

## NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS SERICAS (IgG, IgA e IgM) EN ADULTOS JOVENES SANOS, POR EL METODO DE INMUNODIFUSION RADIAL

Bruno Lomonte\*, César Bonilla\*\* y Elizabeth Castro\*\*\*

### RESUMEN

*Se determinó la concentración de IgG, IgA, e IgM en el suero de 49 estudiantes universitarios normales, de 18 a 25 años. Para esto se empleó el método de inmunodifusión radial, en placas comerciales.*

*Los resultados fueron comparados con una serie de valores descritos en la literatura, correspondientes a niveles normales en distintos países. Se encontró que los valores de IgG son ligeramente mayores, mientras que los de IgA e IgM son similares a los descritos en otras poblaciones.*

*Se comenta brevemente las alternativas metodológicas existentes para la cuantificación de Igs séricas, así como algunos aspectos de la estandarización internacional que ha tenido dicha determinación [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1985; 6(4):183 – 190].*

### INTRODUCCION

Las inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos constituyen el componente humoral de la respuesta inmune específica en todos los vertebrados (21). En el humano se reconocen cinco clases o isotipos de Igs denominados IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, diferenciables gracias a las propiedades estructurales y antigénicas particulares de sus cadenas pesadas (12)

Debido a su gran heterogeneidad estructural y funcional (probablemente la más notable de todas las proteínas séricas) las Igs solamente pueden ser cuantificadas mediante técnicas inmunoquímicas. En todas estas técnicas, las Igs actúan como antígeno frente a sueros producidos en animales, específicos contra epitopos (determinantes antigénicos) característicos de cada clase de cadena pesada.

Entre la variedad de métodos inmunoquímicos que se ha implementado para la cuantificación de las principales clases de Igs séricas (IgG,

IgA, e IgM) se destacan tres: la inmunodifusión radial (24), la inmunoelectroforesis en coquete o electroinmunoensayo (36), y la inmunonefelometría (19). La cuantificación de IgE requiere de métodos de mayor sensibilidad debido a su baja concentración, en tanto que la de IgD no tiene aún utilidad clínica (10, 26).

Las técnicas mencionadas anteriormente poseen ventajas y desventajas. La inmunonefelometría se basa en la medición de la dispersión de la luz causada por la formación de complejos antígeno-anticuerpo, al agregar un suero anti-Ig (G, A o M, según el caso) a la muestra de suero a determinar. Posee la ventaja de proveer resultados en un lapso muy breve, de poder automatizarse para analizar gran número de muestras y, además, debido a que no se basa en la difusión, no causa error la presencia de polímeros de Igs de tamaños diversos. Sin embargo, su desventaja principal radica en la interferencia que puede causar la turbidez de la muestra, ya sea por la presencia de complejos inmunes "contaminantes", o por agregados moleculares de origen no inmunológico (1,13,26).

La inmunoelectroforesis en coquete se ha utilizado para cuantificar las Igs. Se hace migrar electroforéticamente al antígeno dentro de un gel de agarosa que contiene los anticuerpos correspondientes, de tal modo que se forma un precipitado alargado cuya altura guarda proporcionalidad con la concentración de antígeno en la muestra. Este método presenta una dificultad intrínseca cuando se emplea para la cuantificación de Igs, debido a que los puntos isoeléctricos promedio, tanto de los anticuerpos contenidos en el gel como de las Igs de la muestra, son muy similares, por ser ambos correspondientes a Igs de mamíferos. Sin embargo, esta dificultad se ha resuelto de varias formas. Entre ellas, se ha propuesto métodos de carbamilación de la muestra con cianato de potasio para modificar sus propiedades electroforéticas (27), o de formilación (25), para el mismo fin. También puede carbamilarse los anticuerpos del gel y dejar la muestra en su estado nativo (4). Otra alternativa ha sido descrita por Altschuh (1) empleando antisueros producidos en gallinas, cuyas Igs difieren en punto isoeléctrico promedio respecto a las Igs de mamíferos. En general la inmunoelec-

\* Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

\*\* Laboratorio Clínico, Sección de Inmunología, Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera"

\*\*\*Sección de Laboratorio Clínico, Oficina de Salud, Universidad de Costa Rica.

troforesis en cohete permite obtener los resultados en pocas horas (entre 3 y 6), aunque al igual que la técnica anteriormente descrita, requiere de un equipo relativamente costoso. Por último, la inmunodifusión radial (IDR) se basa en la difusión libre de la muestra en un gel que contiene los anticuerpos contra la Ig que se desea cuantificar, lo que da lugar a la formación de un anillo o círculo de precipitación alrededor del punto de aplicación, cuya área guarda proporcionalidad con la concentración de antígeno en la muestra.

Esta técnica se puede efectuar de dos formas. La primera, llamada de difusión completa o de Mancini, permite la difusión total de la muestra (lo que implica un tiempo de 48-72 horas para la lectura) y permite obtener una línea recta al graficar el diámetro del anillo precipitado elevado al cuadrado contra la concentración de Ig (24). La segunda, denominada de difusión parcial o de Fahey, utiliza un tiempo de difusión restringido (4-18 horas) y proporciona una relación lineal al graficar el diámetro del precipitado contra el logaritmo de la concentración de Ig (11). A pesar de que es un método más rápido que el descrito por Mancini, su precisión es menor al compararla con el método de difusión completa (22, 25, 26).

Debido a su simplicidad y a que no requiere de equipo complejo, la IDR se ha convertido en la técnica más utilizada para la cuantificación de Igs (14, 23), y varias compañías comerciales ofrecen placas listas para su uso (16, 17, 18). La principal desventaja de la IDR radica en el largo tiempo de lectura y en los problemas que ocasionan las Igs poliméricas, cuya velocidad de difusión en el gel depende del tamaño molecular (26).

La cuantificación de las Igs séricas tiene interés tanto desde el punto de vista clínico como de investigación (9). Sus principales indicaciones clínicas son:

- a) En el estudio por inmunodeficiencia, ya sea primaria o secundaria, sugerida por infecciones frecuentes y/o debidas a microorganismos de baja virulencia.
- b) En la vigilancia de pacientes que sufren formas graves de hipogammaglobulinemia y que reciben terapia de sustitución con preparaciones de Igs.
- c) Para distinguir las gammopatías monoclonales idiopáticas "benignas" de las paraproteinemias causadas por mielomas.
- d) Para ayudar al diagnóstico de infecciones congénitas, la determinación de IgM en sangre de cordón de recién nacidos, (26). En

otras condiciones patológicas esta determinación posee actualmente muy poco valor diagnóstico y su realización obedece más bien a fines de investigación (26).

Para una adecuada interpretación de los resultados se requiere de una amplia preparación en conceptos inmunológicos y metodológicos básicos (35) y además, de la existencia de valores de referencia que reflejan lo mejor posible la realidad propia de cada población particular (6, 29). El presente estudio constituye la primera parte de una investigación tendiente a precisar los niveles de Igs séricas en nuestra población, en este caso, en el adulto joven normal.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizó 49 muestras de suero de estudiantes universitarios normales de ambos sexos, con edades entre los 18 y los 25 años, quienes acudieron a la Sección de Laboratorio Clínico de la Oficina de Salud de la Universidad de Costa Rica, para la realización de diversos exámenes de la ficha médica estudiantil. Debido a lo limitado de la muestra estudiada no se analizó diferencias de sexo u otros factores. Se obtuvo muestras de suero por punción venosa, en ayuno, las cuales se congelaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (aproximadamente 2 meses).

La cuantificación de IgG, IgA e IgM se realizó empleando placas comerciales de IDR (Hyland Diagnostics, Illinois) por el método de difusión completa de Mancini (24). Las curvas de referencia se establecieron con tres sueros estándar incluidos en los juegos de reactivos comerciales, los cuales están calibrados respecto al Patrón Internacional de Referencia 67/86 de la Organización Mundial de la Salud (OMS.). Dichos estándares fueron probados por duplicado junto con las muestras, las cuales se analizaron todas simultáneamente y utilizando el mismo lote de reactivos. El procedimiento seguido fue básicamente el recomendado por el fabricante (16). Las muestras (3 ul) se aplicaron con micropipeta Hamilton mecánica (Hamilton Co., Nevada), y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 50 horas en cámara húmeda (Gelman Co., Ann Arbor, Michigan). La lectura se realizó iluminando indirectamente los geles con un visor de placas (Hyland Diagnostics, Illinois) y midiendo el diámetro del círculo de precipitación con una regla con divisiones de 0,5 mm (Behring, Frankfurt, Main). Se graficó el diámetro al cuadrado ( $\text{mm}^2$ ) contra la concentración (mg/dl) de cada estándar y se interpoló gráficamente los resultados de las muestras. Los resultados

en mg/dl fueron convertidos además a UI/ml multiplicando por los factores de conversión correspondientes a los estándares empleados (0,124 para IgG, 0,704 para IgA y 1,180 para IgM). En total se analizó 49 muestras para IgG, 47 para IgA y 47 para IgM.

## RESULTADOS

Las curvas de referencia obtenidas para las tres Igs, dieron puntos completamente colineales por lo que no hubo necesidad de trazar líneas "de mejor ajuste". La intersección de la recta con el eje de ordenadas ( $d^2$ ) se mantuvo dentro del límite esperado de  $11 \pm 3,5 \text{ mm}^2$  en los tres casos.

La distribución de los valores obtenidos se observa en la Fig. 1. En el caso de IgA e IgM dicha distribución fue bastante simétrica alrededor del promedio, a diferencia de lo observado para IgG (Fig. 1). En el Cuadro 1 se observa los datos de concentración de Igs del grupo estudiado y su variación. Una de las muestras presentó un valor de IgA extremadamente bajo, no medible con la técnica empleada, por lo que no se pudo incluir en la estadística; lo mismo sucedió en dos casos con IgM.

## DISCUSION

La expresión de los resultados en la cuantificación de Igs ha sido difícil de estandarizar a nivel internacional. Inicialmente, los resultados se expresaban en términos absolutos de concentración, fundamentalmente en mg/dl (33, 34). Sin embargo, a partir de 1970, los estudios colaborativos realizados en el Centro de Referencia para Inmunoglobulinas de la O.M.S. por Rowe y colaboradores (30, 31), demostraron que la expresión de los resultados en unidades absolutas es muy imprecisa, ya que aún laboratorios especializados difirieron mucho al analizar con sus propios estándares seis muestras codificadas. Por otro lado, los mismos estudios demostraron que se lograba una reproducibilidad muy superior entre dichos laboratorios al utilizar un estándar de referencia único, al cual se le había asignado unidades arbitrarias de potencia para representar los valores desconocidos de IgG, IgA e IgM (28, 30, 31). Esto motivó a la preparación de un estándar internacional de referencia para dichas Igs por parte de la OMS. y la adopción de unidades arbitrarias designadas como Unidades Internacionales. (UI), cuyo uso fue recomendado por dicha entidad (30). Sin embargo, el nuevo sistema de unidades arbitrarias causó controversia y no tuvo una aceptación

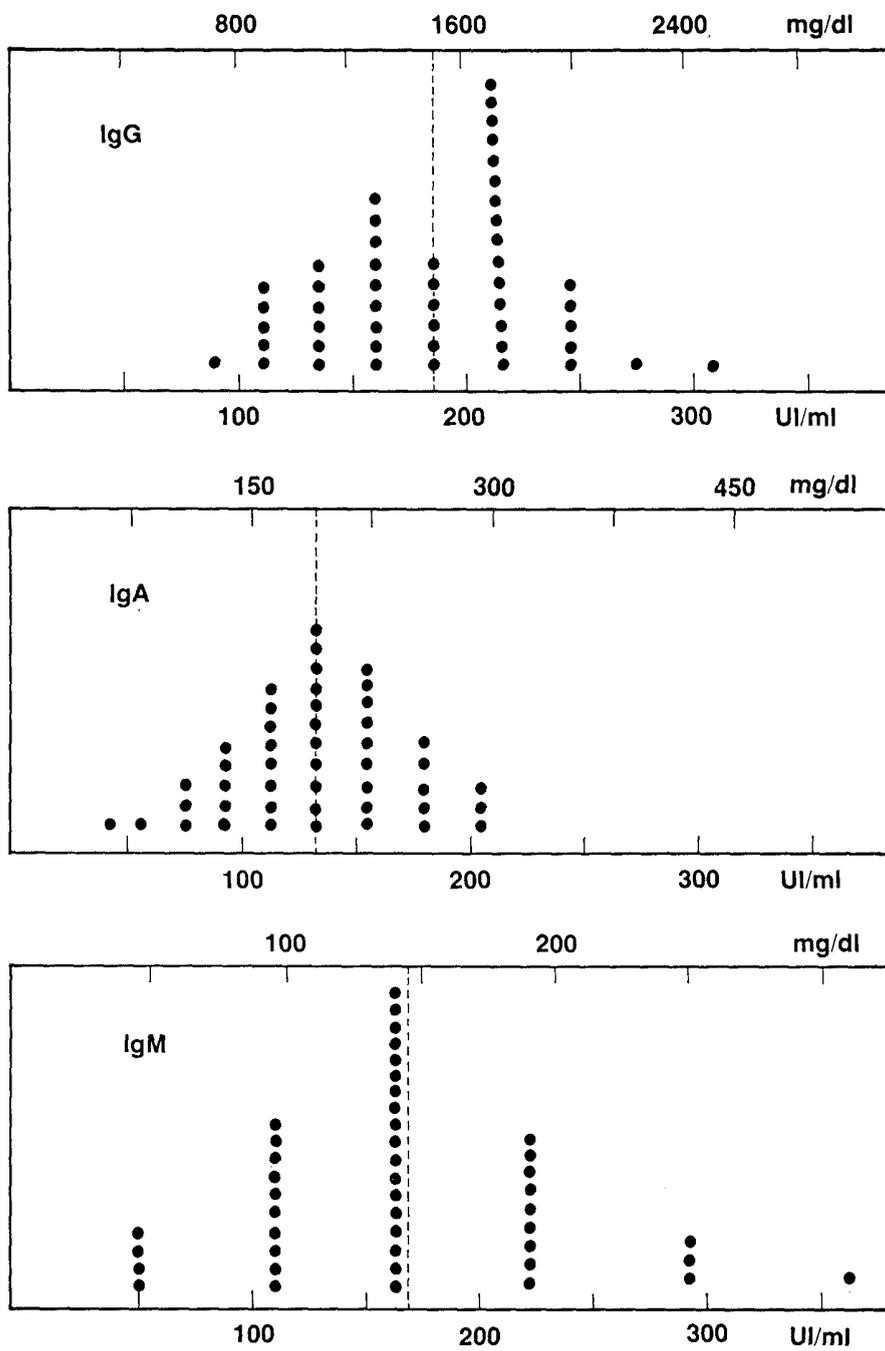
amplia en el campo clínico, fundamentalmente por razones de costumbre (28). Ante tal situación, los comités internacionales de expertos propusieron el uso de factores de conversión basados en las mejores determinaciones absolutas disponibles (2, 15).

Por las anteriores consideraciones, se ha expresado los resultados del presente estudio con los dos tipos de unidades. Debe destacarse que los factores de conversión a unidades de masa es tan sujetos a una gran incertidumbre, ya que los métodos de purificación de las Igs no permiten una recuperación cuantitativa y al mismo tiempo de alta homogeneidad de cada proteína (28, 31). Es por esto que cada fabricante de placas comerciales para la determinación de Igs, proporciona sus factores de conversión a unidades de masa, con ligeras variaciones entre ellos (28), a pesar de que los estándares comerciales son patrones secundarios calibrados respecto al estándar internacional de referencia, en UI/ml (28). Al comparar nuestros resultados con los descritos para otros países (Cuadro 1) llama la atención el nivel de IgG, cuyo promedio y límite superior del ámbito son mayores, exceptuando solamente los datos correspondientes a Nigeria (29) y a Surinam (37). El promedio de IgG es muy similar al hallado en población indígena de Guatemala (8, 20). Los niveles de IgA y de IgM, en general, son similares a la mayoría de los descritos. Al respecto, se ha indicado que los niveles normales de Igs séricas en la población de algunos países subdesarrollados tienden a ser mayores que los de países desarrollados (23, 29, 37). En el presente caso, sólo el nivel de IgG es consistentemente mayor. Esta diferencia ejemplifica la importancia de estudiar distintos parámetros inmunológicos de nuestra población para una interpretación adecuada de los resultados de laboratorio.

El hallazgo de una muestra con nivel muy bajo de IgA y dos muestras con baja IgM no es sorprendente, ya que algunos investigadores han encontrado el mismo fenómeno en población normal, sin que se pueda asociar a patología (26, 29).

En este estudio preliminar no se ha considerado ciertos factores de importancia como el sexo y el grupo étnico, que influyen significativamente en los niveles de Igs séricas (3, 5, 6, 7, 9, 22, 34, 37). Es necesario realizar más estudios en nuestra población para investigar la importancia de dichos factores, así como determinar los niveles "normales" o de referencia, de las Igs séricas en otros grupos de edad diferentes al analizado, principalmente en infantes y seniles.

FIGURA 1



Distribución de los valores de inmunoglobulinas séricas en la muestra analizada,  
en mg/dl y UI/ml. IgG: n=49; IgA: n = 46; IgM: n = 45.

**CUADRO 1**  
ALGUNOS VALORES DE INMUNOGLOBULINAS SERICAS EN POBLACION ADULTA NORMAL DESCRITOS EN LA LITERATURA

Referencia	País	MUESTRA n(sexo, edad)	IgG mg/dl	U/ml	IgA mg/dl	U/ml	IgM mg/dl	U/ml	EXPRESION
(11)	E.U.A.	20(M, -)	1.240 ± 220		280 ± 70		120 ± 35		$\bar{X} \pm S$
(33)	E.U.A.	30(M + F, -)	1.158 ± 305 (569 - 1.919)		200 ± 61 (61 - 330)		99 ± 27 (47 - 147)		$\bar{X} \pm S$ (ámbito)
(34)	Holanda	15(M, -)	975 ± 201 (664 - 1.401)		202 ± 83 (103 - 404)		93 ± 30 (55 - 141)		$\bar{X} \pm S$ (ámbito)
(6)	E.U.A.	15(F, -)	1.064 ± 287 (581 - 1.630)		174 ± 74 (54 - 343)		109 ± 41 (37 - 195)		$X \pm E.E.$
(29)	Argetia	55(M, 14-27) 63(F, 14-27)	115 ± 1,3 107 ± 1,3		65 ± 1,7 34 ± 1,8		63 ± 1,6 85 ± 1,7		$\bar{X}$ (ámbito)
	Alemania	100(M, 20-29)	143(97-213)		164(84-317)		190(84-429)		
	Australia	45(M, 20-29)	124(86-178)		108(48-244)		133(59-298)		
	Chile	94(M, 20-29)	143(94-219)		127(56-286)		191(86-425)		
	Holanda	100(M, 20-29)	156(83-292)		163(73-365)		158(109-228)		
	Inglaterra	100(M, 20-29)	116(65-206)		94(40-223)		127(48-334)		
	Japón	51(M, 20-29)	123(73-207)		115(46-289)		133(47-372)		
	México	98(M, 20-29)	146(102-210)		129(70-237)		144(68-308)		
	Nigeria	100(M, 20-29)	127(82-196)		97(29-327)		63(12-333)		
	Suecia	100(M, 20-29)	287(146-567)		80(31-207)		211(34-1.413)		
	Suiza	94(M, 20-29)	126(90-177)		126(57-282)		135(52-345)		
		100(M, 20-29)	135(87-208)		136(56-334)		176(81-380)		

ALGUNOS VALORES DE INMUNOGLOBULINAS SERICAS EN POBLACION ADULTA NORMAL DESCRITOS EN LA LITERATURA

Referencia	País	MUESTRA n(sexo, edad)	IgG mg/dl	U/ml	IgA mg/dl	U/ml	IgM mg/dl	U/ml	EXPRESION
(20)	Guatemala	24(F,-)	1.470		350		220		X
(32)	Bulgaria	60(M±F,21-50)		129 ± 29 (64-180)		114 ± 40 (48-240)		131 ± 47 (60-295)	$\bar{X} \pm S$ (ámbito)
(37)	Surinam	6(M,-)	2.105 ± 301 (1.748-2.545)		379 ± 64 (311-473)		248 ± 104 (176-457)		X ± S (ámbito)
(8)	Guatemala	25(M±F,15-29)	1.432 (1.195-1930)		290 ± 59 (198-347)		145 ± 44 (104-230)		$\bar{X}$ (ámbito)
(9)	E.U.A.	22(M,-)		137(82-228)		113(50-254)		157(48-310)	$\bar{X}$ (ámbito)
(23)	E.U.A.	50(M,20-40)	957 (900-1.013)	119 (112-126)	166 (149-183)	117 (105-129)	129 (113-145)	152 (113-171)	X $\bar{X} \pm 2 EE$
(18)		50(F,20-40)	1.053 (981-1.126)	131 (122-140)	166 (146-186)	117 (103-131)	186 (163-209)	220 (193-247)	(-)
(16)	E.U.A.	300(M±F,18-60)	1.224 (719-1.728)		242 (88-397)		M: 60-250 F: 70-280		$\bar{X}$ 15%-95%
(-)	Costa Rica	49(M±F,18-25)	1.495 ± 387 (740-2.480)	185 ± 48 (92-308)	187 ± 55 (60-290)	132 ± 39 (42-204)	142 ± 57 (42-308)	168 ± 67 (50-363)	X ± S (ámbito)

$\bar{X}$  = promedio; S = desviación estándar; E.E. = error estándar; (-) = no determinado.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros colegas Luis Cerdas y José María Gutiérrez por la revisión de este manuscrito. A la Srta. Rocío Monge por su excelente trabajo secretarial, y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo económico.

## ABSTRACT

*Serum concentrations of IgG, IgA and IgM were determined in 49 healthy university students, aged 18 to 25, by radial immunodiffusion, using commercially available plates.*

*Results were compared to normal values reported in the literature. It was found that IgG levels in our sample were slightly higher, whereas IgA and IgM levels were similar to those reported in other countries.*

*A brief discussion of current techniques for immunoglobulin quantitation is included, as well as some comments on international efforts to standardize this determination.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Altschuh, D., Hennache, G. Van Regenmortel, M.H.V. Determination of IgG and IgM levels in serum by rocket immunoelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. *J. Immunol. Method.* 1984; 69:1-7
2. Anderson, S.G. Measurement of concentrations of human serum immunoglobulins. *J. Immunol.* 1971;107:1798-1799.
3. Billewicz, W.Z., Mc Gregor, J.A., Roberts, D.F., Rowe, D.S. Wilson, R.J.M. Family studies in immunoglobulin levels. *Clin. exp. Immunol.* 1974; 16:13-22.
4. Bjerrum, O.J., Ingild, A., Lowenstein, H. Weeke, B. Carbamylated antibodies used for quantitation of human IgG. A routine method. *Scand. J. Immunol.* 1973; 2 (supl. 1): 145-148.
5. Buckley, C.E. Dorsey, F.C. A comparison of serum immunoglobulin concentrations in sarcoidosis and tuberculosis. *Ann. Int. Med.* 1970; 72:37-42.
6. Buckley, C.F. Dorsey, F.C. The effect of aging on human serum immunoglobulin concentrations. *J. Immunol.* 1970; 105:964-972.
7. Buckley, C.E. Dorsey, F.C. Serum immunoglobulin levels throughout the life-span of healthy man. *Ann. Int. Med.* 1971; 75:673-682.
8. Cáceres, A. Mata, L.J. Niveles de inmunoglobulinas en una población del altiplano guatemalteco. *Bol. of. San. Pan.* 1974; 76:115-124.
9. Cejka, J., Mood, D.W. Kim, C.S. Immunoglobulin concentrations in sera of normal children: quantitation against an international reference preparation. *Clin. Chem.*, 1974; 20:656-659.
10. Eisen, H. Immunoglobulin molecules and genes IN: Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. y Ginsberg, H.S. (Edit.) *Microbiology* Harper and Row Publishers, Philadelphia, 1980; 338.
11. Fahey, J.L. Mc Kelvey, E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody - agar plates. *J. Immunol.* 1965; 94:84-90.
12. Goodman J.W. Wang, A. Immunoglobulins: structure, diversity, and genetics, IN: Fudenberg, H.H. Stites, D.P., Caldwell, J.P. y Wells, J.V. (Edit.). *Basic and clinical immunology.* Lange Medical Publication. Los Altos 1980; 28.
13. Heremans, J.F. Masson, P.L. Specific analysis of immunoglobulins, Techniques and clinical value. *Clin. Chem.* 1973; 19:294-300.
14. Hosty, T.A., Hollenbeck, M. Shane, S. Intercomparison of results obtained with five commercial diffusion plates supplied for quantitation of immunoglobulins. *Clin. Chem* 1973; 19:524-526.
15. Humphrey, J.H. Batty, I. International reference preparation for human serum IgG, IgA, IgM. *Clin. exp. Immunol.* 1974; 17:708
16. Hyland diagnostics. Immunoplate III radial immunodiffusion test kits. Folleto instructivo: Illinois, 1982.
17. Immunodiagnostika. Immunodiffusion plates for the quantitative determination of human proteins by single radial immunodiffusion. Folleto instructivo; Inmuno AG, Viene, 1980.
18. Instituto Behring. Partigen, discos de inmunodifusión. Folleto instructivo: Gráficas Román, Barcelona, 1975.
19. Killingsworth, L.M., Savory, J. Manual nephelometric methods for immunochemical determination of immunoglobulins IgG, IgA, and IgM in human serum. *Clin. Chem.* 1972;18:335-339.
20. Lechtig, A., Ovalle, J.J. Mata, L.J. Niveles de IgG, IgA, IgM y C3 en niños indígenas de Guatemala durante los primeros seis meses de edad. *Rev. lat-amer Microbiol.* 1972; 14:65- 71.
21. Litman, G.W. Kehoe, J.M. The phylogenetic origins of immunoglobulin structure. IN: Good, R.A. y Day, S.B. (Edit.) *Comprehensive Immunology*, Vol. 5: *Immunoglobulins*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1978; 205.
22. Maddison, S.E., Stewart, C.C., Farshy, C.E. Reimer, C.B. The relationship of race, sex, and age to concentrations of serum immunoglobulins expressed in international units in healthy adults in the U.S.A. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1975; 62:179- 185.
23. Maddison, S.E. Reimer, C.B. Normative values of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion: a review. *Clin. Chem.* 1976; 22:594-599.
24. Mancini, O., Carbonara, A.O. Heremans, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2:235-254.
25. Milford-Ward, A. Immunoprecipitation in the evaluation of proteins in plasma and body fluids. IN: Thompson, RA. (Edit.) *Techniques in clinical immunology.* Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1977:1.

26. Organización Mundial de la Salud. Uso y abuso de ocho procedimientos de diagnóstico muy difundidos en inmunología clínica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1983; 94:83-102
27. Ouchterlony, O. Nilsson, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. IN: Weir, D.M. (Edit.) *Handbook of immunological methods*, Vol. 1: Immunochemistry. Blackwell Scientific Publication Oxford, 1978; 19.1
28. Reimer, C.B. Maddison, S.E. Standardization of human immunoglobulin quantitation: a review of current status and problems. *Clin. Chem.* 1976; 22:577-582.
29. Rowe, D.S. Concentration of serum immunoglobulins in healthy young adult males estimated by assay against the international reference preparation. *The Lancet* 1972; ii:1232-1233.
30. Rowe, D.S. Anderson, S.G. Grab, B., A Research standard for human serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1970; 42:535-552.
31. Rowe, D.S., Grab, B., Anderson, S.C. An international reference preparation for human serum immunoglobulins G, A and M: content of immunoglobulins by weight. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1972; 46:67-79.
32. Sinkov, D., Toler, V. Stereva. T. Concentrations of IgG, IgA and IgM in terms of international units in the sera of healthy individuals. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1973; 49:217-218.
33. Stiehm, E.R/ Fundenberg. H.H. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics* 1966; 37:715-727.
34. Stoop, J.W., Zegers, B.J.M., Sander, P.C. Ballieux, R.E. Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. *Clin. exp. Immunol.* 1969; 4:101-112.
35. Turk, J.L. Inmunología en medicina clínica. Editorial El Manual Moderno, México, 1976.
36. Weeke, B. Rocket immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 1973; 2 (supl. 1): 37-46.
37. Zegers, B.J. M., Geerdink, R.A. Sander, P.G. Serum immunoglobulin levels in Trio and Wajana idians of Surinam. *Vox Sang.* 1973; 24:457-467.