

Estimativa de validade de um novo método de isolamento de vírus rábico

Estimate of the validity of a new method for the isolation of rabies virus

Yeda L Nogueira

Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Vírus da raiva, isolamento. Raiva, diagnóstico. Quirópteros. Sensibilidade e especificidade. Valor preditivo.

Keywords

Rabies virus, isolation. Rabies, diagnosis. Chiroptera. Sensitivity and specificity. Predictive value.

Resumo

Objetivos

Nenhum estudo de base populacional foi realizado para mostrar o uso potencial de diagnóstico virológico do vírus rábico. O estudo realizado teve por objetivo estimar parâmetros de acurácia para o isolamento de vírus rábico em célula McCoy, como um método alternativo, e comparar com o uso da célula N2A, considerada método de referência.

Métodos

Foi realizado um inquérito em 120 morcegos coletados aleatoriamente, na Mata Atlântica, no Estado de São Paulo. Utilizou-se a reação de imunofluorescência para a detecção do vírus rábico isolado no cérebro desses morcegos, avaliado nos dois sistemas de cultivos celulares. Dois bancos de dados foram formados com os resultados. A análise foi feita com o programa *Computer Methods for Diagnostic Tests* (CMDT), utilizando a técnica de *two-graph-receiver operating characteristic* (TG-ROC) para obter os parâmetros de sensibilidade e especificidade, além de outros indicadores, tais como eficácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de verossimilhança.

Resultados

A célula N2A apresentou 90% de sensibilidade e especificidade, enquanto que a célula McCoy obteve 95% para os mesmos parâmetros. Os valores foram baseados em pontos de cortes otimizados para cada uma das células.

Conclusões

Observou-se que a célula McCoy permite obter estimativas de acurácia superiores aos resultados observados com a célula de N2A, representando um método alternativo eficaz no isolamento do vírus rábico.

Abstract

Objectives

No population-based studies have been conducted to show the potential for the use of virological diagnosis of the rabies virus. The objective of the present study was to estimate accuracy parameters for the isolation of the rabies virus in McCoy cells as an alternative method and to compare this with the use of murine neuroblastoma (N2A) cells, which is considered to be a reference method.

Correspondência para/ Correspondence to:

Yeda L Nogueira
Departamento de Epidemiologia
Faculdade de Saúde Pública - USP
Av. Doutor Arnaldo, 715
01246 904 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: ynogueir@usp.br

Baseado em tese de doutorado apresentado à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2001.
Recebido em 27/1/2003. Reapresentado em 28/7/2003. Aprovado em 13/10/2003.

Methods

An evaluation was performed on 120 bats collected at random in the Atlantic Forest of the State of São Paulo. The immunofluorescence reaction was utilized for the detection of the rabies virus isolated from the brain of these bats and the presence of the virus was tested in the two cell culture systems. Two data sets were constructed with the results and the analysis was performed using the computer methods for diagnosis tests (CMDT) software by means of the two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) technique to determine sensitivity and specificity parameters, as well as other indicators such as efficacy, positive predictive value, negative predictive value and likelihood ratio.

Results

N2A cells presented 90% sensitivity and specificity, while McCoy cells presented 95% sensitivity and specificity. These values were based on cut-off points optimized for each cell type.

Conclusion

The study showed that McCoy cells allowed the obtaining of accuracy estimates that were better than for N2A. The McCoy cell method is therefore an effective method for the isolation of the rabies virus.

INTRODUÇÃO

Em 1978, as células de neuroblastoma murino oriundas de diferentes clones foram introduzidas para o isolamento do vírus rábico,^{19,23} bem como para o estudo da patogenia da raiva.²² As células de cultivo também foram empregadas para produzir kits a serem utilizados em sorologia.¹⁶

Os peritos da Organização Mundial de Saúde (OMS) preconizavam a inoculação do vírus rábico em camundongos jovens – de até 21 dias de idade –, a chamada prova biológica, na qual o exame de diagnóstico era realizado *post-mortem*. Entretanto, depois de sucessivos estudos que comparavam a inoculação em camundongos e o isolamento do vírus em células de neuroblastoma murino (N2A), os peritos admitiram que esse último método poderia ser utilizado para diagnosticar a doença, conforme a metodologia descrita nos manuais de técnicas laboratoriais para raiva.^{3,20}

Os primeiros resultados com as células McCoy¹² demonstraram que elas isolam com facilidade o vírus da raiva. Em estudos nos quais foram comparados os resultados obtidos com a titulação em camundongos e a com células McCoy – cálculo do *end point* –,¹³ foi demonstrada a excelente replicação do vírus rábico nessa célula, indicando o seu possível uso para a titulação.

As células McCoy apresentam características de grande sensibilidade para o isolamento do vírus rábico, sendo descrito o seu isolamento no liquor de paciente suspeito de raiva.¹⁴ Posteriormente, foi comprovado que o caso era efetivamente de raiva huma-

na, após longo período sem a ocorrência de raiva autóctone no Estado de São Paulo, o que o isolamento clássico – a prova biológica não detectou o vírus rábico, este caso foi definido clinicamente.

Essa capacidade da célula McCoy em isolar vírus rábico mesmo em baixas concentrações – baixa carga viral – faz desse método uma ferramenta de grande utilidade no estudo da circulação do vírus rábico em reservatórios naturais e silvestres. Entretanto, apesar de sua eficácia, ele ainda não foi validado para ser utilizado em laboratórios de diagnóstico da doença.

Além dos resultados serem compatíveis com a prova biológica, a McCoy é uma célula fácil de trabalhar. Tem um custo de manutenção bem mais baixo do que a N2A ou de uma colônia de camundongos, pois utiliza meio nutritivo mínimo e necessita de metade de soro fetal bovino para suplementar esses meios.

Observou-se assim a ausência de um estudo de âmbito populacional para validar essa metodologia alternativa. Por essa razão, o presente trabalho teve como objetivo validar o método de diagnóstico alternativo (célula McCoy), utilizando a cultura celular N2A como método de referência, de acordo com o modelo de validação proposto por Greiner & Gardner.⁸

Greiner & Gardner⁸ atribuem às curvas ROC (*receiver operating characteristic*) um valor utilitário, pois com uma análise gráfica é possível determinar as estimativas de parâmetros importantes. Obtém-se a melhor relação entre sensibilidade e especificidade e se otimiza o valor do ponto de corte em uma dada população-alvo com uma prevalência conhecida.

MÉTODOS

O estudo de validação foi realizado em uma amostra aleatória de morcegos capturados no Parque Estadual Intervales (PEI), no Estado de São Paulo, avaliados quanto à presença de infecção por vírus rábico nos dois sistemas de cultivos celulares.

Foram feitas cinco coletas realizadas no período de 20 meses, nas quais foram capturados morcegos adultos de várias espécies, e de ambos sexos. Portanto foi um inquérito epidemiológico (*screening*).

Os resultados do estudo foram comparados por meio de medidas indicadoras, tais como: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, eficiência, índice de Youden,²⁴ classificação incorreta e razão de verossimilhança positiva e negativa utilizando a técnica de *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC)⁷ por meio do programa computacional *Computer Methods for Diagnostic Tests* (CMDT).⁴

As tentativas de isolamento foram feitas por meio de inoculação (solução 2% de cérebro macerado) de cada morcego capturado (unidade de análise) em duas linhagens diferentes de cultivo celular (células de neuroblastoma murino – N2A, método de referência – e células McCoy¹² – método a ser validado). Foram realizadas duas passagens consecutivas de cada cérebro em cada tipo de cultura celular. A segunda passagem foi realizada em placas de 96 poços e foram utilizados três poços para cada unidade de análise (cérebro). Para preservar as condições de um teste cego, cada cérebro foi numerado e codificado, impossibilitando o reconhecimento da espécie de morcego que estava sendo analisada.

A interpretação do diagnóstico laboratorial foi baseada na leitura dos focos fluorescentes observados diretamente dos poços após reação de imunofluorescência direta em microscópio invertido IM-35 (Zeiss).

A variável de estudo foi, portanto, ligada ao diagnóstico laboratorial, que variou numa escala de zero a 4+, sendo que a reação considerada positiva era representada por 1+, 2+, 3+ e 4+.

O tamanho da amostra de morcegos foi calculado¹¹ com base na prevalência prevista e já conhecida em isolamentos em células de neuroblastoma murino (N2A), fixada em 10%, a precisão estipulada em 5% e com intervalo de confiança de 95%. O número mínimo estimado foi de 138 elementos. Foram capturados 166 morcegos, mas apenas 120 foram analisados, por perdas e exclusão de fêmeas grávidas. Dessa for-

ma, foi necessária a adoção de outros parâmetros, para populações finitas de acordo com os mesmos autores.¹¹ Considerando-se, então, para uma amostra (N=120), a prevalência da doença em uma população não endêmica que varie entre 0,3 a 1,5% (representando o número esperado com a característica desejada), foi mantida a mesma prevalência de 10% de infecção esperada para a célula N2A. O número de 120 morcegos foi considerado como o tamanho mínimo da amostra a ser estudada com um intervalo de confiança de 95%.

Foi utilizada também uma amostra complementar de 19 morcegos oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo, objetivando comparar e avaliar o grau de concordância dos resultados com os obtidos em outras duas metodologias: o isolamento em cultivos celulares (McCoy e N2A) e a prova biológica (inoculação em camundongos).

Os resultados dos diagnósticos realizados com os 120 morcegos foram colocados em um banco de dados, apoiado pelo programa Epi Info 6.4⁵ e depois exportados para outros programas estatísticos como Medcalc¹⁸ e CMDT.⁴ Dessa forma, foi possível calcular os parâmetros de sensibilidade e especificidade e, a partir desses, outros indicadores: eficiência, índice de Youden,²⁴ razão de verossimilhança, classificação incorreta, valores preditivos positivo e negativo.

Além de serem obtidos os valores otimizados, ou seja, com a menor perda dos valores dos parâmetros de sensibilidade e especificidade, também foi alcançado o melhor valor do ponto de corte para o método de diagnóstico.

Para se avaliar o viés da amostragem, foi utilizada a técnica de Bland & Altman.² Para verificar a linearidade entre os dois métodos, foi utilizada a técnica de Passing-Bablok,¹⁵ além das estatísticas de Wilcoxon,¹⁷ realizadas para avaliar as diferenças entre as médias dos dois grupos – sistemas celulares N2A e McCoy – e coeficiente de correlação de Spearman,¹⁷ para verificar a correlação entre os dois métodos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo teste de Wilcoxon,¹⁷ a diferença entre as médias apontou $p=0,046$, apresentando 15 diferenças positivas e 23 negativas entre os resultados pareados. Representa uma diferença significativa, porém muito próxima ao limite de significância 0,05. O teste de Spearman,¹⁷ comparando os mesmos resultados pareados observados nas leituras de ambos os métodos, detectou uma correlação estatisticamente significativa ($p=0,0001$) $r=0,614$ (0,489-0,715).

A Figura 1 mostra a reta de regressão de Passing-Bablok.¹⁵ Observa-se a linearidade entre os dois métodos, porém com um desvio proporcional significativo ($p < 0,01$). Essa análise foi realizada por meio de um teste de hipótese, apresentado no Apêndice.

Na análise de Bland & Altman,² o resultado observado também mostrou não haver viés na amostra, apesar do valor da média resultante das diferenças entre os resultados pareados das leituras dos dois sistemas celulares ter sido igual a -3,5, quando a média ideal deve ser igual a zero. No entanto, o valor está dentro do intervalo de tolerância – ou seja, dentro do limite da média mais dois desvios-padrão –, sendo considerada uma amostra não viciada, cuja interpretação leva em conta que um método pode substituir o outro.

As Figuras 2A e 2B mostram os dois gráficos (TG-ROC) onde são observados os valores otimizados dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos dois sistemas celulares (N2A e McCoy). Outro resultado importante determinado pelo gráfico foi o ponto de corte (*cut off*), pois ele pode minimizar os efeitos dos resultados falsos positivos e falsos negativos.

Na Tabela 2, observam-se os indicadores obtidos com o ponto de corte mais adequado pela análise gráfica realizada pela técnica de TG-ROC. No caso da célula N2A, as estimativas dos parâmetros de sensibilidade e especificidade foram de 90% tanto para sensibilidade como especificidade. O ponto de corte que determinou esses valores foi representado por 1+ ou 25% de células infectadas presentes no campo visual da leitura ao microscópio. Para esse mesmo ponto de corte, as estimativas dos outros indicadores também apresentaram os valores

otimizados, assim como os indicadores para eficiência do teste igual a 90%. A probabilidade de classificar os resultados observados incorretamente foi igual a 9%. A razão de verossimilhança positiva (RV+) definida como a chance do resultado positivo vir a diagnosticar a verdadeira doença e não um resultado falso apresentou valor igual a nove. Isso equivale a dizer que a chance do resultado positivo ser diagnosticado como doença é nove vezes a de ser verdadeiro do que esse diagnóstico representar um resultado falso positivo. A razão de verossimilhança negativa (RV-) para o mesmo ponto de corte foi igual a 0,11, o que implica na chance de 11 em cada 100 diagnósticos negativos serem falsos negativos.

Em relação à célula McCoy, os mesmos indicadores apresentaram resultados superiores aos observados na célula N2A. As estimativas de sensibilidade e especificidade foram de 95%, apesar do nível de cor-

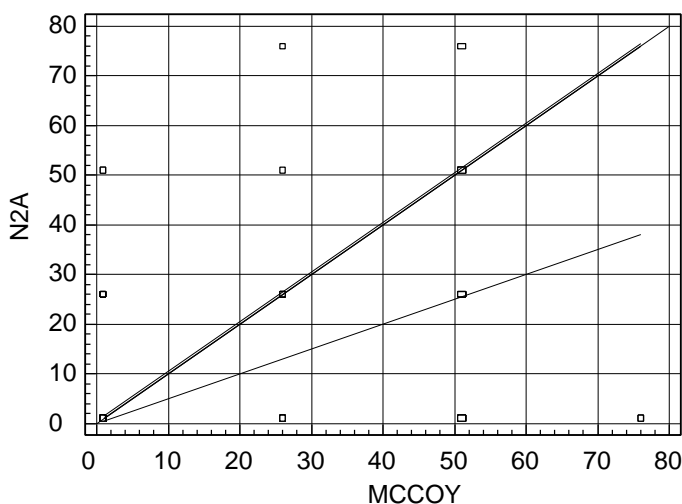


Figura 1 - Reta de regressão demonstrando a linearidade dos dois métodos (N2A e McCoy) com desvio da linearidade apresentando valor de $p=0,01$ (Técnica de Passing-Bablok).

Tabela 1 - Número de células, média, intervalo confiança, desvio-padrão, valores máximo e mínimo.

Células (N)	Média aritmética	Intervalo confiança	Desvio padrão	Valor máximo*	Valor mínimo*
N2A (120)	11,62	8,54-14,70	17,04	76,00	1,00
McCoy (120)	15,16	11,38-18,95	20,93	76,00	1,00

*Foram acrescentados o valor de 1 a todos os resultados para evitar divisão por zero.

Tabela 2 - Estimativas dos indicadores baseados nos parâmetros de sensibilidade e especificidade.

Células	N2A %	IC (%)	McCoy %	IC (%)
Ponto de corte	25,00	(16,00 - 39,90)	37,50	(27,50 - 47,50)
Sensibilidade	90,00	(83,91 - 96,09)	95,00	(90,05 - 99,50)
Especificidade	90,00	(83,91 - 96,09)	95,00	(90,05 - 99,50)
Valor preditivo (+)	38,88	(28,96 - 48,80)	38,88	(28,91 - 48,95)
Valor preditivo (-)	99,02	(97,04 - 100,00)	99,01	(97,05 - 100,00)
Eficiência	90,00	(83,91 - 96,09)	95,00	(90,05 - 99,50)
Índice de Youden	80,00	(71,95 - 88,05)	90,00	(88,80 - 96,20)
Classificação incorreta	0,093	(-5,97 - 6,99)	0,067	(-5,77 - 5,91)
Razão verossimilhança (+)	9,00	(3,10 - 14,90)	19,00	(10,90 - 27,10)
Razão verossimilhança (-)	0,11	(-0,57 - 0,79)	0,052	(0,005 - 0,522)

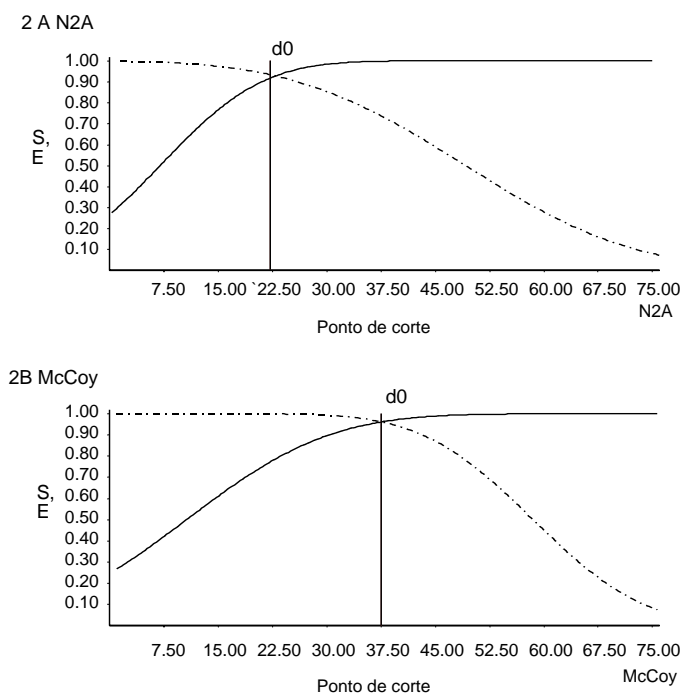


Figura 2 - Two-Graph- Receiving Operator Characteristics (TG-ROC) analysis. Curvas de Especificidade (—) e Sensibilidade (---). (2A) Célula N2A $S = E = 90\%$, $d_0 = 25,00\%$ ponto de corte estimado para análise não paramétrica. (2B) Célula McCoy $S = E = 95\%$, $d_0 = 37,50\%$ pontos de corte para a análise não paramétrica.

te estar dentro também da faixa de 1+. No entanto, a proporção de células infectadas correspondeu a 38% do campo visual observado no microscópio.

A razão de verossimilhança positiva para a célula McCoy foi igual a 19, demonstrando que a chance do diagnóstico positivo em uma população saudável ser verdadeiro é 19 vezes maior à do resultado ser falso positivo para esse ponto de corte de 38%. Representa uma chance duas vezes maior em relação à metodologia com a célula N2A. Já a estimativa da razão de verossimilhança negativa foi de 0,052, o que representa uma chance do resultado ser falso negativo igual a 5%, a metade daquela para a célula N2A. Ou seja, apenas cinco em cada 100 diagnósticos negativos podem ser resultados falsos negativos.

A eficiência do teste com a célula McCoy foi igual a 95%, caracterizando uma superioridade ou facilidade para o isolamento do vírus da raiva em relação à célula N2A.

No entanto, o método de leitura em cruces pode ser subjetivo e apresentar poucas variações, dependendo do observador. Essa leitura é diferente de uma outra leitura mecânica (densidade óptica – DO – ou radioatividade), em que os resultados obtidos são números contínuos. Apesar disso, a imunofluorescência é uma técnica que apresenta 98% de sensibilidade e especi-

ficidade³ o que reduz sensivelmente a possibilidade de erros. Todavia, na atribuição de valores limiares, é bem possível que ocorram diferenças entre observadores, principalmente na atribuição de valores entre 1+ e 2+. Podem acontecer, dessa forma, alguns resultados falsos positivos ou negativos nessa região denominada de zona cinza, local em que também é estabelecido o ponto de corte. Nessa situação, os resultados considerados falsos positivos ou falsos negativos poderão aumentar ou diminuir dependendo de cada observador. O ponto de corte poderá ser uma decisão arbitrária que vai definir os valores de sensibilidade e especificidade. O ponto de corte, portanto, é um fator crítico nos testes laboratoriais.⁸

Nas Figuras 3A e 3B, observam-se as distribuições dos resultados das leituras em cruces e, exatamente entre os valores atribuídos em 1+ e 2+, há a maior diferença entre os dois métodos. Nas Figuras 2A e 2B, o nível de corte divide a figura em lado esquerdo, no qual estão representados os valores negativos, e o lado direito, onde estão os resultados considerados positivos. Nota-se que os valores do ponto de corte estão acima do valor representado por 1+ (25%), para a célula N2A e em 37,5% para célula McCoy. Dessa forma, elimina os possíveis falsos negativos da leitura, dando uma boa margem de segurança para o diagnóstico correto, o que foi observado no índice de Youden²⁴ com valor igual a 90% (Tabela 2).

Os testes de diagnóstico não são perfeitos, mas existe uma probabilidade de acertos. Um teste só será considerado perfeito quando a sensibilidade e especificidade forem iguais a 100%, quando a prevalência da doença for correta e se comparada com padrão ouro (método capaz de reproduzir ou diagnosticar a verdadeira doença, como a biópsia, por exemplo).¹⁰

No caso da raiva, o método considerado padrão ouro, além da biópsia *post-mortem*, pode ser a inoculação em camundongos de material colhido do paciente (prova biológica). Nesse caso, o isolamento realizado por essa prova vai detectar a doença e não a infecção, como ocorre com o isolamento realizado com os dois métodos de cultivo celular. Assim, na Tabela 3, observam-se os isolamentos realizados em cultura de células. Apenas os resultados obtidos com 3+, na célula McCoy, concordaram com os resultados positivos obtidos na prova biológica, o que equivale a 75% das células infectadas observadas no campo visual do microscópio. Já com as células N2A, os três

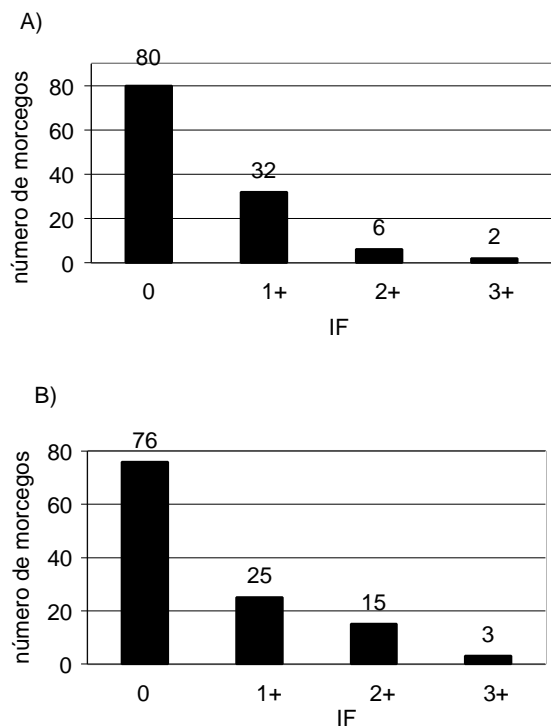


Figura 3 - Distribuição dos resultados de infecção dos morcegos observados com a técnica de imunofluorescência nas células N2A (3A) e células McCoy (3B).

casos positivos na prova biológica apresentaram dois valores iguais a 2+ e apenas um igual a 3+. O teste de correlação de Spearman¹⁷ apresentou uma forte correlação entre os dois métodos de cultivo celular, cujo coeficiente r foi igual a 0,797 (0,536-0,918) e um valor de $p=0,0007$. A correlação dos coeficientes entre a prova biológica e as duas células foi média $r=0,647$ (0,273-0,851) e $p=0,006$, para N2A, e $r=0,677$ (0,536-0,918) e $p=0,004$, para McCoy. O valor de correlação nesse segundo estudo (Tabela 3) foi maior que no primeiro (Tabela 1) analisado acima, mas deve-se lembrar que a o segundo estudo a amostra é menor e foi coletada num local de foco, ou seja, já havia apresentado casos de raiva em morcegos, diferente da outra amostra, coletada aleatoriamente e, se pressupunha, de animais saudáveis.

Em um próximo trabalho, dever-se-á analisar mais detalhadamente essa questão do ponto de corte para o verdadeiro *status* da doença e da infecção, como

indicador da presença do vírus em uma população de morcegos.

O método de isolamento utilizando a célula McCoy apresentou todos indicadores de acurácia superiores em relação à célula N2A. A análise com a técnica de TG-ROC foi muito útil para estimar os indicadores dessa validação preliminar entre os dois sistemas celulares como métodos de diagnóstico. A análise gráfica realizada com o programa computacional CMDT⁴ para analisar a TG-ROC permitiu visualizar os parâmetros de sensibilidade e especificidade e, a partir deles, estimar todos os outros indicadores, eliminando o viés de distribuição da amostra, que é não paramétrica.

A técnica ROC²⁵ é considerada um método valioso para comparar testes alternativos para um determinado método de diagnóstico. Ela apresenta os melhores parâmetros de sensibilidade e especificidade para resultados que possuam uma distribuição normal. Por isso, a análise realizada com a técnica TG-ROC foi a mais adequada para estimar os parâmetros de validade no presente estudo.

Outra questão que deve ser analisada refere-se ao padrão de referência utilizado. A célula de neuroblastoma representa um padrão imperfeito, pois, segundo critérios estabelecidos,⁹ os resultados negativos de isolamentos realizados em células nem sempre significam que o animal não está infectado, uma vez que a especificidade não foi 100%.⁸ Mesmo na prova considerada como padrão ouro – nesse caso, a prova biológica –, só é possível obter diagnóstico positivo em situações em que o título viral apresente uma dose letal suficiente para matar 50% dos animais inoculados. Dessa forma, a concentração de partículas virais necessária é superior àquelas concentrações de vírus encontradas em reservatórios silvestres ou em amostras naturais.¹⁰ O vírus circulante num reservatório é mantido em baixas concentrações para permitir a infecção e a manutenção na espécie que o alberga.¹

No isolamento realizado em cultivo celular, considera-se o número de partículas virais presentes no inóculo, que terá capacidade de infectar a célula, a qual não está sujeita a interferência da resposta imune.

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos no teste de imunofluorescência direta nas células N2A e McCoy com a prova biológica em camundongos.

Célula imunofluorescência	N2A	McCoy	Prova biológica (nº de mortes)
0	1	1	0/19
1+	12	8	0/19
2+	5	7	0/19
3+	1	3	3/16
Total	19	19	19

Já na inoculação em camundongos, a resposta imune pode interferir e mascarar a infecção, aparecendo animais infectados, porém assintomáticos. Para vencer a resposta imune e o animal ficar doente, há a necessidade de uma carga viral maior. Mesmo assim, a quantidade da carga viral não é fixa, variando conforme a própria capacidade do camundongo em ser um bom respondedor ou não. Animais bons respondedores exigem uma carga viral maior, enquanto que maus respondedores necessitam de uma concentração menor de vírus para ficarem doentes, por apresentarem uma baixa imunidade. Pequenas concentrações de vírus vivo, quando inoculados, podem funcionar como vacina, induzindo também à resposta imune. Portanto, tais considerações teóricas devem ser levadas em conta na escolha e na análise do padrão ouro.²¹

A validação de testes de diagnóstico sem padrão ouro pode incorrer em vícios e superestimar os resultados.⁸ Os desenhos dos estudos também podem induzir a análises viciadas. Inquéritos epidemioló-

gicos (*screening*) de doenças infecciosas são exemplos muito difíceis de validar, pois, se a metodologia empregada não for apropriada ao diagnóstico, na amostra populacional podem existir sub-populações de indivíduos com infecção latente. Esses são alguns fatores que podem induzir a um resultado viciado. Outras técnicas de validade devem, então, ser observadas para melhor estimar a acurácia de um novo método de diagnóstico, envolvendo estimativas computacionais que utilizem a função de máximo verossimilhança sob o ponto de vista de inferência Baysiana.⁶ Em próximo trabalho será realizada uma análise desse tipo para definir o verdadeiro status da doença e a prevalência da doença no reservatório silvestre estudado.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Sabina L. D. Gotlieb, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pelas sugestões realizadas no presente texto.

REFERÊNCIAS

1. Anderson R, May R. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 1982;85:411-426.
2. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8:307-11.
3. Bourhy H, Sureau P, Hirose JM. Comparaison des techniques de detection et d'isolament. In: Institute Pasteur. *Methods de laboratoire pour le diagnostic de la rage*. Paris; 1991. p. 78.
4. Briesofsky J. *Computer Methods for Diagnostic Tests (CMDT)*. <URL: <http://www1.vetmed.fu-berlin.de/~mgreiner/CMDT/poster.htm>> [2004 Mar 8]
5. Dean AG, Dean AJ, Comlombier D, Burton AH, Brendel KA, Smith DC et al. *Epi Info version 6: a word processing, data base, and statistics program for epidemiology on microcomputers*. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention; 1994.
6. Enoe C, Georgiadis MP, Johnson WO. Estimation of sensitivity and specificity of dianostic tests and disease prevalence when the true diseade state is unknown. *Prevent Veterinary Med* 2000;45:61-81.
7. Greiner M. Two-graph receiver operating characteristics (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off vallues that minimise overall misclassification costs. *J Immunol Methods* 1996;191:93-4.
8. Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation diagnostic tests. *Prevent Veterinary Med* 2000;45:3-22.
9. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prevent Veterinary Med* 2000;45:23-41.
10. Krammer HC. *Evaluating medical tests- objective and quantitative guidelines*. Newbury Park: Sage Publications; 1992.
11. Lwanga S, Lemeshow S. *Sample size determination in health studies*. Genève: WHO; 1991.
12. Nogueira YL. Rabies virus in McCoy cell line. Part I: Cytopathic effect and replication. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1992;52:9-16.
13. Nogueira YL, Amaral CA. Rabies virus in McCoy cell line. Part II: Titration. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1992;52:17-21.
14. Nogueira YL. Morphometric analysis of McCoy cells inoculated with cerebrospinal fluid from patient with rabies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:509-14.
15. Passing W, Bablok H. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Aplication of linear regression procedures methods for comparison studies on clinical chemistry (Part I). *J Clin Chem Biochem* 1987;21:709-20.

16. Perrin E, Rolin PE, Sureau P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J Biol Stanrdization* 1986;14:217-22.
17. Sachs L. The comparison of independent data. In: *Applied Statistics A Handbook of Techniques*. 2nd ed. New York: Verlag Spring; 1984. p. 299-303.
18. Schoonjans F. *MedCalc statistics for biomedical research*. Belgium; 1998.
19. Smith A, Tignor G, Emmons R, Woodie J. Isolation of field rabies strains in CER and Murine Neuroblastom cell culture. *Interviol* 1978;9:359-61.
20. Smith JS, King A. Monoclonal antibodies for identification of rabies and non-rabies lyssavirus: In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 133-44.
21. Somoza E, Mossman D. Comparing and optimizing diagnostic tests: information-theoretical approach. *Med Decis Making* 1992;12:179-88.
22. Tsiang H. An in vivo study of rabies pathogenesis. *Bull Inst Pasteur* 1985;83:41-5.
23. Webster W. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can J Vet Res* 1987;51:367-9.
24. Youden D. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3:32-5.
25. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots- a fundamental evaluation tool clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561-77. [Erratum in *Clin Chem* 1993;39(8):1589].

APÊNDICE

Passing & Bablok regression

A interpretação dos resultados depende da análise da equação de regressão a seguir apresentada: Passing and Bablok regression.

Variável X: N2A

Variável Y: MCCOY

Amostra = 120

Equação de regressão

$$Y = 0,0000 + 1,0000 X$$

Intercepto A: 0,0000

95% CI: -1,0000 to 0,0000

Slope B: 1,0000

95% CI: 1,0000 to 2,0000

teste para linearidade

Desvio Significante da linearidade (P<0.01)

Essa expressão é entendida da seguinte forma: se o

Intervalo de Confiança (IC) do intercepto A pode ser usado para o teste de hipótese onde:

- H0: os dois métodos são iguais
- HA: os dois métodos são diferentes

Segundo a técnica de Passing-Bablok (1983), o resultado da reta de regressão é avaliado na forma de um teste de hipótese onde:

- A= 0; a hipótese é aceita, se o IC contiver o 0

No caso do valor da inclinação da reta, o Intervalo de confiança de B pode ser usado novamente como um teste de hipótese:

- H0: os dois métodos apresentam a mesma linearidade
- HA: os dois métodos apresentam linearidades diferentes.

Para aceitar H0 é necessário que o valor de B e o IC contenham o 1 (B=1). Se o valor de B for diferente de 1, então rejeita-se H0 e aceita-se HA. Esse resultado indica que há linearidade mas que ela é proporcionalmente diferente, pois se p<0,01, esse valor define o desvio da linearidade.

$$B = 1,0 \text{ IC } (1,0 - 2,0)$$