

# Přesnost a porovnatelnost automatizovaného měření elektroforetických frakcí proteinů v séru systémem Paragon CZE 2000 Beckman

Friedecký B., Vávrová J.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

## SOUHRN

**Cíl:** Kvantifikovat přesnost, systematické diference a nejistotu měření frakcí proteinů v krevním séru přístrojem CZE Paragon 2000.

**Výsledky:** Hodnoty opakovatelnosti – reprodukovatelnosti (kvantifikované jako variační koeficienty) byly tyto: albumin 0,6–0,7 %, alfa-1-globulin 2,8–3,5 %, alfa-2-globulin 1,9–2,3 %, betaglobulin 3,5–5,1 %, gamaglobulin 1,6–2,7 %.

Systematické diference mezi kapilární zónovou elektroforézou (CZE) a agarózovou metodou (AGE) byly následující: u albuminu, alfa-2-globulinu a gamaglobulinu v rozsahu 2–5 %, u betaglobulinu cca 18 % a u alfa-1-globulinu 122 %.

U albuminu se na systematické chybě měření podílejí obě (konstantní a proporcionální) složky. Při měření alfa-1-globulinu a alfa-2-globulinu se na systematických diferencích podílí zejména konstantní složka, u beta globulinu proporcionální složky. Hodnoty kombinovaných rozšířených nejistot výsledků měření byly odhadnuty na 1,3 % pro albumin, 7,1 % u alfa-1-globulinu, 4,8 % u alfa-2-globulinu, 10,0 % pro betaglobulin a 5,8 % pro gamaglobulin. Jsou uvedena vybraná data o referenčních intervalech a konstatovány významné rozdíly mezi nimi.

**Závěry:** Jde o velmi rychlou, efektivní a také přesnou metodu s dostatečně nízkou nejistotou výsledků měření. Systematické diference této metody od standardní agarózové elektroforézy ovšem vyžadují ustanovení zcela nových referenčních intervalů.

**Klíčová slova:** CZE elektroforéza, AGE elektroforéza, Paragon 2000, přesnost, diference, nejistota.

## SUMMARY

**Friedecký B., Vávrová J.: Precision, Bias, Comparability and Uncertainty of Protein Measurement by CZE Paragon 2000**

**Objectives:** Precision, bias, comparability and uncertainty in CZE Paragon 2000 measurement of serum protein fractions.

**Results:** Repeatability (expressed as CV) was: 0.6% (albumin), 2.8% (alpha-1-globulin), 1.9% (alpha-2-globulin), 3.5% (beta globulin), 1.6% (gamma globulin).

Reproducibility (also expressed as CV) has been: 0.7% (albumin), 3.5% (alpha-1-globulin), 2.3% (alpha-1-globulin), 5.1% (beta-globulin), 2.7% (gamma-globulin).

Bias values of albumin, alpha-2-globulin and gamma-globulin ranged in interval 2–5 %, while bias of beta-globulin reached 18 % and even 122 % of bias for alpha-1-globulin. AGE method was used for comparison. Both constant and proportional parts of systematic errors participated in measurement of albumin, constant parts dominated in alpha-1-globulin and alpha-2-globulin, while proportional systematic error was typical for beta globulin.

Combined expanded uncertainty ( $k = 2$ ) was as follows: albumin 1.3 %, alpha-1-globulin 7.1 %, alpha-2-globulin 4.8 %, beta-globulin 10 %, gamma-globulin 5.8 %.

**Conclusions:** CZE Paragon 2000 is very effective, quick and namely precise method, with very well accepted level of uncertainty. However large systematic differences from usually used older electrophoresis techniques required establishment of new reference intervals.

**Key words:** CZE electrophoresis, AGE electrophoresis, Paragon 2000, precision, differences, uncertainty.

## Úvod

Z metody – ještě nedávno považované za jeden z vrcholů analytické měřicí technologie s exkluzivním určením pro pracoviště vědeckého a výzkumného charakteru – se v současné době stal navíc také nástroj rychlého, rutinního, vysokokapacitního a prakticky zcela automatizovaného měření proteinových frakcí krevního séra. Předkládáme výsledky verifikace přesnosti, srovnatelnosti, vychýlení a nejistoty dosažené měřením na automatickém analyzátoru Paragon CZE 2000 Beckman.

Metoda agarózové gelové elektroforézy (AGE), realizovaná měřicím systémem Hydrasys Sebia, byla použita jako srovnávací metoda.

## Materiál a metody

Čerstvě odebrané vzorky sér pacientů, u nichž bylo ošetřujícími lékaři požadováno vyšetření elektroforetických frakcí proteinů v séru, byly paralelně měřeny na rutinně používaném systému Hydrasys Sebia (agarózová gelová elektroforéza – AGE) a na testovaném přístroji Paragon CZE 2000 Beckman, který pracuje na principu kapilární zónové elektroforézy (CZE). Při měření bylo postupováno podle analytické SOP (Hydrasys Sebia) a podle pracovní dokumentace výrobce (Paragon, Beckman). Fotometrická měření koncentrace albuminu byla provedena na přístroji Modular (Roche) s použitím diagnostických kitů Roche pracujících na principu reakce s bromkresolovou zelení (BCG).

Ke statistickému hodnocení výsledků bylo použito programu MedCalc (Belgie).

## Výsledky

V tabulce 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty opakovatelnosti dosažené souběžným měřením na všech sedmi kapilárách. Hodnoty opakovatelnosti jsou velmi příznivé a indikují značně dobrou úroveň dávkování vzorků do kapilár. Navíc jsou excelentně srovnatelné s literárními daty autorů, kteří testovali identický měřicí systém před námi. Reprodukovatelnost měření (mezi sériemi) je uvedena v tabulce 2 a je opět srovnána s literárními daty. Není pochyb, že přesnost měření je vynikající a že literární data bylo možné v plném rozsahu potvrdit (1, 2). Data tabulek 1, 2 jasně ukazují, že přesnost měření proteinových frakcí není pro přístroj Paragon problémem. Data tabulky 3, která shrnují systematické difference mezi principiálně novým postupem CZE a standardní agarózovou elektroforézou (AGE), ukazují jasně systematické difference dosahující v případě be-

**Table 1.** Repeatability of measurement on the Paragon CZE 2000

Fraction	Our study	Bossuyt et al. CV (%)	Bienvenu et al.
Albumin	0.6	0.7	0.7
A1G	2.8	4.1	3.5
A2G	1.9	2.4	2.5
BG	3.5	2.6	3.0
GG	1.6	1.8	1.4

Calculated from 18 measurements and 7 capillaries (N = 126) and compared with basic literature data sources.

Note: A1G = alpha-1-globulin, A2G = alpha-2-globulin, BG = beta-globulin, GG = gamma-globulin

**Table 2.** Reproducibility of measurement between two series (9 samples, 7 capillaries, 2 series)

Fraction	Our study CV (%)	Bossuyt et al. CV (%)	Bienvenu et al. CV (%)
Albumin	0.6	0.6	1.5
A1G	3.5	4.2	5.5
A2G	2.3	3.3	5.6
BG	5.1	2.9	4.5
GG	2.7	1.7	2.8

Compared to basic literature data.

**Table 3.** Systematic differences between Paragon CZE 2000 and Hydrasys Sebia AGE (agarose gel) estimated from Passing-Bablok regression

Fraction	Bias (%)
Albumin	-2.2
A1G	+122
A2G	+1.8
BG	-18.2
GG	-5.0

Bias assessed as difference of CZE 2000 from Hydrasys Sebia AGE method. 76 samples were used.

taglobulinů numerické velikosti 2 řádů a v případě alfa-1-globulinů dokonce 3 řádů. Data tabulky 4 byla získána regresní analýzou podle Passinga-Babloka. Z hodnot úseků a směrnic lze předpokládat při měření alfa-globulinových frakcí převažující vliv konstantní složky systematické difference se srovnávací AGE metodou, u beta-globulinové frakce je to dominující vliv proporcionální složky a u albuminu kombinovaný vliv obou složek.

**Table 4.** Slope and intercept values obtained by comparison of Paragon CZE 2000 and Hydrasys Sebia AGE by using Passing-Bablok regression

Fraction	Slope (mean)	95% CI	Intercept (mean)	95% CI
Albumin	1.13	0.97–1.28	-8.8	-17.8 to 0.6
A1G	2.75	2.00–3.70	-1.6	-4.2 to 0.5
A2G	1.29	1.00–1.68	-3.0	-7.3 to 0.1
BG	1.00	0.80–1.25	-2.0	-4.7 to 0.1
GG	0.98	0.90–1.07	-0.4	-2.0 to 0.8

V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty kombinovaných rozšířených nejistot, které byly odhadnuty z reprodukovatelnosti měření a z rozptylů diferencí průměrů měření jednotlivých kapilár. Je zřejmé, že takto kalkulované nejistoty jsou v podstatě rovné dvojnásobkům hodnot reprodukovatelnosti, takže je velmi pravděpodobné, že nejistotu výsledků lze dobře odhadnout pouhým sledováním dlouhodobé přesnosti měření.

**Table 5.** Estimation of combined uncertainty of results of the measurements of the CZE Paragon 2000

Fraction	Uc (k = 2) (%)
Albumin	1.3
A1G	7.1
A2G	4.8
BG	10.0
GG	5.8

Estimated as combination of reproducibility and variability of systematic differences between individual capillaries.

V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty systematických chyb měření albuminu mezi oběma elektroforetickými metodami a fotometrickou metodou. Je zřejmé, že fotometrická metoda, která se nevyznačuje velkou analytickou specifičností, poskytuje systematicky vyšší výsledky.

**Table 6.** Systematic differences between photometry and electrophoresis in albumin measurements (comparison methods), obtained by Bland-Altman difference diagram

Comparison method	Bias [g/l]	95% confidence interval
Sebia (AGE)	+0.9	-2.5 to 4.3
Paragon (CZE)	+3.1	-4.0 to 10.1

Signifikantní systematické difference mezi oběma metodami jsou logicky příčinou diferencí mezi velikostmi referenčních intervalů. Data několika studií, které se

zabývaly stanovením referenčních intervalů systémem Paragon 2000, jsou uvedena v tabulce 7. Ani shoda mezi nimi není – navzdory použití identického měřicího systému – zdaleka ideální (1, 2, 3).

**Table 7.** Selected data on the reference intervals for serum protein fractions determined by Paragon CZE 2000

Fraction	Bossuyt	Bienvenu	Petrini	Manufacturer
Albumin	55.7–70.2	46.7–67.5	53.9–67.9	54.7–68.7
A1G	3.6–7.4	4.2–10.9	3.7–8.8	3.7–7.8
A2G	4.9–9.7	4.2–10.9	5.5–11.7	5.2–10.7
BG	8.0–12.7	8.2–15.4	8.5–13.8	8.6–13.7
GG	7.9–18.3	6.9–26.2	10.0–20.3	10.6–19.5

Introduced as 2.5–97.5 percentile (%)

Na grafu 1 je typický záznam elektroforetické separace proteinových frakcí patientského séra získaný systémem Paragon CZE 2000. Graf 2 ukazuje porovnání výsledků Paragon CZE 2000 a Hydrasys Sebia AGE regresní analýzou podle Passinga-Babloka.

## Diskuse

Metoda CZE Paragon 2000 stanovuje frakce proteinů v séru nejen velmi rychle, ale s vysokou přesností, svědčící pro velmi dobrou úroveň nástřiku vzorků na kapiláry. Výsledky měření nejsou významně ovlivněné ani pozicí vzorku v analyzátoru, neboť nejsou závislé na tom, na které ze sedmi kapilár jsou separace a kvantifikace provedeny.

Problémy jsou se vzájemnou porovnatelností metod CZE a AGE. Systematické difference mezi CZE a AGE si vynucují rozdílnou klinickou interpretaci, zejména alfa-1 a betaglobulinu, samozřejmě včetně zcela nových hodnot referenčních intervalů. Vysoká pracovní kapacita zařízení CZE Paragon 2000 představuje velkou možnost zvýšení efektivity měření, zejména pro větší laboratoře.

V případě albuminu, jehož koncentrace se obvykle měří fotometrickou metodou, jsme pozorovali viditelné

systematické difference, a to v průměru 0,9 g/l u metody AGE (Sebia) a dokonce 3,1 g/l v případě srovnání s CZE (Paragon).

95% interval systematické chyby mezi fotometrickou metodou a kapilární zónovou elektroforézou převyšuje hodnotu kontrolního limitu používanou v programu externího hodnocení kvality.

Přítomnost systematických diferencí není – vzhledem k rozdílným principům měření – překvapující. Tyto difference nikterak hodnotu metody CZE *a priori* neomezují, protože postupy využívající dělení na acetátcelulózy a agarózových nosičích nelze v žádném případě považovat za referenční.

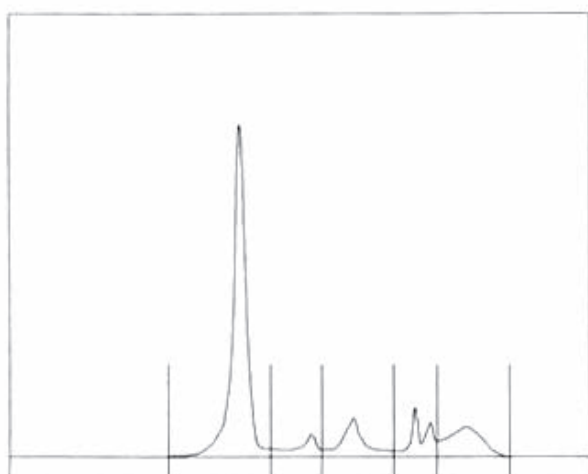
Naopak na druhé straně od lépe fyzikálně definovaného principu separace metodou CZE lze očekávat schopnost podstatně správnějšího výsledku separace jednotlivých frakcí.

Kupříkladu zvýšené hodnoty alfa-1-globulinu, kde jsou nejvyšší difference mezi CZE a AGE, lze vysvětlit faktem, že vysoký obsah kyseliny sialové ve dvou hlavních složkách této frakce alfa-1-glykoproteinu a alfa<sub>1</sub>-antitrypsinu značně snižuje jejich reaktivitu s příslušnými barvivy (princip měření koncentrace proteinů u AGE metody), nikoliv však absorpci záření o vlnové délce 214 nm (což je princip měření obsahu proteinů u metody CZE).

## Závěr

Oprávněně se lze domnívat, že metoda CZE – zejména v kombinaci s imunofixací – reprezentuje budoucnost hodnocení proteinových frakcí krevního séra, respektive už přítomnost tohoto stanovení ve velkých zdravotnických zařízeních.

Stanovení spolehlivých a obecně akceptovatelných hodnot referenčních intervalů představuje jednu z významných výzev současné laboratorní diagnostiky nejen v případě elektroforézy sérových proteinů. Tento problém není dořešený na dostatečné úrovni ani výrobci analytické technologie, ani jejími uživateli, a dokonce ani ne normami procesů řízení kvality.



Fraction	Rel %	g/L	
ALBUMIN	59.5		
ALPHA1	6.1		
ALPHA2	11.4		
BETA	9.3		
GAMMA	13.7		

### Reference Ranges

	Rel %	g/L
ALBUMIN	56.0–70.0	0.00–0.00
ALPHA1	3.1–8.8	0.00–0.00
ALPHA2	5.5–11.7	0.00–0.00
BETA	8.5–13.8	0.00–0.00
GAMMA	8.0–19.0	0.00–0.00

TP: 0.00–0.00 A/G: 0.00–0.00

**Fig. 1.** Demonstration of electrophoretic patterns obtained by CZE Paragon 2000

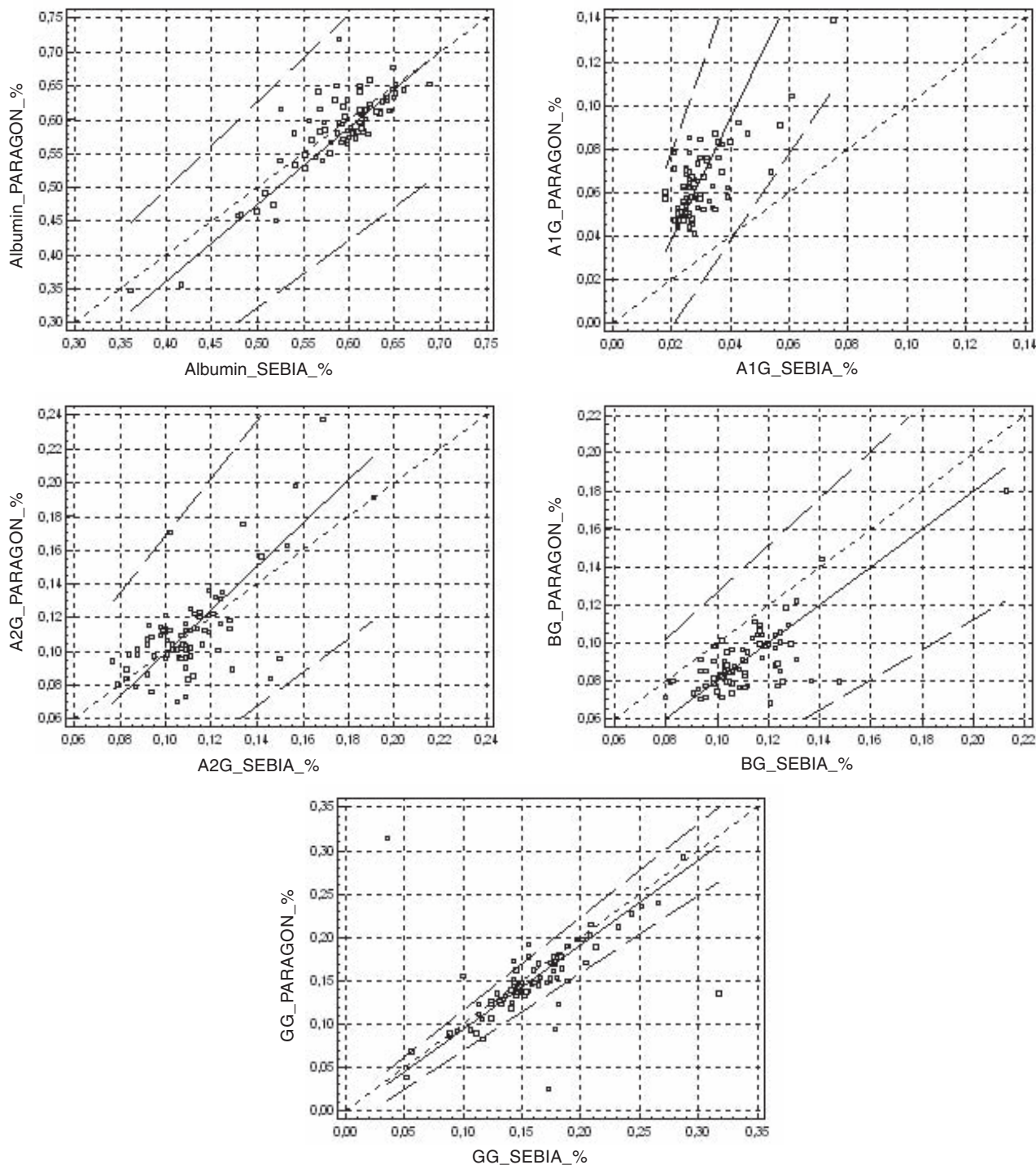


Fig. 2. Comparison of two electrophoresis methods by Passing-Bablok regression

## Literatura

1. **Biennu, J., Graziani, M. S., Arpin, F., Bernon, H., Blessum, 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, p. 599–605.
2. **Bossuyt, X., Schiettekatte, G., Bogaerts, A., Blanckaert, N.** Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system. *Clin. Chem.*, 1998, 44, p. 749–759.
3. **Petrini, C., Alessio, M. G., Scapellato, L., Brambilla, S., Franzini, C.** Serum proteins by capillary zone electrophoresis: Approaches to definition of reference values. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999, 37, p. 975–980.

Do redakce došlo 23. 9. 2004.

Adresa pro korespondenci:  
 RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.  
 ÚKBD LF a FN, Sokolská 581,  
 500 05 Hradec Králové