova. Pelo contrário, numa população de elevada prevalência o aparecimento de um falso resultado positivo não vem diminuir significativamente o valor predictivo.

O exemplo que damos a seguir vem ilustrar o que explica-mos e evidenciar a utilidade do uso do V.P. +.

Meyer et al ¹² ensaiaram um teste ELISA com 100% de sensibilidade e 99.9% de especificidade no estudo da seropositividade ao HIV em dois grupos distintos da população.

Na população em geral (dadores femininos de sangue), onde a prevalência é de 0.001%, o valor predictivo é apenas de 50% ou seja, em cada 2 soros positivos um será falso positivo.

Ao analisarem com o mesmo teste uma população de alto risco, como os politransfundidos, onde a prevalência é de 0.05%, então 90% da população com teste positivo está efectivamente infectada, independentemente da especificidade do teste ser de 95 a 100%.

COMPARAÇÃO DE REACÇÕES IMUNOLÓGICAS

Quando é apresentado um novo teste imunológico para diagnóstico de uma determinada doença é desejável a comparação com outros testes já existentes.

Há várias formas de comparação que implicam o uso de estudos estatísticos:

1. Se o lote de soros for o mesmo para ambos os testes, a prova mais adequada para comparação é o teste de McNemar.
2. Se o lote de soros for diferente para cada teste, podemos utilizar várias estatísticas entre os quais referimos o teste do qui quadrado que eventualmente nos permitirá demonstrar que a frequência da doença é a mesma nas duas populações.

Se a análise estatística concluir que os testes não dão resultados similares, isso não quer dizer, necessariamente, que o teste deva ser rejeitado. A hipótese de estarmos em presença de testes que detectam anticorpos diferentes não pode ser excluída.

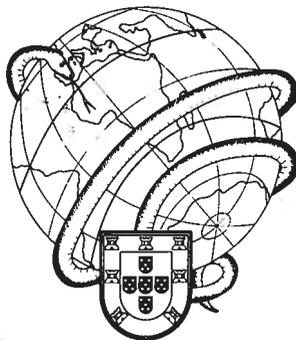
BIBLIOGRAFIA

1. HUDSON G.A.; Characterization of antisera. In ROSE N.R., FRIEDMAN H., FAHEY J.L.; Ed. Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Washington DC 1986: 9.
2. BOUDINC C., ROBERT V., VERHAVE J.P., CARVENALE P., MEUWISSEIN J.H.E.T.: Utilization de la technique ELISA dans le dépistage des moustiques infectés par Plasmodium falciparum. Bull OMS 1988; 66: 87-97.
3. HARITH A.E., KOLK A.H.J., KAGER P.A., LEEUWENBURG J., MUGAI R., KIUGU S., LAARMAN J.J.: A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1986; 80: 583-587.
4. HARITH A.E., KOLK A.H.J., KAGER P.A., LEEUWENBURG J., FABER F.J., MUGAI R., KIUGU S., LAARMAN J.J.: Evaluation of newly developed agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1987; 81: 603-606.
5. AFCHAIN D., LE RAY D., CAPRON A., JADIN J.: Analyse antigénique comparée par immunoelectrophorèse des formes de culture de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Trypanosoma (Tripanozoon) brucei e Leishmânia donovani. Conséquences taxonomiques et diagnostiques. Protistologica 1973; 9: 213-220.

6. LANOTTE G.: Le foyer de leishmaniose viscérale des Cévennes. Limites et structures. Essai méthodologique.—Thèse—Faculté Medicine de Montpellier 1975.
7. CUADRADO R.R., KAGAN I.G.: The prevalence of antibodies to parasitic diseases in sera of young army recruits from U.S. and Brazil. *Am J Epidem* 1967; 86: 330-340.
8. KAGAN I.G.: Parasitic diseases. In Paul J.R. e White C. ed. *Serological Epidemiology*. Academic Press, New York and London 1973: 155-168.
9. ABRANCHES P.: O Kala-azar da área metropolitana de Lisboa e da região de Alcácer do Sal—Tése—Faculdade de Ciências Médicas 1984.
10. ABRANCHES P., PIRES C.A., CONCEIÇÃO-SILVA F.M., SILVA-PEREIRA M.C.D., GOMES G.M.S.: O Kala-azar em

- Portugal-VI Inquérito Epidemiológico realizado na região metropolitana de Lisboa. *J Soc Ciên Méd* 1987; 151: 364-379.
11. NORTON R.F., HEBEL J.R.: A study guide to Epidemiology and Biostatistics. Aspen Publication, Rockville 1984.
 12. MEYER K.B., PAUKER S.G.: Screening for HIV: Can we afford the false positive rate? *N Engl J Med* 1987; 317: 238-241.

Pedido de Separatas:
Pedro Abranches
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Rua da Junqueira
1300 Lisboa



Instituto Higiene e Medicina Tropical.