

ESTUDO DA DISCREPÂNCIA RELATIVA ENTRE PARES DE REAÇÕES SIMULTÂNEAS DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO NO SISTEMA MOLÉSTIA DE CHAGAS

José Oliveira de ALMEIDA (1) e Astolpho Ferraz SIQUEIRA (2)

RESUMO

A reprodutibilidade de resultados obtidos por fixação de complemento em moléstia de Chagas foi medida, em reações feitas concomitantemente, com os mesmos elementos e com o mesmo antígeno. Os pares de resultados ou títulos dos soros chagásicos foram comparados por métodos essencialmente semelhantes aos utilizados para antígenos como cardiolipina ou fosfolípidos extraídos de bacilo da tuberculose, tendo para isso sido construída uma tabela de graus de reatividade (G) baseada nos fatores de conversão previamente determinados para o sistema moléstia de Chagas com o antígeno gelificado de *Trypanosoma cruzi*. De um total de 311 pares de reações, 12 foram inadmissíveis e as restantes 299 não mostraram nenhuma observação defeituosa. As diferenças de reatividade, traduzidas por ΔG foram projetadas em abscissas contra a frequência percentual acumulada de observações. Os dados foram tratados por métodos construídos para distribuição-livre ou não paramétrica do atributo e intervalos de confiança de 95% e 99% foram calculados. Os resultados não apresentaram discrepâncias maiores que as observadas em sistemas que empregam antígenos de composição definida (cardiolipina) e soros de títulos altos. Os dados foram apresentados em quadros e arrançados convenientemente para serem examinados por métodos estatísticos de inferência de distribuição-livre ou não-paramétrica.

INTRODUÇÃO

O propósito deste trabalho é indicar a distribuição de frequência de valores de discrepâncias numéricas relativas, observadas em reações em duplicata com antígenos preparados de *Trypanosoma cruzi* e soros chagásicos. Há grande interesse em verificar se defeitos técnicos ou a falta de homogeneidade do antígeno empregado poderiam trazer imprecisão ou discrepâncias a reações feitas em duplicata, a ponto de proibir a adoção dos métodos construídos para antígenos mais puros, tais como cardiolipina⁶

ou fosfolípidos extraídos do bacilo da tuberculose¹. Usar os mesmos elementos em reações paralelas e simultâneas propicia-nos condições ideais para fazer uma prova de confiança na técnica em uso. A presente investigação foi realizada durante um longo tempo empregando-se várias preparações de antígeno, de complemento, de hemácias, e durante a realização do trabalho diversos técnicos cooperaram na feitura e distribuição dos reagentes.

Fac. Med. de Ribeirão Preto — Dep. de Microbiologia e Imunologia (Prof. J. O. de Almeida) e Dep. de Parasitologia (Prof. M. P. Barreto). Trabalho realizado com auxílio financeiro do Convênio entre o Ministério da Saúde (D.N.E.Ru.) e a Secretaria da Saúde Pública e da Assistência Social do Estado de São Paulo.

(1) Prof. de Microbiologia e Imunologia.

(2) Assistente de Parasitologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Os elementos da reação, antígeno, sôro, complemento, hemácias e hemolisina foram preparados de acôrdo com a técnica descrita anteriormente por FREITAS & ALMEIDA ⁴.

Soros que reagiram na prova com 3 unidades de complemento e que se tinham mostrado destituídos de propriedades anticomplementares, foram retomados para o teste de comparação de reações, de acôrdo com a técnica a seguir descrita:

a) Diluir o sôro reagente em solução fisiológica, nas seguintes proporções: 1:1 — 1:1,3 — 1:1,8 — 1:2,4 — 1:3,2 — 1:4,2 — 1:5,6 e 1:7,5.

b) Distribuir sôro diluído, antígeno e complemento, empregando 0,05 ml para o primeiro, uma dose de reatividade paralela ² para o antígeno e 3,6 unidades de complemento. Os volumes são completados para

0,3 ml. Fazer duas séries iguais, empregando os mesmos elementos.

c) Incubar a 37°C por 90 minutos. Juntar então 0,2 ml de hemácias ôtimamente sensibilizadas, incubar de novo por 15 minutos, juntar 0,5 ml de solução fisiológica gelada a todos os tubos. Centrifugar e ler os sobrenadantes, em colorímetro foto-elétrico, com filtro $\lambda = 545$.

RESULTADOS

As reações são feitas simultaneamente e em paralelo, usando-se para as reações em duplicata o mesmo antígeno, na mesma diluição.

Os resultados das reações são dados em termos de G ou grau de reação, de acôrdo com o Quadro I construído para o sistema moléstia de Chagas, quando se empregam 3,6 unidades de complemento.

QUADRO I

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 for 10 vezes aquêle encontrado no quadro.

G para dado sôro é o valor máximo achado, desde que não difira de outro valor de G mais que 0,110. Se os valores mais próximos de G apresentam diferença igual ou maior que 0,110 ou quando a reação não nos dá nenhum valor para G, ela então é classificada de *inadmissível*.

Dessa forma, cada sôro nos fornecerá dois valores de G, um para cada série de tubos de par de reações simultâneas e paralelas. Êsses dois G formam uma *observação admissível*. Uma observação admissível é considerada defeituosa se apresentar uma diferença igual ou maior que 0,070 entre os valores de G.

O uso de G foi proposto por ALMEIDA & THOMPSON³ como equivalente ao uso de T, definido como:

$$T = D(K'_{S,A} - 1)$$

onde

T = título do sôro

D = fator de diluição

$K'_{S,A}$ = unidades de complemento para 50% quando sôro reage com antígeno.

A relação entre T e G no sistema moléstia de Chagas é:

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

A discrepância entre os títulos, da primeira e segunda reação, foi calculada como a diferença entre G (ou ΔG), substituindo R, definido anteriormente como:

$$R = 2(T_1 - T_2)/(T_1 + T_2)$$

A relação entre G e R é aproximadamente:

$$R \cong 2,303 (\Delta G)$$

A substituição de R por G tem a vantagem de simplificar a avaliação das discrepâncias entre as reatividades encontradas nas duas séries de reações simultâneas e em duplicata.

De um total de 311 pares de reações, 12 foram inadmissíveis; as 299 observações restantes foram examinadas, segundo os critérios adotados anteriormente por THOMPSON & SILVERSTEIN¹² e por THOMPSON & ALMEIDA¹¹. No presente trabalho não nos esforçamos para dar maior cuidado à distribuição dos reagentes, preferindo antes nos utilizarmos de diferentes técnicos, reproduzindo exatamente as condições normais de trabalho, em um laboratório de rotina, onde se faz eventualmente o rodízio de auxiliares em sorologia. Ôbviamente podemos considerar que falhas poderão ocorrer por imprecisão de técnica e a experimentação neste trabalho pôde demonstrar até que ponto elas podem afetar o resultado de uma reação, partindo do princípio de que as discrepâncias entre pares de reações simultâneas somente poderiam provir de erros técnicos.

Para evitar qualquer efeito de correlação nesta amostra de 311 soros, nós evitamos fazer mais de 10 reações por dia. Obtivemos assim um conjunto de 299 valores de ΔG que foram tratados como se êles tivessem sido retirados por acaso de um número infinito de observações possíveis. O gráfico 1 tem por ordenadas as freqüências acumuladas e em abscissas valores de ΔG . A curva de freqüência acumulada foi construída por métodos estatísticos desenvolvidos por THOMPSON^{8, 9, 10} quando apresentou os processos para determinar os intervalos de confiança para a mediana e outros valores, na expectativa de que a forma de distribuição do atributo fôsse desconhecida. Os valores de ΔG foram numerados de 1 a 299 em ordem de magnitude não decrescente; a freqüência relativa de ΔG foi calculada como $pk = k/(n + 1)$, onde pk é a freqüência

relativa, k é o número de observação na série arrumada de n observações.

O gráfico 1 é formado de pontos que são juntados por uma linha unicamente para dar uma idéia da magnitude dos pontos intermediários. Os intervalos de confiança ali indicados por linhas horizontais para várias percentagens de probabilidade acumulada, foram calculados por métodos estatísticos que possuem o mesmo fundamento que o sistema de análise seqüencial de probabilidade direta (MALTANER & THOMPSON⁵, PANGBORN & col.⁶). Nesse método é inteiramente desnecessário que a variável ΔG tenha a distribuição de frequência normal convencional. Em contraste com os métodos estatísticos baseados na distribuição normal, a forma de inferência chamada de distribuição livre ou não-paramétrica não exige o cálculo da variância.

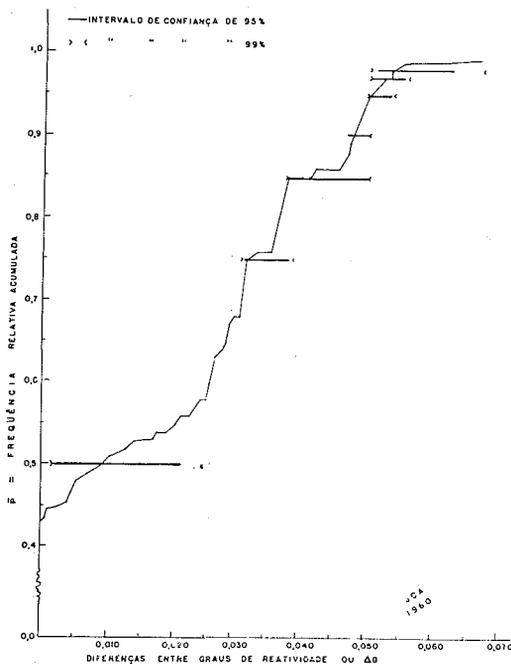


Fig. 1 — Gráfico de probabilidade acumulada de ΔG .

No presente trabalho nos utilizamos de tabelas construídas por THOMPSON¹² para a

análise de dados de reprodutibilidade de reações de fixação de complemento com cardiolipina (THOMPSON & SILVERSTEIN¹²). THOMPSON^{8, 9, 10} desenvolveu métodos para o cálculo do intervalo de confiança para atributos com forma de distribuição desconhecida. Os mesmos princípios foram apresentados quase concomitantemente por SAVUR⁷ em 1937.

O cálculo dos limites do intervalo de confiança central se faz diretamente pelo quadro II para os percentis de 2, 5, 10, 15, 25 e 50, que dá os valores numéricos da ordem pela qual as observações foram arranjadas.

Para os percentis maiores que 50, o cálculo é feito pela relação $q \equiv 1 - p$:

$$P_{100p,n,k} \equiv 1 - P_{100q,n,n+1-k}$$

onde

$$X_{n+1-k}$$

é o termo k em ordem de magnitude decrescente.

Assim o intervalo de confiança a 95% para o percentil de 90 ficará entre dois valores:

$$X_{300-k} \text{ para } P_{10,299,k} \geq 0,975$$

$$X_{300-k'} \text{ para } P_{10,299,k'} \leq 0,025$$

O quadro II dá os valores: de 41 para k e 20 para k' .

Então

$$X_{300-41} \equiv X_{259}$$

$$X_{300-20} \equiv X_{280}$$

Os limites de confiança corresponderão aos valores de ΔG das observações n.ºs 259 e 280. O quadro III nos dá então 0,047 e 0,050.

Um outro exemplo pode ser dado no cálculo do intervalo central de confiança a 99% para o percentil 75.

QUADRO II

Valores de k para os percentis de dois, cinco, dez, quinze, vinte e cinco e cinquenta, para n = 299, segundo a relação desenvolvida por Thompson (1936):

$$P_{100p,n,k} \equiv 1 - P_{100q,n,n+1-k}$$

k	$P_{2,299,k}$	k	$P_{3,299,k}$	k	$P_{10,299,k}$	k	$P_{10,299,k}$	k	$P_{15,299,k}$	k	$P_{25,299,k}$	k	$P_{25,299,k}$
1	0,00238011	28	0,99999985	7	0,00000004	63	0,99999999	64	0,99808517	66	0,10713849	119	0,99999999
2	0,01690363	29	0,99999996	8	0,00000091	64	1,00000000	65	0,99881300	67	0,13467342	120	1,00000000
3	0,06106696	30	0,99999999	9	0,00000091			66	0,99927736	68	0,16659203		
4	0,15029494	31	1,00000000	10	0,00000342	$k P_{15,299,k}$		67	0,99956790	69	0,20289162	$k P_{50,299,k}$	
5	0,28504740			11	0,00001149	14	0,00000000	68	0,99974620	70	0,24339986	150	0,50000000
6	0,44730035	$k P_{5,299,k}$		12	0,00003505	15	0,00000001	69	0,99985355	71	0,28776602	151	0,54602751
7	0,60955330	1	0,00000022	13	0,00009789	16	0,00000004	70	0,99991697	72	0,33546486	152	0,59144539
8	0,74815423	2	0,00000366	14	0,00025202	17	0,00000013	71	0,99995375	73	0,38581363	153	0,63566806
9	0,85139777	3	0,00003062	15	0,00060188	18	0,00000040	72	0,99997468	74	0,43800163	154	0,67815651
10	0,91952446	4	0,00017109	16	0,00134047	19	0,00000113	73	0,99998638	75	0,49112995	155	0,71843777
11	0,95984434	5	0,00071819	17	0,00279713	20	0,00000304	74	0,99999279	76	0,54425827	156	0,75612024
12	0,98146297	6	0,00241708	18	0,00549148	21	0,00000777	75	0,99999625	77	0,59645451	157	0,79090405
13	0,99205169	7	0,00679844	19	0,01018163	22	0,00001886	76	0,99999808	78	0,64684310	158	0,82258612
14	0,99682244	8	0,01645061	20	0,01788885	23	0,00004359	77	0,99999904	79	0,69464765	159	0,85105989
15	0,99881140	9	0,03499293	21	0,02987786	24	0,00009614	78	0,99999952	80	0,73922489	160	0,87631020
16	0,99958264	10	0,06654740	22	0,04757592	25	0,00020280	79	0,99999977	81	0,78008736	161	0,89840423
17	0,99986201	11	0,11470950	23	0,07242472	26	0,00040983	80	0,99999989	82	0,81691403	162	0,91747920
18	0,99995693	12	0,18130684	24	0,10567648	27	0,00079486	81	0,99999995	83	0,84954905	163	0,93372824
19	0,99998727	13	0,26542980	25	0,14816485	28	0,00148186	82	0,99999998	84	0,87999001	164	0,94738542
20	0,99999643	14	0,36317592	26	0,20009508	29	0,00265959	83	0,99999999	85	0,90236797	165	0,95871088
21	0,99999905	15	0,46827136	27	0,26090227	30	0,00460176	84	1,00000000	86	0,92292194	166	0,96797717
22	0,99999976	16	0,57336681	28	0,32921652	31	0,00768638	$k P_{25,299,k}$		87	0,93997059	167	0,97545718
23	0,99999994	17	0,67154808	29	0,40295253	32	0,01240989	88	0,95388385	89	0,96505661	168	0,98141432
24	0,99999999	18	0,7154808	30	0,47951369	33	0,01939097	89	0,96505661	169	0,98609493	170	0,98972309

25	1,00000000	18	0,75757068	32	0,62989186	34	0,02935860	36	0,00000001	90	0,97388603	171	0,99249757
		19	0,82850159	33	0,69858270	35	0,04312014	37	0,00000002	91	0,98075336	172	0,99459060
	k P _{3,299,k}	20	0,88371375	34	0,76033507	36	0,06150740	38	0,00000005	92	0,98601076	173	0,99614820
1	0,00011085	21	0,92439639	35	0,81401524	37	0,08530269	39	0,00000011	93	0,98997286	174	0,99729164
2	0,00113596	22	0,95284365	36	0,85917474	38	0,11515082	40	0,00000025	94	0,99291248	175	0,99811965
3	0,00585991	23	0,97176312	37	0,89597138	39	0,15146760	41	0,00000056	95	0,99505987	176	0,99871108
4	0,02032395	24	0,98375555	38	0,92503298	40	0,19435755	42	0,00000121	96	0,99660448	177	0,99912778
5	0,05342723	25	0,99101412	39	0,94729655	41	0,24355484	43	0,00000243	97	0,99769857	178	0,99941734
6	0,11383218	26	0,99521646	40	0,96385152	42	0,29839888	44	0,00000507	98	0,99846181	179	0,99961581
7	0,20537370	27	0,99754731	41	0,97580788	43	0,35785167	45	0,00001018	99	0,99898621	180	0,99974997
8	0,32387886	28	0,99878770	42	0,98420001	44	0,42055768	46	0,00001985	100	0,99934111	181	0,99983941
9	0,45765529	29	0,99942189	43	0,98992798	45	0,48494033	47	0,00003763	101	0,99957771	182	0,99989821
10	0,59143172	30	0,99973380	44	0,99373182	46	0,54932297	48	0,00006955	102	0,99973310	183	0,99993634
11	0,71141677	31	0,99988155	45	0,99619087	47	0,61205900	49	0,00012539	103	0,99983364	184	0,99996071
12	0,80891165	32	0,99994903	46	0,99773916	48	0,67165431	50	0,00022075	104	0,99989775	185	0,99997608
13	0,88127899	33	0,99997877	47	0,99868906	49	0,72686760	51	0,00037969	105	0,99993802	186	0,99998563
14	0,93069079	34	0,99999144	48	0,99925723	50	0,77677830	52	0,00063834	106	0,99996294	187	0,99999149
15	0,96190973	35	0,99999665	49	0,99958865	51	0,82081715	53	0,00104954	107	0,99997815	188	0,99999502
16	0,98025488	36	0,99999873	50	0,99977729	52	0,85876066	54	0,00168832	108	0,99998730	189	0,99999713
17	0,99032580	37	0,99999953	51	0,99988208	53	0,89069502	55	0,00265832	109	0,99999271	190	0,99999837
18	0,99551089	38	0,99999983	52	0,99993893	54	0,91695846	56	0,00409862	110	0,99999588	191	0,99999909
19	0,99802325	39	0,99999994	53	0,99996906	55	0,93307220	57	0,00619048	111	0,99999770	192	0,99999949
20	0,99917242	40	0,99999998	54	0,99998466	56	0,95466964	58	0,00916313	112	0,99999874	193	0,99999972
21	0,99967000	41	0,99999999	55	0,99999253	57	0,96743153	59	0,01329750	113	0,99999931	194	0,00090085
22	0,99987445	42	1,00000000	56	0,99999646	58	0,97703258	60	0,01892678	114	0,99999963	195	0,99999992
23	0,99995436			57	0,99999835	59	0,98410192	61	0,02643249	115	0,99999981	196	0,99999996
24	0,99998412		k P _{10,299,k}	58	0,99999925	60	0,98919776	62	0,03623504	116	0,99999990	197	0,99999998
25	0,99999470			59	0,99999967	61	0,99279483	63	0,04877808	117	0,99999995	198	0,99999999
26	0,99999831	5	0,00000000	60	0,99999985	62	0,99528190	64	0,06450665	118	0,99999998	199	0,99999999
27	0,99999948	6	0,00000001	61	0,99999994	63	0,99696669	65	0,08383969			200	1,00000000
				62	0,99999997								

QUADRO III

Arranjo das 299 observações por ordem não decrescente de ΔG .

k	ΔG	k/(n+1)	k	ΔG	k/(n+1)
1 — 130	0,000	43,33	196 — 202	0,029	67,33
131 — 134	0,001	44,67	203 — 204	0,030	68,00
135 — 136	0,003	45,33	205	0,031	68,33
137	0,004	45,67	206 — 224	0,032	74,67
138 — 143	0,005	47,67	225 — 227	0,034	75,67
144 — 148	0,007	49,33	228	0,037	76,00
149	0,008	49,67	229 — 254	0,038	84,67
150 — 153	0,010	51,00	255	0,040	85,00
154	0,013	51,33	256	0,041	85,33
155 — 157	0,014	52,33	257	0,042	85,67
158	0,015	52,67	258	0,044	86,00
159	0,016	53,00	259	0,047	86,33
160 — 161	0,017	53,67	260 — 265	0,048	88,33
162 — 163	0,018	54,33	266	0,049	88,67
164 — 165	0,020	55,00	267 — 286	0,050	95,33
166 — 167	0,021	55,67	287 — 288	0,051	96,00
168 — 169	0,022	56,33	289 — 290	0,052	96,67
170 — 173	0,023	57,67	291 — 293	0,053	97,67
174 — 175	0,024	58,33	294	0,054	98,00
176 — 179	0,025	59,67	295 — 296	0,055	98,67
180 — 190	0,026	63,33	297	0,056	99,00
191	0,027	63,67	298	0,062	99,33
194 — 195	0,028	65,00	299	0,067	99,67

De acôrdo com o quadro II, calculamos k para $100 - 75 = 25$.

Então

$$P_{25,299,k'} \leq 0,005 < P_{25,299,k'+1}$$

Então

$$k' = 56 \quad e$$

$$n + 1 - k \equiv 300 - 56 = 244$$

e do mesmo modo

$$P_{25,299,k} \geq 0,995 > P_{25,299,k-1}$$

Então

$$k = 95 \quad e$$

$$n + 1 - k = 300 - 95 = 205$$

O intervalo é dado pelos valores de ΔG correspondentes às observações 205 e 244, e que são respectivamente 0,031 e 0,038.

Dessa forma foram calculados os intervalos de confiança em termos de ΔG para os percentis 50, 75, 85, 90, 95, 97 e 98 (Fig. 1, Quadro IV).

QUADRO IV

Intervalos centrais para 95% e 99% de confiança de probabilidade

$$n = 299$$

Percentil k/(n+1)	Limites do intervalo de confiança em ΔG para:	
	95 %	99 %
50	0,001 — 0,021	< 0,000 — 0,023
75	0,032 — 0,038	0,031 — 0,038
85	0,038 — 0,050	0,038 — 0,050
90	0,047 — 0,050	0,040 — 0,050
95	0,050 — 0,053	0,050 — 0,053
97	0,050 — 0,055	0,050 — 0,056
98	0,051 — 0,062	0,050 — 0,067

Os resultados obtidos nesse ensaio, no sistema moléstia de Chagas, indicam que a reatividade do complexo antígeno-anticorpo, em reações em duplicata e simultâneas, pode ser avaliada com uma discrepância menor que aquela que define uma reação defeituosa. As discrepâncias avaliadas em termos de ΔG indicam a variabilidade da medida, uma vez que os mesmos elementos foram utilizados. A noção de que erros acumulados em um e outro sentido possam dar aos valores de reatividade sérica, discrepâncias que se distribuem de um modo não paramétrico, é de grande valia; uma vez que podemos calcular a própria variação do método, em uma observação feita, como parte integrante de um universo de todas as observações possíveis.

CONCLUSÕES

Os erros introduzidos na reação de Guerreiro-Machado, por imprecisão na distribuição dos reagentes, leitura da reação e cálculo da reatividade específica, não foram maiores que os observados em outros sistemas como sífilis e lepra.

A presente investigação demonstra que os mesmos critérios adotados na comparação de antígenos de cardiolipina e fosfolípidos de bacilo da tuberculose podem ser válidos para antígenos aparentemente menos uniformes, como é o antígeno preparado de *Trypanosoma cruzi* pelo método de FREITAS & ALMEIDA⁴.

Assim, as discrepâncias de reações simultâneas e paralelas, feitas com os mesmos elementos, serão toleráveis desde que estejam compreendidas entre os limites estabelecidos.

Na comparação de um antígeno com outro tomado como padrão, podemos empregar o método de análise seqüencial de probabilidade direta, que se baseia nos resultados das discrepâncias obtidas. Dêste modo, as observações defeituosas poderão ser imputadas ao reagente em prova e não a imprecisões provenientes de erros técnicos na feitura da reação.

Tais considerações mostram que não se deve procurar alterar os critérios de aceitabilidade de antígenos, antes de se demons-

trar que o método por si só não introduz variação maior do que aquela esperada.

SUMMARY

Study on the relative discrepancy between pairs of simultaneous complement-fixation reactions for Chagas' disease.

Sera from Chagas' disease patients were tested with *Trypanosoma cruzi* antigens by complement fixation procedures used for testing cardiolipin, but using 3.6 units of complement. The same antigen preparation was used in pairs of simultaneous replicate complement-fixation tests. The experience with 311 observation-pairs of reactions yielded 12 inadmissible observations and the remaining 299 observations showed 153 with G-differences less than 0.010 numerically, 204 with such differences less than 0.030 and 299 with differences less than 0.070.

Table for calculation of G was constructed for the Chagas' system by methods described elsewhere. This would indicate an expectation that about 3.82% of observations would be inadmissible and the remaining observations with G-differences less than 0.070 which defines a defective observation.

Our present results indicate that we should expect a far lower frequency of defectives than that set as a tolerable incidence. Indeed, by these data, we can admit that the conditions for testing Chagas' antigen are not different from those prevailing in other systems, like syphilis or leprosy. This report provides a basis for the evaluation of the technical variability of the quantitative complement fixation method for determination of the specific reactivity of the immune complex.

Several tables are appended, giving the essential data arranged as required for the purposes of the statistical analysis, and also some of the confidence intervals as estimated by distribution-free inference.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, J. O. — Preparo, padronização e comparação de antígenos em reações quantitativas de fixação do complemento em só-

- ro de doentes de lepra. Rev. brasil. Leprol. 26:181-271, 1958.
2. ALMEIDA, J. O.; FREITAS, J. L. P. & SIQUEIRA, A. F. — Capacidade reativa específica do antígeno com anticorpo em reações de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 1:266-272, 1959.
 3. ALMEIDA, J. O. & THOMPSON, W. R. — Streamlined tests of cardiopilin antigen components for specificity and sensitivity in complement-fixation reactions. Ann. Rep. Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1954. p. 31-32.
 4. 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.
 5. MALTANER, E. & THOMPSON, W. R. — Application of direct probability sequential analysis to acceptance or rejection of antigens for complement fixation tests for syphilis. Research Rep. May 11, 1945, Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1948. [Mimeogr.; obtido por pedido aos autores.]
 6. PANGBORN, M. C.; ALMEIDA, J. O.; MALTANER, F.; SILVERSTEIN, A. M. & THOMPSON, W. R. — Cardiopilin antigens; preparation and chemical and serological control. 2nd ed. W.H.O. Monogr. Ser. nº 6, 1955.
 7. SAVUR, S. R. — The use of the median in tests of significance. Proc. Indian Acad. Sc. 5:564-576, 1937.
 8. THOMPSON, W. R. — Assumption economy in scientific statistical analysis. Trabalho apresentado à reunião de 17-5-1949 da American Society of Bacteriologists, em Cincinnati. [Cópias obtidas do autor.]
 9. THOMPSON, W. R. — Biological applications of normal range and associated significance tests in ignorance of original distribution forms. Ann. math. Statist. 9:281-287, 1938.
 10. THOMPSON, W. R. — On confidence ranges for the median and other expectation distributions for populations of unknown distribution form. Ann. math. Statist. 7:122-128, 1936.
 11. THOMPSON, W. R. & ALMEIDA, J. O. — Sequential tests of antigen components; influence of technical variability and or producer aim. Ann. Rep. Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1955. p. 35-36.
 12. THOMPSON, W. R. & SILVERSTEIN, A. M. — Study of relative discrepancy between pairs of simultaneous replicate complement-fixation tests with cardiopilin antigens. Research Rep. June 21, 1954, Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1954. [Mimeogr.; obtido por pedido aos autores.]

Recebido para publicação em 6 agosto 1960.