

## Elettroforesi capillare: confronto quantitativo delle zone albumina e $\alpha$ -1-globulina con le corrispondenti proteine specifiche

Paola Luraschi<sup>1</sup>, Simona Brambilla<sup>2</sup>, Ilenia Infusino<sup>2</sup>, Anna Pagani<sup>2</sup>, Carlo Franzini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ospedale L. Sacco, Laboratorio di Chimica Clinica, Milano, Italy

<sup>2</sup>Università degli Studi di Milano, Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica

<sup>3</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Italy

### ABSTRACT

#### Albumin and $\alpha$ -1-globulin capillary electrophoresis zones compared with specific protein concentrations

Due to measurement by UV absorption, capillary zone electrophoresis permits reliable quantitation of the separated zones. It is therefore important that detailed information on the relationship among the zones and the relevant protein species is available. We compared the albumin and  $\alpha$ -1-globulin zones electrophoretic with respectively the albumin and the sum ( $\alpha$ -1-antitrypsin +  $\alpha$ -1-acid glycoprotein) measured with alternative methods. Two sets of fresh patient sera ( $n = 188$  and  $n = 114$ ), selected to cover wide intervals of zone values, were used. Electrophoretic zones were measured with a Beckman Coulter Paragon CZE 2000 system. Specific proteins were measured by immunonephelometry (albumin,  $\alpha$ -1-antitrypsin and  $\alpha$ -1-acid glycoprotein) and by dye-binding (albumin). CZE albumin compared favourably with immunochemical albumin (mean difference:  $2.6 \pm 2.21$  g/L) and with dye-binding albumin (mean difference:  $-0.80 \pm 2.00$ ): the observed differences were lower than the biological variation-based critical difference (11%) in the albumin concentration interval 25.0-60.0 g/L. The CZE  $\alpha$ -1-globulin zone correlated significantly with the sum ( $\alpha$ -1-antitrypsin +  $\alpha$ -1-acid glycoprotein), but showed to be significantly higher (mean difference:  $2.38 \pm 0.72$  g/L). We conclude that CZE albumin values are clinically equivalent to alternative albumin measurements in the mentioned concentration interval. CZE  $\alpha$ -1 zone gives information about increases of the two major acute phase proteins comparable to specific protein measurements; however, additional UV-absorbing material contributes significantly to the CZE zone.

### RIASSUNTO

La elettroforesi capillare zonale (CZE) consente una quantificazione affidabile delle zone separate. Ai fini interpretativi è pertanto importante conoscere le relazioni tra le zone e le corrispondenti specie proteiche. Abbiamo confrontato le zone elettroforetiche albumina e  $\alpha$ -1-globulina con, rispettivamente, l'albumina e la somma (AAT+AAG) misurate con metodi alternativi. Per tale confronto si sono utilizzati due serie di sieri da paziente ( $n = 188$  e  $n = 114$ ) selezionati in modo da coprire ampi intervalli di valori. Le zone elettroforetiche sono state misurate con un sistema Beckman Coulter CZE 2000. Le proteine specifiche sono state misurate immunonefelometricamente; l'albumina anche con legame di colorante. I valori di albumina misurati con CZE sono risultati accettabilmente comparabili con quelli della misura immunochimica (differenza media:  $2,6 \pm 2,21$  g/L) e con quelli del legame di colorante (differenza media:  $-0,80 \pm 2,00$  g/L): le differenze osservate risultavano più basse della differenza critica basata sulla variabilità biologica (11%) nell'intervallo dei valori di concentrazione albuminica 25,0 - 60,0 g/L. I valori della zona  $\alpha$ -1-globulinica risultavano significativamente correlati con la somma (AAT + AAG), nei confronti della quale risultavano tuttavia significativamente più alti (differenza media:  $2,38 \pm 0,72$  g/L). In conclusione le misure CZE dell'albumina sono clinicamente equivalenti a quelle con metodi alternativi nell'intervallo di concentrazioni menzionato. La misura della zona  $\alpha$ -1 mediante CZE fornisce informazioni sugli aumenti delle due maggiori proteine di fase acuta confrontabili a quelle fornite dalla misura delle specifiche proteine; tuttavia ulteriore materiale capace di assorbire nell'UV contribuisce significativamente a tale zona elettroforetica.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'elettroforesi capillare zonale (CZE) è stata applicata all'analisi quantitativa delle proteine del siero umano (1). La tecnica sta diventando di sempre maggiore utilizzo nei laboratori di chimica clinica da quando Beckman Coulter ha reso disponibile uno strumento dedicato. Il sistema Paragon CZE 2000 della Beckman Coulter

comprende un apparato di 7 capillari di separazione e la misura dell'assorbanza a 214 nm dell'effluente: con un tampone ed un software appropriati permette la separazione e la misura quantitativa di 5 zone di proteine del siero, corrispondenti a quelle della classica elettroforesi clinica. Il sistema è stato sottoposto a diverse valutazioni (2-7), e sono stati prodotti intervalli di riferimento specifici

per gli adulti (2-4, 8) e per i bambini (9).

Dal punto di vista analitico, il vantaggio principale della CZE rispetto alle tecniche elettroforetiche tradizionali è la misura quantitativa basata sull'assorbimento dei legami peptidici nell'UV. Nonostante i possibili problemi dovuti ai differenti coefficienti di assorbimento delle diverse proteine del siero (4), questo tipo di misura presenta reali vantaggi rispetto ai metodi che comprendono le poco riproducibili fasi di colorazione/decolorazione (3, 10). Il contributo di specifiche specie molecolari proteiche alle cinque maggiori zone della CZE è stato descritto (3, 4). Comunque, al fine di sfruttare completamente le capacità della CZE, per scopi diagnostici o di sorveglianza del paziente, è importante che la relazione quantitativa tra le zone della CZE e le specifiche proteine venga pienamente compresa.

L'albumina e due principali proteine di fase acuta,  $\alpha$ -1 antitripsina (AAT) e  $\alpha$ -1 glicoproteina acida (AAG), sono frequentemente misurate nei laboratori di chimica clinica per riconoscere o monitorare specifiche situazioni cliniche, e sono considerate le principali componenti delle zone albumina e  $\alpha$ -1-globulina della CZE, rispettivamente (3). Ci siamo proposti con questo lavoro di confrontare i risultati quantitativi nelle misure delle zone elettroforetiche con la misura delle corrispondenti proteine con metodi alternativi. A tale scopo abbiamo misurato la concentrazione delle singole proteine, immunochimicamente (albumina, AAG e AAT) e mediante legame di colorante (albumina), e le zone elettroforetiche corrispondenti con la CZE. I risultati sono stati mostrati in via preliminare al 14<sup>th</sup> IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Praga, maggio 2001 (11-12).

## MATERIALI E METODI

I campioni di siero utilizzati erano quelli avanzati dai campioni di sangue della routine giornaliera del laboratorio, ed erano selezionati in modo da coprire ampi intervalli di valori delle rispettive zone della CZE (albumina: 14,4 - 53,6 g/L;  $\alpha$ -1-globulina: 2,8 - 9,7 g/L). Tali campioni di siero sono stati analizzati in differenti serie analitiche, entro 6 ore dal prelievo oppure dopo 4 giorni di conservazione del siero separato a +4 °C. Per il confronto albumina (n = 188) e  $\alpha$ -1-globulina (n = 114) si sono utilizzate due differenti serie di campioni di siero. Nessuno dei campioni utilizzati per il confronto dell'  $\alpha$ -1-globulina mostrava un quadro elettroforetico (CZE) che suggerisse la possibile presenza di mutazione della AAT.

Le analisi CZE sono state eseguite con 2 strumenti gemelli Paragon CZE 2000 (Beckman Coulter, Milano, Italia). I due strumenti erano dotati di software release 1.5, ed erano in uso da circa un anno, prima di incominciare gli esperimenti di confronto. Agli strumenti veniva fornito il valore di concentrazione di proteine totali di ciascun siero, in modo da calcolare la concentrazione di massa di ciascuna zona, espressa in g/L. L'imprecisione globale delle misure della CZE (CV% medio, dai valori di CV mensili determinati nell'arco di 12 mesi nel corso del controllo di

qualità giornaliero) era del 1,1% (albumina) e 5,2% ( $\alpha$ -1-globulina).

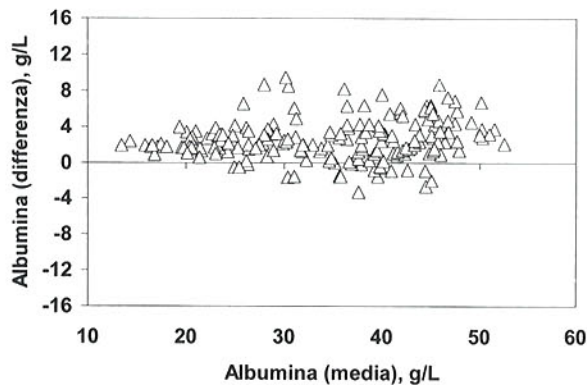
La determinazione immunonefelometrica di albumina, AAT e AAG è stata eseguita con immunonefelometro Image (Beckman Coulter, Milano, Italia). Le misure di albumina mediante legame di colorante (marcatore: verde di bromo-cresolo) e di proteine totali (biuretto) sono state eseguite con analizzatore Modular (Roche-Hitachi, Milano, Italia). I rea-genti e i calibratori per i differenti metodi di misura erano forniti dalla ditta produttrice dello strumento. Tutti i risultati delle misure chimiche o immunochimiche erano riportati in g/L. L'imprecisione globale delle misure, come valori dei CV mensili del CQ di routine, era: proteine (due livelli), da 0,8% a 1,0%; albumina (legame di colorante, due livelli) da 0,6% a 2,9%; albumina (immunonefelometria; un livello) da 1,6% a 2,4%; AAT (due livelli) da 1,9 a 3,6%; AAG (due livelli) da 1,6% a 9,9%.

Per la valutazione statistica si sono usati test parametrici ordinari. I risultati del confronto di metodi erano valutati statisticamente con l'approccio della distribuzione delle differenze (13) e graficamente come grafico delle differenze (13). E' stata anche calcolata la regressione di Deming. Per i calcoli sono stati usati i programmi Method Validator (Philippe Marquis, Biologist de Hopitiaux, Metz, France) e MS Excel.

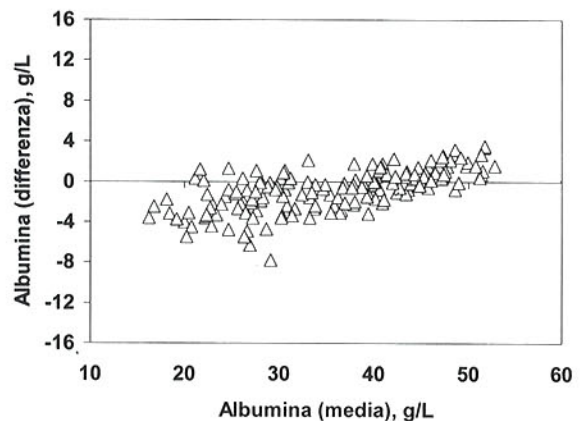
## RISULTATI

Nelle due serie di sieri, i valori di concentrazione delle tre proteine (determinati immunochimicamente) coprivano gli intervalli 12,5-51,5 g/L (albumina), 0,76-3,92 g/L (AAT) e 0,05-3,13 g/L (AAG); gli intervalli di riferimento accettati "ad interim" di tali proteine sono 35-52 g/L (albumina), 0,9-2,0 g/L (AAT), e 0,5-1,2 g/L (AAG), rispettivamente (14).

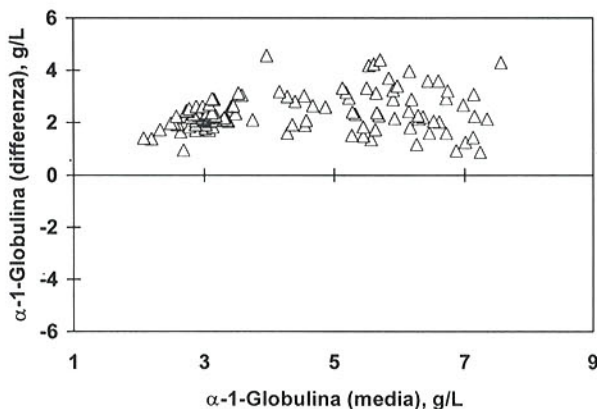
I valori di albumina della CZE sono stati confrontati con i valori di albumina misurati immunonefelometricamente e mediante legame di colorante; i valori di  $\alpha$ -1-globulina della CZE sono stati confrontati con la somma (AAG + AAT) ottenuta dalle misure immunonefelometriche. I grafici di confronto sono mostrati nelle figure 1, 2 e 3, come grafici delle differenze. I tre confronti mostrano differenze intermetodo sistematiche. Tali differenze appaiono costanti, nell'intervallo dei valori misurati, quando vengono confrontate le misure del CZE e quelle immunochimiche (albumina e  $\alpha$ -1-globulina); esse rivelano una moderata dipendenza dalla concentrazione nel confronto CZE-albumina con albumina da legame di colorante. Valore medio, deviazione standard e intervalli di confidenza al 95% di ciascuna differenza sono riportati nella tabella 1, che mostra differenze significativamente diverse da 0. L'analisi della regressione sostanzialmente conferma queste valutazioni, rivelando valori statisticamente significativi di pendenza ed intercetta, con l'eccezione della  $\alpha$ -1-globulina dove solo la porzione costante dell'errore sistematico (intercetta) è significativo. La deviazione standard residua ricavata dall'analisi della regressione (Syx) e la deviazione standard delle differenze (entrambe una misura di "asso-



**Figure 1**  
Misura dell'albumina: confronto tra metodi. L'albumina è stata misurata in 188 campioni di siero mediante immunonefelometria (x) ed elettroforesi capillare zonale (y). Nel grafico sono riportate le differenze (y - x) contro le medie delle due misure. Tutti i dati sono in g/L.



**Figure 2.**  
Misura dell'albumina: confronto tra metodi. L'albumina è stata misurata in 188 campioni di siero mediante legame di colorante (x) ed elettroforesi capillare zonale (y). Nel grafico sono riportate le differenze (y - x) contro le medie delle due misure. Tutti i dati sono in g/L.



**Figure 3**  
Misura della  $\alpha$ -1-globulina: confronto tra metodi. In 114 campioni di siero sono state misurate la AAT e la AAG (mediante immunonefelometria) e la zona elettroforetica  $\alpha$ -1-globulina (mediante CZE). Sono riportate in grafico le differenze [(AAG + AAT) - ( $\alpha$ -1-globulina)] (y) contro le medie delle due misure. Tutti i dati sono in g/L.

**Tabella 1**

Analisi statistica dei risultati del confronto tra metodi, come regressione lineare secondo Deming, come analisi della distribuzione delle differenze, e come coefficiente di correlazione "R". Tutti i valori in g/L. In parentesi gli intervalli di confidenza 95%

Metodi confrontati			Regressione di Deming (y/x)			R	Differenze (y-x) Media $\pm$ DS (g/L)
Metodo x	Metodo y	N	Intercetta (g/L)	Pendenza	Sy.x (g/L)		
Albumina (immunonefelomet.)	Albumina (CZE)	188	+1,25 (0,42/2,08)	1,04 (1,01/1,07)	2,23	0,975	+2,6 $\pm$ 2,21 2,24/2,88
Albumina (legame di colorante)	Albumina (CZE)	188	-6,25 (-7,58/5,53)	1,16 (1,13/1,18)	1,60	0,987	-0,80 $\pm$ 2,00 (-1,08/-0,51)
AAT+AAG (immunonefelomet.)	$\alpha$ -1-Globulina (CZE)	114	+2,04 (1,74/2,34)	1,11 (0,99/1,22)	0,76	0,903	+2,38 $\pm$ 0,72 (2,25/2,52)

ciazione") sono abbastanza sovrapponibili (tabella 1).

**DISCUSSIONE**

Nei confronti della misura immunochimica, i valori di albumina ottenuti con la CZE mostra un piccolo ma significativo errore costante positivo (+1,25 g/L), che sommandosi all'errore proporzionale (1,04) determinava una sovrastima compresa tra il 9,0 % ed il 6,0 % a valori di concentrazione rispettivamente di 25 g/L e 60 g/L. Nel confronto con il metodo del legame di colorante, la CZE esibiva un elevato errore costante negativo (-6,52 g/L) parzialmente compensato nell'intervallo centrale (35 - 50 g/L) dall'errore proporzionale (1,16): come risultato, la CZE sottostimava (10,3 %) e sovrastimava (+4,73 %) a valori di concentrazione rispettivamente di 25 g/L e 60 g/L.

Un effetto simile veniva riscontrato quando si confrontavano i valori di albumina del siero ottenuti con la CZE e con l'elettroforesi su acetato di cellulosa (3, 8). La possibile inaccuratezza delle misure con il metodo di legame di colorante potrebbero essere la causa di un tale effetto: la sovra- e sottostima a, rispettivamente, valori alti e bassi è

spesso considerata una caratteristica della determinazione dell'albumina del siero mediante tale metodo o mediante elettroforesi su acetato di cellulosa (3). La differenza media (CZE meno immunonefelometria) qui osservata nella determinazione dell'albumina ( $2,6 \pm 2,2$  g/L) si sovrappone favorevolmente ai valori (3) precedentemente riportati ( $2,0 \pm 2,1$  g/L) per tale differenza. Anche i dati di altri studi (4) mostrano una sovrastima media di circa 2,0 g/L della CZE nei confronti delle misure immunochimiche dell'albumina, ma rivelano pure una sovrastima media di circa 2,8 g/L della CZE nei confronti delle misure con legame di colorante dell'albumina, in contrasto con il nostro valore di  $-0,8 \pm 2,0$  per tale differenza. Le differenze nei gruppi-campione potrebbe essere responsabile di questa discrepanza, a causa del peculiare comportamento della relazione CZE/legame di colorante, come discusso. In una serie addizionale la differenza media (CZE meno immunonefelometria) nella misura dell'albumina era di  $1,1 \pm 2,1$  g/L, ma le misure erano eseguite con un differente sistema di elettroforesi capillare (15). Nel tentativo di valutare oggettivamente la possibile rilevanza clinica di una tale sotto- e sovrastima dell'albumina si è preso come guida l'approccio della variabilità biologica. Considerando per l'albumina una variabilità biologica media intraindividuale del 3,6% (17-18) e assumendo che le misure siano eseguite con una variabilità analitica del 1,8% (valore realistico, concorde con il goal analitico dell'imprecisione), la differenza critica per l'albumina è  $[2,77 \times (3,6^2 + 1,8^2)^{1/2}] = 11,1\%$ . Le differenze intermetodo non raggiungono una tale differenza critica nell'intervallo di concentrazione menzionato (25 - 60 g/L). Entro i limiti di questo approccio teorico, potremmo concludere che i valori di concentrazione di albumina della CZE sono clinicamente interscambiabili con quelli ottenuti immunochimicamente e con legame di colorante in fase liquida, per valori all'interno dell'intervallo di 25 - 60 g/L. Le differenze intermetodo superano decisamente la differenza critica a valori di concentrazione inferiori a 15 g/L (metodi: CZE/immunochimica) o 25 g/L (metodi: CZE/legame di colorante).

AAT e AAG sono ritenute le principali componenti della zona  $\alpha$ -1-globulina della CZE (3). Le due proteine specifiche e la zona elettroforetica sono considerate marcatori di fase acuta (3, 4, 19). La zona  $\alpha$ -1-globulina della CZE si mostra aumentata nella fase acuta (4), ma dati riguardanti la sua relazione quantitativa con la misura immunochimica delle proteine specifiche non sono riportati. Nel presente lavoro abbiamo confrontato la zona  $\alpha$ -1-globulina della CZE con la somma (AAT + AAG) in una serie di 114 campioni di siero, selezionati a coprire un ampio intervallo di valori della zona  $\alpha$ -1 [da 2,8 a 9,7 g/L, in confronto con un intervallo di riferimento di 2,5-5,1 g/L (4)]. L'analisi statistica e grafica dei dati di confronto rivela una associazione significativa tra le due grandezze ( $r = 0,903$ ), nonostante la considerevole dispersione dei singoli punti intorno alla retta di regressione ( $S_{yx} = 0,76$  g/L) e gli ampi "limiti di accordo" per le differenze individuali (media  $\pm 2SD$ : da 0,94 g/L a 3,82 g/L) (13). L'intercetta nell'analisi di regressione (+ 2,04 g/L) e la differenza media (+ 2,38

g/L) concordano nell'indicare che AAT e AAG contribuiscono solo parzialmente alla zona  $\alpha$ -1. Estrapolando i nostri dati a valori zero di concentrazione di AAT e AAG sembra che la CZE misuri ancora una zona  $\alpha$ -1 di circa 2,2 g/L. Inoltre, ad una zona  $\alpha$ -1 di 3,7 g/L (mediana della distribuzione di riferimento) (4) la somma AAT + AAG ricavata dalla retta di regressione è di 1,5 g/L, ossia meno della metà della zona della CZE. Dall'equazione di regressione in un recente lavoro (20), sembra che a concentrazione immunochimica di AAT e AAG pari a 0 (zero) ci siano considerevoli segnali della CZE ai due picchi della zona  $\alpha$ -1, corrispondenti approssimativamente a 1,7 e 3,0 g/L di AAT e AAG, rispettivamente. Tali picchi sono compatibili con i nostri valori di 2,2 g/L per la zona  $\alpha$ -1 a concentrazione 0 di AAT+AAG, se si tengono in considerazione le differenze dei disegni sperimentali e l'incertezza dell'estrapolazione. Una differenza simile tra la zona 1 della CZE e la somma immunochimica di AAT+AAG è stata osservata in una serie di campioni di siero esprimenti una variazione del gene AAT e caratterizzata da bassi livelli (<4,0 g/L) di zona  $\alpha$ -1 (21).

Studiare le cause che rendono la zona  $\alpha$ -1 maggiore della somma AAT+AAG esulava dagli scopi del nostro lavoro. In termini ipotetici potremmo tuttavia suggerire che le lipoproteine (HDL ?) siano responsabili di tale situazione. Le lipoproteine potrebbero contribuire al picco CZE non solo per l'assorbimento a 214 nm della loro porzione proteica, ma anche attraverso l'attenuazione del raggio dovuto a fenomeni di "light scattering". Valori più alti dei coefficienti di assorbimento della AAT, rispetto a quelli dell'albumina, potrebbero contribuire significativamente alla sovrastima della zona  $\alpha$ -1 da parte della CZE. In questo caso, però, ci saremmo aspettati un maggiore errore pro-portionale, mentre l'analisi statistica mostra essere maggiormente rilevante la componente costante dell'errore sistematico (intercetta). Comunque, i nostri dati mostrano che le variazioni della zona  $\alpha$ -1 rispecchiano quelle della somma AAT + AAG per un ampio intervallo di valori normali ed elevati. La zona CZE può quindi essere considerata un effettivo indicatore di flogosi, e della sua variazione nel tempo, come lo sono le proteine specifiche. Nella serie di 114 campioni di siero i valori di concentrazione di AAT e AAG erano tra loro correlati significativamente, nonostante una debole associazione ( $r = 0,779$ , dati non mostrati).

Un particolare problema nella misura della AAT è la determinazione dei portatori di una mutazione del gene AAT associata a malattie polmonari. Il nostro gruppo di campioni è stato selezionato in modo da includere le principali situazioni caratterizzate da incrementi dei valori di  $\alpha$ -1-globulina, come marcatore di infiammazione. Solo pochi (3 su 114) campioni del gruppo avevano valori di AAT lievemente più bassi rispetto al limite inferiore dell'intervallo di riferimento (0,9 g/L), e nessuno mostrava i bassi valori di concentrazione di AAT correlati con i genotipi SZ o ZZ, associati ad un aumentata frequenza di malattia polmonare (21-22). La possibilità di determinare mutazioni del gene AAT mediante un'analisi in CZE è stata esclusa

(4, 21), oppure è stata dimostrata utilizzando speciali manipolazioni elettroniche dei profili di separazione CZE, includenti l'analisi separate delle due componenti principali (AAT e AAG) della zona  $\alpha$ -1 (20).

In conclusione la elettroforesi capillare zonale permette misure clinicamente accettabili dell'albumina del siero, se sono esclusi i valori estremi (all'intervallo 25-60 g/L). La misura della zona  $\alpha$ -1 fornisce sistematicamente valori più alti della somma delle due componenti principali di questa zona, ma i valori misurati risultano correlati a tale somma. Nelle patologie specifiche associate alle variazioni dell'albumina del siero o delle proteine di fase acuta (AAT e AAG), le misure in CZE delle zone maggiori potrebbero quindi dare informazioni sostanzialmente equivalenti alle misure immunochimiche delle proteine specifiche. Queste osservazioni sostengono l'ipotesi che l'analisi mediante CZE delle proteine del siero possa rappresentare una fase di screening rapida e potente, in vista di conclusioni diagnostiche od ai fini della sorveglianza del paziente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Jenkins MA, Guerin MD. Quantification of serum proteins using capillary electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 1995;32:493-97.
2. Katzmann JA, Clark R, Sanders E, Landers JP, Kyle RA. Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. *Am J Clin Pathol* 1998;110:503-9.
3. Bienvenu J, Graziani MS, Arpin F, Bernon H, Blessum C, Marchetti C, et al. Multicenter evaluation of the Paragon CZE™ 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing. *Clin Chem* 1998;44:599-605.
4. Bossuyt X, Schiettekatte G, Bogaerts A, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system. *Clin Chem* 1998;44:749-59.
5. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/subtraction. *Clin Chem* 1998;44:760-4.
6. Bossuyt X, Marien G. False-negative results in detection of monoclonal proteins by capillary zone electrophoresis: a prospective study. *Clin Chem* 2001;47:1477-9.
7. Jonsson M, Carlson J, Jeppsson J-O, Simonsson P. Computer-supported detection of M-components and evaluation of immunoglobulins after capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2001;47:110-7.
8. Petri C, Alessio MG, Scapellato L, Brambilla S, Franzini C. Serum proteins by capillary zone electrophoresis: approaches to the definition of reference values. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:975-80.
9. Bossuyt X, Claeys R, Bogaert G, Said H, Wouters C, Groven C, et al. Reference values for the five electrophoretic serum protein fractions in caucasian children by capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:970-2.
10. Wijnen PAHM, van Dieijn-Visser MP. Capillary electrophoresis of serum proteins. Reproducibility, comparison with agarose gel electrophoresis and a review of the literature. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:535-45.
11. Luraschi P, Infusino I, Brambilla S, Franzini C. Serum albumin by capillary zone electrophoresis compared with immunochemical and dye-binding measurements [Abstract]. *Clin Chem Lab Med* 2001;39 (special suppl.):S347.
12. Luraschi P, Brambilla S, Franzini C. Alpha $\alpha$ -1 globulin by capillary zone electrophoresis versus immunochemical measurement of alpha $\alpha$ -1 antitrypsin and al-phax-1 acid glycoprotein [Abstract]. *Clin Chem Lab Med* 2001;39 (special suppl.):S347.
13. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996;33:1-4.
14. Dati F, Schumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material (CRM 470). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:517-20.
15. Ottomano C, Amboni P, Varnocchi A, Cattozzo G, Franzini C. Misura della concentrazione della albumina del siero: differenti approcci statistici applicati al confronto intermetodi. *Biochim Clin* 2002;26:81-5.
16. Fraser CG. Desirable performance standards for clinical chemistry tests. *Adv Clin Chem* 1983;23:299-339.
17. Juan-Pereira L, Fuentes-Arderiu X. Intra-individual variation of the electrophoretic serum protein fractions. *Clin Chem* 1989;35:1544.
18. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
19. Thomson D, Milford-Ward A, Whicher JT. The value of acute phase protein measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 1992;29:123-31.
20. Jonsson M, Carlson J. Computer-supported interpretation of protein profiles after capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2002;48:1084-93.
21. Gonzalez-Sagrado M, Lopez-Hernandez S, Martin-Gil FJ, Tasende J, Banuelos MC, Fernandez-Garcia N, et al. Alpha $\alpha$ 1-antitrypsin deficiencies masked by a clinical capillary electrophoresis system (CZE 2000). *Clin Biochem* 2000;33:79-80.
22. Dahl M, Nordestgaard BG, Lange P, Vestbo J, Tybjaerg-Hansen A. Molecular diagnosis of intermediate and severe  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: MZ individuals with chronic obstructive pulmonary disease may have lower lung function than MM individuals. *Clin Chem* 2001;47:56-62.