

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA REAÇÕES QUANTITATIVAS DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

II. Análise seqüencial de probabilidade direta aplicada ao sistema moléstia de Chagas

Astolpho Ferraz de SIQUEIRA (1)

RESUMO

Usando os mesmos critérios adotados para antígenos mais puros como a cardiolipina e fosfolípidos extraídos do bacilo da tuberculose, foram comparados antígenos de *T. cruzi*, aplicando a análise seqüencial de probabilidade direta. Dois tipos de testes foram usados para êste estudo comparativo, um para a comparação da reatividade específica e outro para a reatividade não específica.

Os resultados nas várias condições estudadas foram os seguintes: 1) Os antígenos preparados do mesmo pó de tripanossomas e no mesmo dia satisfizeram as condições de igualdade na prova para reatividade específica, dentro dos critérios adotados. 2) Dos antígenos preparados do mesmo pó mas, em épocas distintas, o mais velho (93 dias) foi aprovado no teste para reatividade específica, quando comparado com o mais novo (16 dias). 3) O antígeno mais velho, comparado com o mais novo no teste para reatividade não específica, também foi aprovado.

INTRODUÇÃO

A aferição dos antígenos por métodos adequados é uma condição necessária para a comparação de resultados nas reações de fixação do complemento. A aprovação de um antígeno novo não pode estar condicionada apenas à verificação do seu poder hemolítico, anticomplementar e fixador, em dosagens realizadas com um soro ou uma mistura de soros reagentes. O seu estudo por meio de reações paralelas com um antígeno tomado como padrão, ambos reagindo nas mesmas condições com vários soros reagentes ou não reagentes, traz informa-

ções que podem satisfazer os requisitos necessários para a substituição de um pelo outro. Para êsse estudo é preciso comparar pontos definidos de reação para cada soro, pontos que poderão ser representados pelo título máximo obtido em reações provocadas por volumes variados de cada soro usado na comparação. As discrepâncias porventura notadas entre os títulos máximos obtidos com cada soro, reagindo com os dois antígenos, poderão ser devidas ao comportamento diverso dos antígenos, mas poderão também estar relacionadas com a variação

Departamento de Parasitologia (Diretor: Prof. Dr. Mauro Pereira Barretto), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo.

(1) Professor Assistente-docente.

Nota — Os dados dêste trabalho constituíram parte da tese de docência defendida pelo autor em 1963.

inerente à técnica empregada. Assim, o conhecimento prévio da variação da técnica é essencial para a determinação de um critério de discriminação das discrepâncias. O problema de se tolerar o aparecimento de maior ou menor número de discrepâncias numa dada comparação, será resolvido de acordo com a finalidade da comparação, pois são as conseqüências do risco de uma decisão que deverão influir para a definição dos limites de tolerância. Estabelecidos estes limites, resta verificar se os dados obtidos numa série de observações são suficientes para uma decisão de aceitação ou rejeição. O sistema de verificação mais eficiente deve indicar o momento de decisão com o menor número de observações. Tal sistema não justifica as condições de aceitação ou rejeição, mas indica simplesmente se os dados acumulados permitem decidir dentro das bases estipuladas.

O presente trabalho mostra as condições para a comparação de antígenos de *T. cruzi* usados normalmente na reação "quantitativa" de FREITAS & ALMEIDA⁶. Os critérios adotados foram os mesmos usados para a comparação de antígenos mais puros como a cardiolipina por PANGBORN & col.⁸ ou fosfolípidos extraídos do bacilo da tuberculose por ALMEIDA². A adoção destes critérios se baseou nos resultados de ALMEIDA & SIQUEIRA⁴ que em 299 pares de reações realizadas com os mesmos elementos, não verificaram discrepâncias maiores que 16% entre os títulos obtidos em cada par.

MATERIAL E METODOS

A preparação dos elementos usados nas reações e a técnica de execução das mesmas já foram descritas em trabalho anterior, SIQUEIRA⁹.

A comparação dos antígenos foi feita pelos métodos desenvolvidos por THOMPSON¹⁰, e MALTANER & THOMPSON⁷, que aplicaram a análise seqüencial de probabilidade direta para a comparação de antígenos de cardiolipina. Nesta comparação, dois tipos de testes são realizados, o propósito do primeiro é salvaguardar contra a reatividade não específica do antígeno em prova, o do outro é evitar antígenos de reatividade diversa do que foi tomado como referência.

Prova para reações não específicas — A prova é realizada com 3,6 unidades de complemento, que é a quantidade usada para a separação de soros reagentes pela técnica de FREITAS & ALMEIDA⁶. Os soros são examinados em reações paralelas com o antígeno em prova e com o antígeno padrão, ambos usados na dose de reatividade ótima, que no sistema moléstia de Chagas, tipo I de isofixação ALMEIDA¹, corresponde às doses de reatividade paralela. Reações com menos de 100% de hemólise são lidas no foto-colorímetro. Será chamada observação a um par de reações, uma feita com o antígeno padrão e a outra com o antígeno a ser provado. Uma observação será considerada admissível quando a reação com o antígeno padrão permitir hemólise de 90% ou mais, e admissível defeituosa quando a hemólise obtida com o antígeno em prova for igual ou menor que 80%; em caso contrário será classificada como não defeituosa.

O critério adotado para aceitar ou rejeitar um antígeno neste tipo de comparação difere daquele a ser adotado nas provas para reações específicas. Nestas os limites de tolerância adotados serão mais estreitos que naquelas.

Nós concordamos em aceitar um antígeno em prova para reações não específicas, quando há menos de 2% de probabilidade de aparecerem menos de 97,5% de reações não defeituosas, e em o rejeitar quando há menos de 2% de probabilidade de aparecerem mais de 99,5% de reações não defeituosas. Em outras palavras, aceitar quando a probabilidade de aparecimento de reações não defeituosas for muito pequena, e rejeitar quando a probabilidade for muito pequena de aparecerem muitas reações não defeituosas.

A Tabela I, construída para estes limites, indica-nos os momentos de decisão conforme o número n de observações admissíveis.

Em n observações com a defeituosas, o antígeno será aceito se n não for menor que n^*a , e será rejeitado se n não for maior que $n^{**}a$. Não aparecendo a oportunidade de aceitar ou rejeitar, as observações devem ser continuadas até que os dados acumulados permitam uma decisão. A prova deve ter um mínimo de 155 observações admissíveis, e não poderá ultrapassar 538.

TABELA I

Decisões no teste seqüencial de probabilidade direta para reatividade não específica, indicando a primeira oportunidade para aceitar ou rejeitar um antígeno

| Número de observações defeituosas | Aceitar se o número de observações n , é igual ou maior que: | Reprovar se o número de observações n , é igual ou menor que: |
|-----------------------------------|--|---|
| (a) | (n'a) | (n'a) |
| 0 | 155 | — |
| 1 | 231 | 4 |
| 2 | 299 | 43 |
| 3 | 362 | 114 |
| 4 | 421 | 204 |
| 5 | 479 | 307 |
| 6 | 536 | 419 |
| 7 | — | 538 |

O risco de uma decisão errada, em um e outro sentido, é de 2% e a percentagem de concordância está entre 97,5% e 99,5%. (De "Cardiolipin antigens", WHO, 1951).

Prova para reações específicas — Em reações paralelas entre os mesmos soros, o antígeno a ser provado e um outro tomado como padrão, são determinados os títulos de cada soro com cada um dos antígenos. Soros com 10% de hemólise ou menos com o antígeno padrão, em presença de 3,6 unidades de complemento, são usados na prova de comparação da reatividade específica. A técnica da reação já foi referida anteriormente. Várias diluições de cada soro, feitas de acordo com a Tabela II, são postas a reagir com cada um dos antígenos.

Os resultados das reações são dados em graus de reatividade G como foi proposto por ALMEIDA & THOMPSON⁵. No sistema moléstia de Chagas os valores de G são calculados pela Tabela II de ALMEIDA & SIQUEIRA⁴. Para cada soro é procurado um valor de G que será o máximo entre os en-

contrados com cada uma das diluições usadas, desde que o valor mais próximo não difira dele mais que 0,110. Isto corresponde à exigência de que o título máximo calculado como $D(K_{S,A}^2 - 1)$, numa série de diluições do soro, não difira de 2/9 do imediatamente inferior. Se em uma determinada reação não fôr satisfeita esta condição, ela será considerada inadmissível. Observação admissível será então um par de valores de G . As observações admissíveis são classificadas em defeituosas, quando a discrepância entre os títulos do soro no par de reações fôr maior que 16%, e não defeituosa quando fôr menor. Isto corresponde a dizer que uma observação é defeituosa se a diferença entre os valores de G , para cada antígeno, é igual ou maior que 0,070.

A decisão de aceitar um antígeno em prova de reatividade específica foi tomada, de acordo com MALTANER & THOMPSON⁷, quando houvesse menos de 2% de probabilidade de aparecerem 75% de observações não defeituosas, isto é, quando a probabilidade de aparecimento das observações não defeituosas fôsse muito pequena. A decisão de rejeitar, quando houvesse menos de 2% de probabilidade de aparecerem mais de 85% de observações não defeituosas, isto é, quando a probabilidade fôsse muito pequena de aparecerem muitas observações não defeituosas.

A Tabela III construída para estes limites foi usada para indicar os momentos de decisão.

Depois de n observações, anotamos o número de defeituosas a e decidimos aceitar o antígeno, se n não é menor que $n'a$ e rejeitar se n não é maior que $n''a$. Se uma decisão não puder ser tomada devemos continuar a acumular observações. O risco de uma decisão errada é de 2% em um e outro sentido e a concordância das observações está no intervalo entre 75% e 85%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. *Comparação da reatividade específica de dois antígenos preparados no mesmo dia e do mesmo pó de tripanossomas* — Do mesmo pó de tripanossomas foram preparados os antígenos A e B pela técnica de

SIQUEIRA, A. F. de — Comparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para reações quantitativas de fixação do complemento. II. Análise seqüencial de probabilidade direta aplicada ao sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:268-276, 1964.

TABELA II

Valores dos graus de reatividade com 3,6 unidades de complemento

$$h = 0,20$$

$$G = \log D (K'_{S,A} - 1) - 0,121$$

| Hemólise | Fator de diluição* | | | | | | | |
|----------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1,0 | 1,3 | 1,8 | 2,4 | 3,2 | 4,2 | 5,6 | 7,5 |
| 10 % | 0,541 | 0,655 | 0,796 | 0,921 | 1,046 | 1,164 | 1,289 | 1,416 |
| 15 % | 0,491 | 0,605 | 0,746 | 0,871 | 0,996 | 1,114 | 1,239 | 1,366 |
| 20 % | 0,453 | 0,567 | 0,708 | 0,833 | 0,958 | 1,076 | 1,201 | 1,328 |
| 25 % | 0,421 | 0,535 | 0,676 | 0,801 | 0,926 | 1,044 | 1,169 | 1,296 |
| 30 % | 0,392 | 0,506 | 0,647 | 0,772 | 0,897 | 1,015 | 1,140 | 1,267 |
| 35 % | 0,366 | 0,480 | 0,621 | 0,746 | 0,871 | 0,989 | 1,114 | 1,241 |
| 40 % | 0,341 | 0,455 | 0,596 | 0,721 | 0,846 | 0,964 | 1,089 | 1,216 |
| 45 % | 0,318 | 0,432 | 0,573 | 0,698 | 0,823 | 0,941 | 1,066 | 1,193 |
| 50 % | 0,294 | 0,408 | 0,549 | 0,674 | 0,799 | 0,917 | 1,042 | 1,169 |
| 55 % | 0,270 | 0,384 | 0,525 | 0,650 | 0,775 | 0,893 | 1,018 | 1,145 |
| 60 % | 0,244 | 0,358 | 0,499 | 0,624 | 0,749 | 0,867 | 0,992 | 1,119 |
| 65 % | 0,217 | 0,331 | 0,472 | 0,597 | 0,722 | 0,840 | 0,965 | 1,092 |
| 70 % | 0,189 | 0,303 | 0,444 | 0,569 | 0,694 | 0,812 | 0,937 | 1,064 |
| 75 % | 0,155 | 0,269 | 0,410 | 0,535 | 0,660 | 0,778 | 0,903 | 1,030 |
| 80 % | 0,117 | 0,231 | 0,372 | 0,497 | 0,622 | 0,740 | 0,865 | 0,992 |
| 85 % | 0,067 | 0,181 | 0,322 | 0,447 | 0,572 | 0,690 | 0,815 | 0,942 |
| 90 % | 0,000 | 0,114 | 0,255 | 0,380 | 0,505 | 0,623 | 0,748 | 0,875 |

* Adicionar uma unidade aos valores de G correspondentes quando o fator de diluição fôr 10 vezes aquêle encontrado no quadro. (De ALMEIDA & SIQUEIRA, 1960).

FREITAS & ALMEIDA⁶. Êstes antígenos foram comparados entre si. Foram usados diluídos a 1:30, dose de reatividade ótima ou paralela, usada para a separação dos soros reagentes na rotina dêste Departamento. Os soros reagentes usados foram selecionados dos espécimes enviados a êste Departamento para o diagnóstico sorológico da moléstia de

Chagas e possuíam títulos os mais variados.

Um exemplo dos protocolos seguidos para as comparações de reatividade específica, é apresentado no Quadro I, com os graus de reatividade que foram calculados pela Tabela II.

As observações foram realizadas em dias sucessivos, um máximo de 10 em cada dia,

TABELA III

Decisões no teste seqüencial de probabilidade direta na prova de reatividade comparativa para especificidade, indicando a primeira oportunidade para aceitar ou reprová-lo um antígeno

| a | n'a | n''a | a | n'a | n''a | a | n'a | n''a |
|----|-----|------|----|-----|------|----|-----|------|
| 0 | 14 | — | 18 | 111 | 72 | 36 | 195 | 170 |
| 1 | 21 | — | 19 | 115 | 77 | 37 | 200 | 176 |
| 2 | 28 | — | 20 | 120 | 83 | 38 | 204 | 181 |
| 3 | 34 | 4 | 21 | 125 | 88 | 39 | 209 | 187 |
| 4 | 39 | 7 | 22 | 130 | 93 | 40 | 213 | 193 |
| 5 | 45 | 11 | 23 | 134 | 99 | 41 | 218 | 198 |
| 6 | 50 | 15 | 24 | 139 | 104 | 42 | 222 | 204 |
| 7 | 56 | 19 | 25 | 144 | 109 | 43 | 227 | 210 |
| 8 | 61 | 24 | 26 | 149 | 115 | 44 | 231 | 215 |
| 9 | 66 | 28 | 27 | 153 | 120 | 45 | 236 | 221 |
| 10 | 71 | 33 | 28 | 158 | 126 | 46 | 240 | 227 |
| 11 | 76 | 37 | 29 | 163 | 131 | 47 | 245 | 233 |
| 12 | 81 | 42 | 30 | 167 | 137 | 48 | 249 | 238 |
| 13 | 86 | 47 | 31 | 172 | 142 | 49 | 254 | 244 |
| 14 | 91 | 52 | 32 | 177 | 148 | 50 | 258 | 250 |
| 15 | 96 | 57 | 33 | 181 | 153 | 51 | 263 | 256 |
| 16 | 101 | 62 | 34 | 186 | 159 | 52 | 267 | 261 |
| 17 | 106 | 67 | 35 | 190 | 164 | 53 | — | 267 |

(De "Cardiolipin antigens" WHO, 1951).

tendo sido computadas diariamente as admissíveis para tomar uma decisão de acordo com a Tabela III. Os dados computados são apresentados no Quadro II.

Em 40 observações realizadas em 6 dias, uma apenas foi inadmissível; as outras 39 admissíveis foram classificadas, 4 em defeituosas e 35 não defeituosas. Assim, no dia 17/2/1961 tínhamos computado 39 observações admissíveis, com 4 defeituosas e 35 não defeituosas, isto é, n que é igual a 39, não é menor que $n'a$ que também é igual a 39. Decidimos então considerar os antígenos comparáveis na prova de reatividade específica.

2. *Comparação da reatividade específica de antígenos preparados em dias diferentes, do mesmo pó de tripanossomas* — Um pro-

blema importante a ser estudado nas reações de fixação do complemento é o da reprodutibilidade dos resultados de reações, praticadas com um mesmo antígeno em épocas diferentes. O problema prático se nos apresenta assim equacionado: um antígeno preparado em determinada época deve ser usado por período relativamente longo, às vezes até mais ou menos 2 meses, média de duração dos antígenos por nós usados nas reações de rotina para o diagnóstico sorológico da moléstia de Chagas. A forma prática que encontramos para abordar o problema consistiu em reproduzir o mesmo antígeno em épocas diferentes. Para isto fizemos uma mistura bem homogeneizada de vários pós de tripanossomas e a repartimos em 5 porções de 100 mg cada uma. Estas foram ampoladas em vácuo relativo e guar-

QUADRO I

Reatividades específicas dos antígenos A e B em testes com 3,6 unidades de complemento, realizados no dia 14/11/1960

| N.º do soro | Diluição | Hemólise % | | Reatividade | | Classificação da observação |
|-------------|----------|------------|----|----------------|----------------|-----------------------------|
| | 1: | A | B | G _A | G _B | |
| 1 | 7,5 | 40 | 50 | 1,216 | 1,169 | Não defeituosa |
| | 10,0 | 55 | 65 | 1,270 | 1,217 | |
| | 13,0 | 80 | 85 | 1,231 | 1,181 | |
| | 18,0 | 90 | 95 | 1,255 | ... | |
| 2 | 7,5 | 20 | 25 | 1,328 | 1,296 | Não defeituosa |
| | 10,0 | 45 | 55 | 1,318 | 1,270 | |
| | 13,0 | 65 | 75 | 1,331 | 1,269 | |
| | 18,0 | 85 | 90 | 1,322 | 1,255 | |
| 3 | 7,5 | 35 | 45 | 1,241 | 1,193 | Defeituosa |
| | 10,0 | 55 | 70 | 1,270 | 1,189 | |
| | 13,0 | 75 | 85 | 1,269 | 1,181 | |
| | 18,0 | 90 | 95 | 1,255 | ... | |
| 4 | 13,0 | 15 | 15 | 1,605 | 1,605 | Inadmissível |
| | 18,0 | 60 | 65 | 1,499 | 1,472 | |
| | 24,0 | 80 | 90 | 1,497 | 1,380 | |

dadas até o dia da preparação dos antígenos. Aceitando como estável o pó assim conservado, poderíamos aceitar como praticamente idênticos os antígenos que foram preparados em 5 datas diferentes, o último, 2 meses e 7 dias depois do primeiro. Abrindo as ampolas nas ocasiões oportunas foram usados os pós das mesmas na preparação dos antígenos A, B, C, D e E nos dias 13/3/61, 24/3/61, 7/4/61, 17/4/61 e 20/5/61. O antígeno mais velho (A) foi tomado como padrão e os outros foram comparados com ele nas épocas próximas da preparação dos mesmos. Foram feitas provas de reatividade específica com todos eles e uma prova para reatividade não específica, para a comparação do antígeno mais velho (A) com o mais novo (B). O processo usado para a comparação das reatividades específicas foi o mesmo já usado na observação anterior. O número máximo de observações realizadas em um só dia foi de 8. Os dados computados e as oportunas decisões são apresentados no Quadro III.

É interessante assinalar a ausência de reações inadmissíveis em 63 pares de reações. Na comparação anterior tínhamos verificado

apenas uma observação inadmissível em 40 pares de reações. ALMEIDA & SIQUEIRA⁴ trabalhando com antígenos preparados pela mesma técnica encontraram somente 12 reações inadmissíveis em 311 pares de reações. Estes resultados falam a favor de um comportamento uniforme dos soros de indivíduos chagásicos sendo relativamente raros os soros que apresentam reações atípicas como as referidas por ALMEIDA & FREITAS³.

O número de observações defeituosas foi muito menor nesta série de observações que naquela em que comparamos dois antígenos preparados do mesmo pó e no mesmo dia. Apenas uma observação defeituosa apareceu quando da comparação do antígeno A com o D; nas outras, as decisões foram as mais rápidas possíveis, podendo ser tomadas com o menor número de observações indicado na Tabela III. Pelos resultados apresentados no Quadro III podemos verificar que todos os antígenos puderam ser considerados comparáveis na prova de reatividade específica.

3. *Comparação da reatividade não específica do antígeno (A), mais velho, com o antígeno E, mais novo* — Para a execução

SIQUEIRA, A. F. de — Comparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para reações quantitativas de fixação do complemento. II. Análise seqüencial de probabilidade direta aplicada ao sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:268-276, 1964.

QUADRO II

Comparação das reatividades específicas dos antígenos A e B

| Data | Admissíveis | Inadmissíveis | Defeituosas | Não defeituosas | Total |
|----------|-------------|---------------|-------------|-----------------|-------|
| 14/11/60 | 10 | — | 3 | 7 | 10 |
| 16/11/60 | 4 | 1 | — | 4 | 14 |
| 17/11/60 | 5 | — | — | 5 | 19 |
| 28/11/60 | 8 | — | 1 | 7 | 27 |
| 29/11/60 | 4 | — | — | 4 | 31 |
| 17/ 2/61 | 8 | — | — | 8 | 39 |

Decisão: Aprovado

QUADRO III

Comparação das reatividades específicas dos antígenos B, C, D e E com o antígeno A

| Data | Admissíveis | Inadmissíveis | Defeituosas | Não defeituosas | Total |
|-----------------|-------------|---------------|-------------|-----------------|-------|
| Antígenos A e B | | | | | |
| 5/4/61 | 8 | — | — | 8 | 8 |
| 12/4/61 | 6 | — | — | 6 | 14 |
| Aprovado | | | | | |
| Antígenos A e C | | | | | |
| 17/4/61 | 8 | — | — | 8 | 8 |
| 26/4/61 | 6 | — | — | 6 | 14 |
| Aprovado | | | | | |
| Antígenos A e D | | | | | |
| 3/5/61 | 7 | — | 1 | 6 | 7 |
| 5/5/61 | 7 | — | — | 7 | 14 |
| 8/5/61 | 7 | — | — | 7 | 21 |
| Aprovado | | | | | |
| Antígenos A e E | | | | | |
| 6/6/61 | 7 | — | — | 7 | 7 |
| 7/6/61 | 7 | — | — | 7 | 14 |
| Aprovado | | | | | |

QUADRO IV

Comparação da reatividade não específica do antígeno A, preparado em 13/3/61, com o antígeno E, preparado em 20/5/61

| Data | Admissíveis | Inadmissíveis | Defeituosas | Não defeituosas | Total |
|---------|-------------|---------------|-------------|-----------------|-------|
| 6/6/61 | 43 | — | — | 43 | 43 |
| 7/6/61 | 38 | — | — | 38 | 81 |
| 12/6/61 | 35 | — | — | 35 | 116 |
| 14/9/61 | 39 | — | — | 39 | 155 |

Aprovado

desta prova os soros foram examinados em reações paralelas com os dois antígenos. As reações foram realizadas com 0,05 ml de soro não diluído, 0,10 ml da solução a 1:30 dos antígenos (dose de reatividade ótima), em presença de 3,6 unidades de complemento, como já foi descrito no começo deste capítulo. As observações, depois de classificadas de acordo com a descrição referida, iam sendo computadas até que uma decisão pudesse ser tomada dentro do critério adotado para este tipo de comparação, segundo a Tabela I, construída para esta finalidade.

Os resultados são apresentados no Quadro IV.

Os resultados mostram que os dois antígenos foram comparáveis na prova para reatividade não específica. A decisão pôde ser tomada com o menor número possível de observações como indica a Tabela I.

Às vezes temos notado que alguns antígenos em uso corrente no nosso laboratório vão se tornando anticomplementares à medida que envelhecem. No caso presente, um antígeno com 2 meses e 7 dias pôde ser comparado com outro recém-preparado.

SUMMARY

Comparison of Trypanosoma cruzi antigens for quantitative complement fixation tests. II. Direct probability sequential analysis applied to the Chagas disease system.

The same criteria for cardiolipin and phospholipids extracted from tuberculosis bacilla were used for comparison of *T. cruzi* antigens. From the present study the following results arise:

1) Among antigens simultaneously prepared from one and the same trypanosome powder, the specific reactivity was fully comparable within the criteria hereby used.

2) Among antigens prepared from one and the same powder at different intervals, ranging from 16 through 93 days, the oldest one showed a specific reactivity similar to the newest's.

3) The oldest antigen, as compared with the newest for the non-specific reactivity test, reacted in a similar way.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALMEIDA, J. O. — Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement-fixation tests. *J. Immunol.* 76:259-263, 1956.
- ALMEIDA, J. O. — Preparo, padronização e comparação de antígenos em reações quantitativas de fixação do complemento com soros de doentes de lepra. *Rev. brasil. leprol.* 26:181-271, 1958.
- ALMEIDA, J. O. & FREITAS, J. L. P. — Reações atípicas em fixação de complemento nos sistemas sífilis e doença de Chagas, pelo método quantitativo. Interpretação e determinação de títulos. *Rev. brasil. biol.* 13:1-12, 1953.
- ALMEIDA, J. O. & SIQUEIRA, A. F. — Estudo da discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de fixação do complemento no sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2:204-212, 1960.
- ALMEIDA, J. O. & THOMPSON, W. R. — Streamlined tests of cardiolipin antigen components for specificity and sensitivity in

SIQUEIRA, A. F. de — Comparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para reações quantitativas de fixação do complemento. II. Análise seqüencial de probabilidade direta aplicada ao sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:268-276, 1964.

- complement fixation reactions. *Ann. Rep. Div. Lab. & Res.*, New York State Dept. Health, Albany, New York, pp. 31-32, 1954.
6. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *Hospital* (Rio de Janeiro) 35:787-800, 1949.
7. MALTANER, F. & THOMPSON, W. R. — Direct probability sequential analysis. Application to testing serologic reagents. *Ann. Rep. Div. Lab. & Res.*, New York State Dept. Health, Albany, New York, pp. 32-33, 1948.
8. PANGBORN, M. C.; ALMEIDA, J. O.; MALTANER, F.; SILVERSTEIN, A. M. & THOMPSON, W. R. — Cardiolipin antigens. World Health Organization. *Palais des Nations*, Genève, 1955, p. 52.
9. SIQUEIRA, A. F. — Comparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para reações quantitativas de fixação do complemento. I. Linearidade entre complexo imune e complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:101-110, 1964.
10. THOMPSON, W. R. — Direct probability sequential analysis. Preliminary report. *Bull. Am. Math. Soc. (Soc. Proc.)* 54:288-289, 1948.

Recebido para publicação em 27/6/1964.