

QUANTIFICAÇÃO DE IMUNEGLOBULINAS DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE NORMALIDADE

Kioko TAKEI, Rubens G. FERRI, Vera Lúcia G. CALICH, Evaldo MELO e
Maria Lúcia R. da SILVA

RESUMO

Os Autores realizaram a quantificação das imunoglobulinas em amostras de soro de 60 indivíduos normais, pela técnica de Mancini. Essas amostras tinham perfis eletroforéticos e imunofogramas normais. Foram estudados comparativamente os padrões da O.M.S. expressos em unidades internacionais (U.I.) e os fornecidos pela Hyland Laboratories e Behringwerke A.G., em mg/100 ml. Os resultados obtidos foram praticamente idênticos aos da Behringwerke, quanto às três imunoglobulinas (A, G e M) e quanto aos valores da Hyland para IgG e IgA. Os valores encontrados foram: 10,98; 60,34 e 117,40 U.I./mg de IgG, IgA e IgM respectivamente. A reprodutibilidade do método mostrou coeficientes de variação de 16,1, 18,7 e 9,7% para IgG, IgA e IgM respectivamente. Os valores médios obtidos para as duas populações estudadas (doadores e servidores hospitalares) foram de 151,5 U.I./ml para IgG, 129,1 U.I./ml para IgA. Quanto à IgM as duas populações foram tratadas em separado e os valores foram estatisticamente diferentes: doadores 110,30 U.I./ml e servidores hospitalares, 142,00 U.I./ml.

INTRODUÇÃO

Já em 1963, TOMASI & ZIGELBAUM¹⁵ propuseram o método de quantificação de imunoglobulinas que corresponde à imunodifusão radial quantitativa. Muitos experimentos foram entretanto necessários até que a atual metodologia fosse alcançada.

MANCINI & col.¹², verificaram que a velocidade de difusão não era proporcional à raiz quadrada do tempo, ao logaritmo do recíproco da concentração de anticorpos, como ocorria no método de OUDIN¹⁶. O primeiro se baseia na correlação entre a área em que ocorre a precipitação e a quantidade absoluta de antígeno, sendo esta área medida após ter sido atingido o equilíbrio.

Entretanto, FAHEY & MCKELVEY⁴, verificaram proporcionalidade entre o diâmetro da

área em que ocorria a precipitação e o logaritmo da concentração do antígeno. Os Autores realizaram as leituras após 24 horas de difusão, tempo menor que o estabelecido por MANCINI & col.¹².

Desde a introdução destas duas maneiras diversas de considerar a proporcionalidade, a linearidade ao final da reação (diâmetro quadrado versus quantidade) ou relação semi-logarítmica (log da conc. versus diâmetro), muitos têm sido os trabalhos procurando estabelecer os níveis normais das imunoglobulinas, nas diversas faixas etárias e nas mais variadas patologias, sendo plenamente justificável que haja níveis diferentes, em função de raça e distribuição geográfica das populações.

Trabalho de colaboração entre o Centro de Pesquisas Imunoquímicas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. e Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", São Paulo, Brasil
Realizado em parte com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Além do critério para avaliação da normalidade das imunoglobulinas, tivemos no presente trabalho, a preocupação do estabelecimento de "soro de referência" para o nosso laboratório, e de fazer confronto entre padrões comerciais e o fornecido pela Organização Mundial de Saúde, fazendo as necessárias conversões.

Pelas dificuldades encontradas na leitura precisa dos diâmetros e comodidade de sua realização, estudamos um modelo de aparelho que designamos Imunoscópio de Projecção (*).

MATERIAL E MÉTODOS

1 — SOROS NORMAIS

Os soros normais foram obtidos de doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de São Paulo e de servidores do Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira".

Foram analisadas 60 amostras de soros de indivíduos de ambos os sexos, a idade variando entre 20 e 45 anos.

2 — DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas totais foram dosadas segundo GORNALL & col.⁷.

3 — ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE

Todos os soros foram analisados por eletroforese sobre acetato de celulose proposta por KOHN¹¹, adaptada ao equipamento Zeiss-Boskamp no Centro de Pesquisas Imunoquímicas, levada em consideração a faixa de normalidade estabelecida por VAZ & col.¹⁷, e por imunoeletroforese de GRABAR & WILLIAMS⁸, como descrito por FERRI & COSSERMELLI⁵.

As análises eletroforéticas e imunoeletroforéticas, foram realizadas no equipamento

Mikrophor-Boskamp e a densitometria no registrador de extinção Zeiss — modelo EI-3.

4 — QUANTIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS

Imunodifusão radial pela técnica de FAHEY & MCKELVEY⁴ foi usada, com tempo de difusão de 4 horas a 37°C para IgG e de 16 horas para IgM e IgA à temperatura do laboratório, sendo portanto considerados os valores, como representativos das concentrações dos padrões e das amostras a serem analisadas, e não as quantidades totais, como na metodologia original de MANCINI & col.¹². Como não se levou a reação até ao esgotamento completo do antígeno, mas, foram considerados os diâmetros das áreas de precipitação ao final de tempo fixo, a correlação entre diâmetro e concentração forneceu uma reta, em papel semi-logarítmico. Para o seguimento desta técnica, foram utilizados os "Imunoplates" Hyland, aplicando volumes fixos de 7 microlitros (micro-seringas Hamilton) do soro a analisar.

Para o estudo dos padrões, foram também utilizadas placas "Tri-Partigen" da Behringwerke A.G., para as quais o volume de 5 microlitros das amostras eram aplicados aos orifícios e a reação realizada até esgotamento do antígeno: 50 horas para IgA e IgG e 80 horas para IgM.

Utilizamos também, para o estudo dos padrões, placas e imune-soros preparados em nosso laboratório, e seguimos a técnica de FAHEY & MCKELVEY⁴, para as quantificações.

5 — PADRÕES UTILIZADOS

5.1 — *Padrão Hy* — fornecido pela Hyland Laboratories

IgG	—	300	1000	2000	mg/100 ml
IgA	—	60	200	400	mg/100 ml
IgM	—	22	70	140	mg/100 ml

(*) Idealizado por Dr. R. G. Ferri e Dr. K. Geisthövel no Laboratório do Centro de Pesquisas Imunoquímicas e da Karl Zeiss

5.2 — *Padrão BW* — fornecido pela Behringwerke — A.G.

IgG (Partida G-370T)	5,10 U.I./ml	correspondendo a	44,0 mg/100 ml
	11,31 U.I./ml	correspondendo a	98,0 mg/100 ml
	18,70 U.I./ml	correspondendo a	163,0 mg/100 ml
IgA (Partida A-270M)	40,10 U.I./ml	correspondendo a	68,0 mg/100 ml
	103,00 U.I./ml	correspondendo a	173,0 mg/100 ml
	192,00 U.I./ml	correspondendo a	322,0 mg/100 ml
IgM (Partida M-170T)	53,00 U.I./ml	correspondendo a	46,0 mg/100 ml
	155,00 U.I./ml	correspondendo a	135,0 mg/100 ml
	297,00 U.I./ml	correspondendo a	258,0 mg/100 ml

5.3 — *Padrão WHO* — fornecido pela World Health Organization (*)

Immunoglobulin Reference Preparation 67/97.

Adicionando-se ao conteúdo liofilizado de uma ampola desta partida, 1 ml de solvente obtém-se o seguinte teor de imunoglobulinas, expresso em unidades internacionais (U.I.):

IgG	—	96,2 U.I./ml
IgA	—	95,3 U.I./ml
IgM	—	96,2 U.I./ml

5.4 — *Soro de Referência* — C.P.I. (Centro de Pesquisas Imunoquímicas)

Mistura de soros, esterilizada por filtração em velas Berkefeld, contendo azida de sódio (1 g/1000 ml) distribuída em ampolas, em volumes de 1 ml, mantidas a -20°C .

6 — *LEITURA DOS DIÂMETROS*

Foi realizada após adição de ácido acético a 5% (v/v) às placas. O "Imunoscópio de projeção" (Fig. 1), permitiu a medida dos diâmetros com boa precisão e reprodutibilidade proporcionando aumento de 5,2 vezes.

RESULTADOS

1 — *ESTUDO DOS PADRÕES*

No início deste trabalho os padrões fornecidos pelas firmas comerciais variavam muito quanto ao teor das imunoglobulinas e não indicavam a correspondência em U.I. Havia entretanto, a recomendação da OMS para que os resultados de quantificação de imunoglobulinas fossem expressos em U.I., procurando obter equivalência na expressão dos resultados dos diferentes laboratórios, uma vez que, a pureza dos padrões preparados pelos mesmos era seguramente diferente.

A U.I., foi definida para o caso da partida 67/86, como a atividade de IgG, IgA e IgM contida em 0,8147 mg do soro liofilizado.

A atividade média por ampola da partida 67/86 é de 100 U.I. de IgG, IgA e IgM por ml da solução.

A partida padrão por nós utilizada foi a de n.º 67/97 com a atividade já mencionada em Material e Métodos.

Foram estudados comparativamente os padrões Hy, BW, WHO e CPI com o intuito de estabelecer a correlação entre o conteúdo em unidades internacionais por mg de cada uma das imunoglobulinas nos diferentes padrões.

(*) Gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Otto G. Bier e Dra. Annelise Strauss

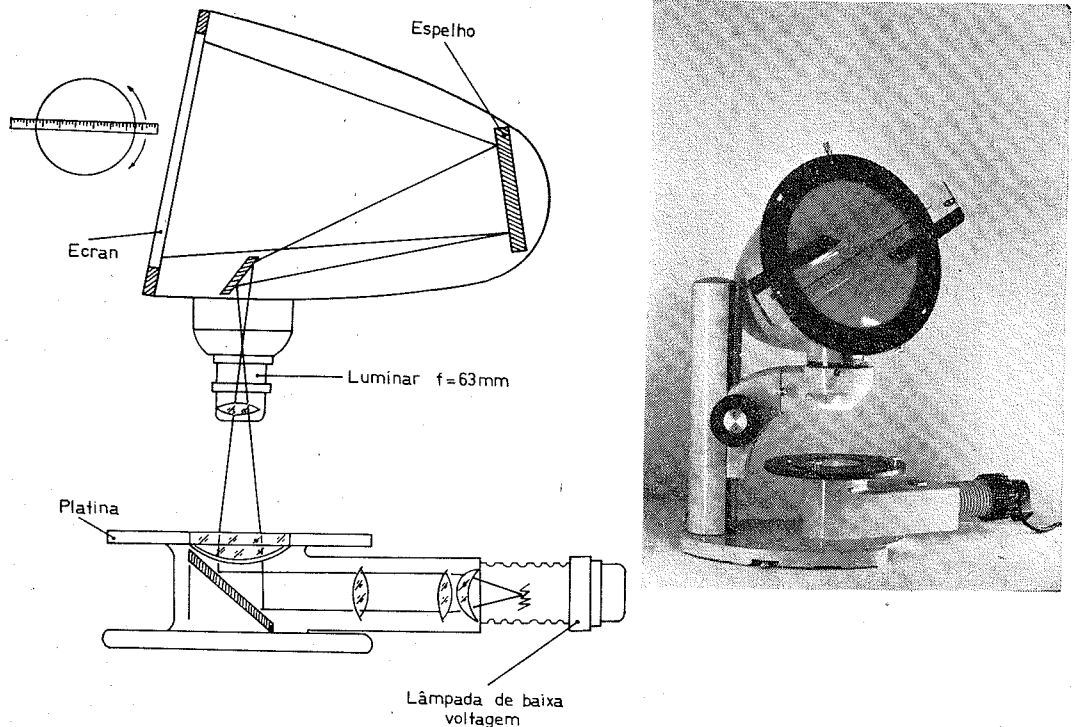


Fig. 1 — Esquema óptico e fotografia do Imunoscópio de projeção.

Muito embora tivéssemos obedecido a todas as normas indicadas pela OMS, houve dificuldade na solubilização do material padrão contido nas ampolas, tendo algumas delas mostrado grande quantidade de material insolúvel mesmo após várias horas.

Foram feitas 24 determinações para IgG, 24 para IgA e 58 para IgM. Para todos os pontos dos gráficos relacionando quantidade

à diâmetro, foi feita a correspondência entre mg e U.I.

A correspondência mg/U.I. pouco variou para as diversas determinações de IgG e IgA, afastando-se os valores individuais muito pouco do valor médio obtido. A dispersão dos resultados para a IgM foi bem maior, exigindo a realização de maior número de determinações. As médias e as dispersões encontradas em tais experimentos encontram-se na Tabela I.

TABELA I

Número de U.I. contidas em 1 mg de cada Imunoglobulina

	N.º de determinações	Valor médio 1 mg = n U.I. (n)	Dispersão (U.I.)
IgG	24	10,98	10,46 — 11,51
IgA	24	60,34	59,82 — 60,87
IgM	58	117,40	78,24 — 159,52

O soro de referência C.P.I. foi dosado quanto às imunoglobulinas tanto em U.I./ml como em mg/ml. Realizamos 18 determinações para IgG, 18 para IgM e 18 para IgA.

As médias dos resultados obtidos foram:

IgG	— 214,89 U.I./ml equivalente a 19,57 mg/ml
IgA	— 101,08 U.I./ml equivalente a 1,675 mg/ml
IgM	— 138,91 U.I./ml equivalente a 1,183 mg/ml

Posteriormente à realização deste trabalho as firmas comerciais passaram a indicar a correspondência entre mg e U.I. para as imunoglobulinas.

A Tabela II mostra os valores fornecidos por duas firmas e os obtidos em nossos laboratórios.

Observa-se uma grande concordância para os valores de IgG e IgA entre os 3 laboratórios, e também, para as determinações de IgM entre Behringwerke e o Centro de Pesquisas Imunoquímicas. O valor Hyland para IgM foi o único discrepante encontrado.

TABELA II

Atividade em U.I. contida em 1 mg de Imunoglobulina
Confronto entre 3 laboratórios

Laboratórios	U.I. por mg de Imunoglobulina		
	IgG	IgA	IgM
Hyland ¹⁰	11,25	59,01	198,00
Behringwerke ³	11,51	59,51	115,00
Centro de Pesquisas Imunoquímicas	10,98	60,34	117,40

2 — REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO USADO

Foi utilizada mistura de vários soros normais, dosada 20 vezes no mesmo dia, em placas diferentes.

As médias aritméticas (M.A.), os desvios padrão (D.P.), os coeficientes de variação (C.V.) e oscilações críticas (O.C.), encontram-se resumidos na Tabela III.

3 — ESTABELECIMENTO DA FAIXA DE NORMALIDADE

Os soros utilizados para quantificação de imunoglobulinas pelo método de imunodifusão radial foram previamente analisados por eletroforese e imunoletroforese. Somente os soros que mostraram comportamento dentro dos padrões de normalidade estabelecidos no C.P.I. (Centro de Pesquisas Imunoquímicas)

TABELA III

Precisão do Método (reprodutividade ideal)

	M.A. mg/100 ml	D.P.	C.V. %	O.C. mg/100 ml
IgG	1.328	214	16,1	470
IgA	250	47	18,7	100
IgM	101	10	9,7	20

foram incluídos nos experimentos de quantificação. Dispensamos a apresentação dos resultados de eletro e imunoeletroforese, desde que, não se enquadravam dentro dos objetivos do presente trabalho.

Foram estudados os soros de 60 indivíduos, sendo 27 doadores do Banco de Sangue do

Hospital das Clínicas de São Paulo e 33 servidores hospitalares. As Tabelas IV e IVa resumem os resultados de todas as quantificações, expressas em mg/100 ml.

A homogeneidade dos resultados médios foi verificada para cada imunoglobulina nas subamostras de doadores de sangue e ser-

TABELA IV

Valores individuais das Imunoglobulinas

Doadores
mg/100 ml

Soro	IgG	IgA	IgM
M.S.I.	1600	165	43
A.O.	1200	95	45
S.C.L.	1700	120	135
P.T.	1400	215	105
J.E.B.	2200	225	80
V.S.	1600	185	75
G.B.S.	1700	300	120
G.P.	1800	225	68
L.L.C.	1600	420	132
S.S.	1400	185	148
P.T.S.	1400	200	92
R.C.B.	1960	230	75
P.H.S.	1040	340	108
M.L.	1080	275	68
J.I.S.	1520	130	60
E.F.C.	1300	235	140
L.C.R.	1500	240	92
J.L.	1500	190	108
I.C.S.	1450	290	140
L.T.S.	1850	140	80
J.M.P.	1200	120	84
J.C.S.	1300	320	86
L.G.S.	1380	300	78
O.C.V.	1020	70	30
J.N.M.	1680	220	110
G.J.G.	1200	155	120
D.A.	1380	170	120

TABELA IVa

Valores individuais das Imunoglobulinas

Servidores Hospitalares
mg/100 ml

Soro	IgG	IgA	IgM
M.S.	1500	250	185
R.L.Q.	1620	310	88
F.F.	1150	180	140
D.C.N.	1270	270	120
S.M.P.	1600	230	170
B.B.G.	1450	460	60
O.C.	1120	215	70
N.G.O.	1500	260	47
L.C.P.	1320	335	55
W.B.	1150	245	115
S.A.	1400	180	118
C.G.	1200	280	185
P.O.	1420	100	82
T.T.	930	130	142
H.I.	1600	210	120
P.F.B.	1320	210	55
A.C.	1200	310	72
V.K.U.	1200	180	120
E.P.	1320	350	100
M.F.	1320	240	140
S.N.	1820	240	160
K.T.	1320	210	220
M.M.O.	1080	230	132
M.L.R.S.	1280	350	155
M.H.	1500	188	85
C.G.	1600	350	210
C.E.S.R.	1100	410	140
C.A.M.	1400	145	200
E.F.R.	1400	145	200
M.V.	1620	150	100
I.D.	1620	458	230
W.B.	1080	120	280
L.P.S.	1500	230	98

vidores hospitalares através do teste de diferença de médias para valores não pares e analisados pelo estatístico "t" de Student ao nível de significância = 0,05.

Os valores de t (Student) relativos a IgG e IgA, para o grupo dos 60 indivíduos foram $t = 0,9426$ e $t = 0,0796$, respectivamente, sendo portanto, considerado homogêneo o grupo total.

Para IgM o valor de t foi de 3,153, sendo conseqüentemente os dois subgrupos, trata-

dos separadamente: a população dos servidores hospitalares foi considerada diferente quanto à IgM.

Todas as imunoglobulinas mostraram uma distribuição log normal.

As médias log normais (\bar{X}) do grupo dos 60 indivíduos estudados e os respectivos intervalos de confiança para os valores individuais (I.C.V.I.) estão na Tabela V.

A Fig. 2 mostra o confronto entre os resultados por nós obtidos e os da literatura.

TABELA V

Valores das Imunoglobulinas expressos em mg/100 ml e U.I./ml para a população estudada

	IgG mg/100 ml	U.I./ml	IgA mg/100 ml	U.I./ml	IgM mg/100 ml	U.I./ml
\bar{X}	1380	151,5	214	129,1	94 — P.G. 121 — P.H.	110,3 142,0
ICVI	957-1988	105,1-218,3	96-480	57,9-289,6	30-158 — P.G. 48-307 — P.H.	35,2-185,5 56,3-360,4

P.G. — População Geral (Doadores de banco de sangue)

P.H. — População Hospitalar (Servidores hospitalares)

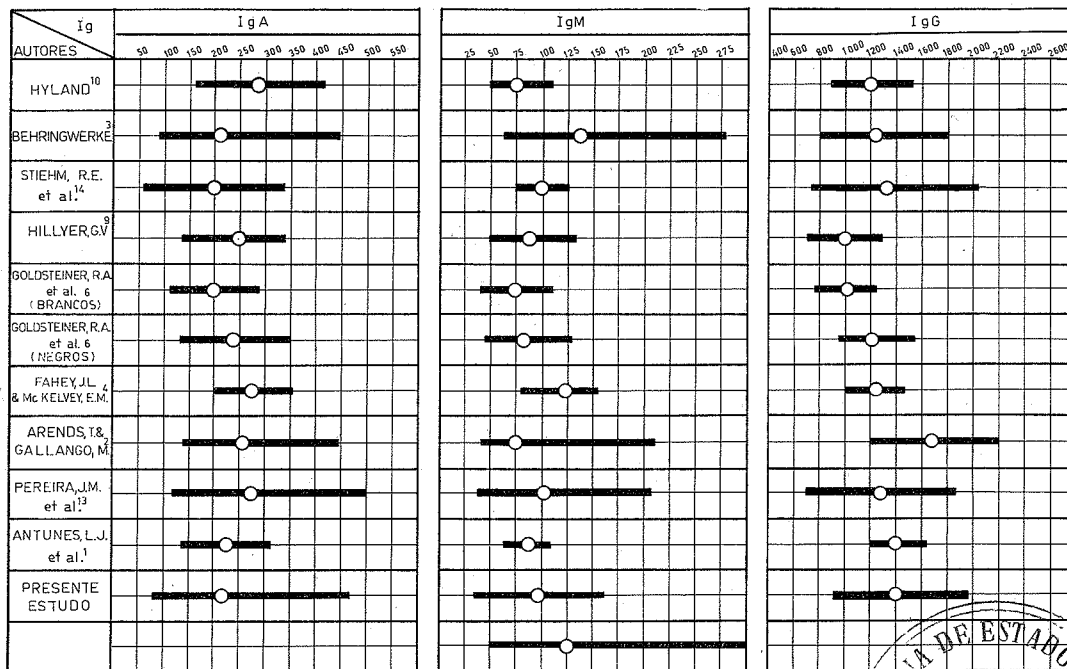
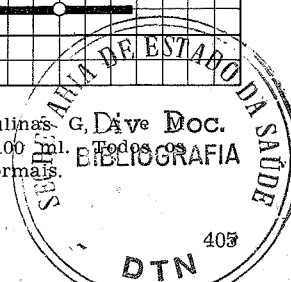


Fig. 2 — Confronto entre valores médios e dispersões das imunoglobulinas encontradas no presente trabalho e os da literatura, expressos em mg/100 ml. Autores trabalharam com amostras de soros de indivíduos normais.



4 — DIFERENÇAS DE NÍVEIS DE IgM ENTRE A POPULAÇÃO DE DOADORES DE BANCO DE SANGUE E A DE SERVIDORES HOSPITALARES

Nos níveis de IgM houve uma diferença significativa entre os dois grupos estudados,

mostrando o grupo de doadores de banco de sangue, I.V.C.I. de 30-158 mg/100 ml e média log normal de 94 mg/100 ml. O I.C.V.I. para o grupo de servidores hospitalares foi de 48 a 307 mg/100 ml e a média log normal, de 121 mg/100 ml (Fig. 3).

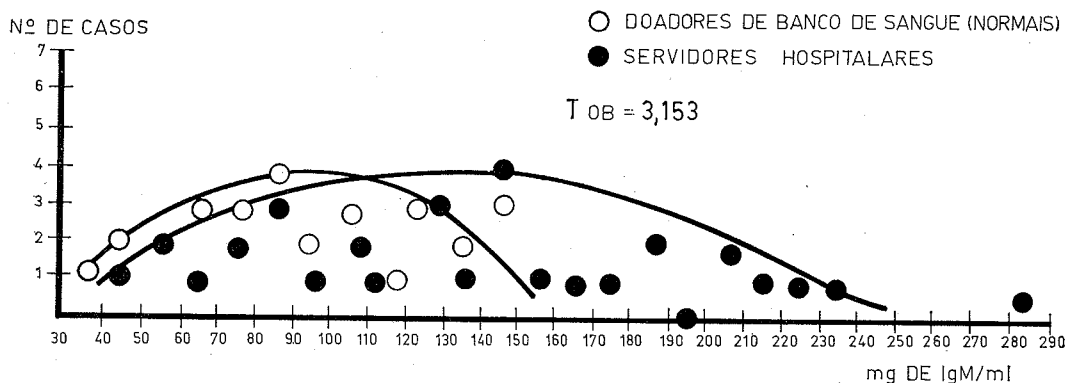


FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE IgM EM AMOSTRAS DE DOADORES DE BANCO DE SANGUE E SERVIDORES HOSPITALARES. OS DOIS GRUPOS COMPORTARAM-SE COMO POPULAÇÕES DISTINTAS. A MÉDIA LOG NORMAL DE IgM PARA O 1º GRUPO FOI 94 mg/100 ml E ICVI DE 30 a 158 mg/100 ml E PARA O 2º 121 mg/100 ml E ICVI DE 48 a 307 mg/100 ml.

DISCUSSÃO

O método de MANCINI & col.¹² estabelece como premissa, o término da reação, isto é, a medida da quantidade total de antígeno em difusão em uma camada de ágar contendo o anticorpo uniformemente distribuído. A linearidade da correlação entre a quantidade de antígeno e a área em que ocorre a precipitação só se verifica após esgotamento total do antígeno. Assim, o que se mede é a quantidade total do antígeno posto a difundir. Nos métodos em que se procede a leitura em tempo fixo, antes do esgotamento e portanto a área precipitada não chegou ao seu tamanho máximo, pode-se também estabelecer relação entre a concentração do antígeno, e a área precipitada, utilizando-se a função logarítmica da concentração.

Parece-nos conveniente sempre, cada laboratório adquirir uma primeira experiência

com o método de reação a termo, comparando os resultados com os obtidos pelo processo sugerido por FAHEY & MCKELVEY⁴. Além disso, deve estabelecer seu próprio padrão de imunoglobulinas baseado na "preparação de referência" fornecida pela OMS, e simultaneamente em preparações purificadas de imunoglobulinas dos laboratórios comerciais.

Os valores que obtivemos, expressos em U.I./mg para os padrões da Behringwerke A.G. e da Hyland Laboratories não apresentam diferenças significativas dos encontrados por esses laboratórios, à exceção do valor de IgM que para a HYLAND¹⁰ é de 198 U.I./mg enquanto que o determinado por nós foi de 117,4 U.I./mg, valor praticamente igual ao da BEHRINGWERKE³ que é de 115 U.I./mg.

Vários Autores, de diferentes países, determinaram os valores normais para as imu-

neglobulinas G, A e M. Do confronto desses resultados (Fig. 2) verifica-se grande discrepância de valores que poderia ser explicada em função da diferente metodologia aplicada, uso de padrões diferentes e também das várias condições sócio-econômicas das populações estudadas.

Os valores encontrados nas amostras estudadas no presente trabalho estão muito próximos daqueles referidos pela BEHRINGWERKE³. ANTUNES & col.¹, usando a técnica de imunodifusão radial reversa, encontraram valores médios para as 3 imunoglobulinas que se aproximaram dos que obtivemos. A dispersão entretanto foi menor e poderia ter sido conseqüência do pequeno número de indivíduos (20) analisados por esses Autores.

PEREIRA & col.¹³, encontraram valores médios e dispersões semelhantes aos nossos, apesar de terem analisado somente 20 amostras.

Os resultados obtidos para a IgM mostraram valores significativamente diferentes entre os indivíduos doadores de banco de sangue e servidores hospitalares. Após análise estatística esses indivíduos foram separados em 2 subgrupos. A média e a dispersão dos valores encontrados na população de servidores hospitalares foram significativamente mais elevadas. O alto nível de IgM nesses indivíduos, considerados aparentemente saudáveis, poderia resultar da alta freqüência de estímulos antigênicos a que estão submetidos, decorrentes da existência de microrganismos que normalmente poluem o ambiente hospitalar. Cabe então salientar que quando se analisa o nível de uma imunoglobulina, no caso a IgM, deve-se tomar em consideração as condições ambientais em que o indivíduo vive ou trabalha para se julgar sua normalidade.

Para as outras imunoglobulinas (IgA e IgG) as duas populações mostraram comportamento idêntico, parecendo indicar uma não influência desse meio ambiente.

S U M M A R Y

Immunoglobulin quantitation. Normal values

Immunoglobulin quantitation by single radial immunodiffusion by Mancini techni-

que was done in the serum of 60 clinically healthy adults. These sera had also normal electro and immunoelectrophoretic serum patterns.

Concentrations of standards from W.H.O. expressed in international units and from private laboratories (Hyland and Behringwerke) expressed in terms of weight of each immunoglobulin were studied comparatively.

Our results matched with Behringwerke values in all three classes of immunoglobulin and with Hyland IgG and IgA values. The number of international units (I.U.) per mg of IgM found in Hyland laboratories were higher when compared to our and Behringwerke values.

We found 10.98, 60.34 and 117.40 I.U./mg for IgG, IgA and IgM respectively.

Reproducibility of the method showed a coefficient of variation of 16.1, 18.7 and 9.7% for IgG, IgA and IgM respectively.

The mean values found for the two populations studied were: IgG = 151.5; IgA = 129.1 I.U./ml.

In relation to IgM the groups of blood donors and hospital personnel were treated as different populations giving the following results:

- a) blood donors = 110.30 I.U./ml
- b) hospital personnel = 142.00 I.U./ml.

The Authors discuss the values found for IgM in the two groups and the meaning of these differences.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; PELLEGRINO, J.; TAVARES, C. A. & KATZ, N. — Immunoglobulins in human schistosomiasis mansoni. *J. Parasitol.* 57:539-542, 1971.
2. ARENDS, T. & GALLANGO, M. — Niveles normales de inmunoglobulinas en Venezuela. *Acta Cient. Venezolana* 2:3-7, 1967.
3. BEHRINGWERKE, A.G. — Marburg, West-Germany.
4. FAHEY, J. L. & MCKELVEY, E. M. — Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody — agar plates. *J. Immun.* 94:84-90, 1965.
5. FERRI, R. G. & COSSERMELLI, W. — Analyse immuno-electrophorétique. Micro et

- macro méthodes. *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.* 9:134-138, 1964.
6. GOLDSTEINER, R. A.; ISRAEL, H. L. & RAWNSLEY, H. M. — Effect of race and stage of disease on the serum immunoglobulins in sarcoidosis. *J. Amer. Med. As.* 208:1153-1155, 1969.
 7. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. J. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766, 1949.
 8. GRABAR, P. & WILLIAMS JR., C. A. — Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta* 17:67-74, 1955.
 9. HILLYER, G. V. — Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infectives. *Exp. Parasit.* 25:376-381, 1969.
 10. HYLAND Laboratories — Los Angeles, California, U.S.A.
 11. KOHN, J. — A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin. Chim. Acta* 2:297-303, 1957.
 12. MANCINI, G.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. — Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235-254, 1965.
 13. PEREIRA, J. M.; CALLADO, A. N. A.; CONSTANCIO, W. F.; LAJCHTER, D. & VIEIRA, A. A. — Determinação quantitativa de imunoglobulinas (imunodifusão radial). *Rev. Méd. Est. Guanabara* 38:153-161, 1971.
 14. STIEHM, R. E. & FUDEMBERG, H. H. — Serum levels of immunoglobulins in health and disease; a survey. *Pediatrics* 37:715, 1966.
 15. TOMASI, T. B. & ZIGELBAUM, S. — The selective occurrence of γ_1A — globulins in certain body fluids. *J. Clin. Invest.* 42: 1552-1560, 1963.
 16. OUDIN, J. C. R. — Apud MANCINI, G.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F.¹².
 17. VAZ, C. A. C.; FERRI, R. G.; GEISTHÖVEL, N. & CAMPOS, A. N. P. — Eletroforese sobre acetato de celulose (CAF) Reprodutibilidade e valores normais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (São Paulo)* 31:71-75, 1971.
- Recebido para publicação em 27/4/1973.