

Talasemi taramasında Agilent 1100 (Chromsystems) ve Tosoh HLC-723 G8 HPLC sistemlerinin karşılaştırılması

[Comparison of Agilent 1100 (Chromsystems) and Tosoh HLC-723 G8 HPLC systems in thalassemia screening]

Hamit Yaşar Ellidağ¹,
Esin Eren²,
Özgür Aydın³,
Fatma Demet Arslan İnce⁴,
İbrahim Gök¹,
Necat Yılmaz¹

¹Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Antalya

²Antalya Atatürk Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Antalya

³Batman Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi, Batman

⁴İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, İzmir

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Dr. Hamit Yaşar Ellidağ

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Biyokimya Bölümü, 7100 Antalya, Türkiye

Telefon: +90 242 2494400

E-posta: hayael1980@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Günümüzde değişik marka ve modelde HPLC (High Performance Liquid Chromatography) sistemleri talasemi taraması için kullanılmakta fakat bu cihazların birbiri ile olan uyumu bilinmemektedir. Bu amaçla, biz bu çalışmada chromsystems kolon ve kitlerini kullanarak Agilent 1100 marka HPLC cihazı ile yeni geliştirilen Tosoh HLC 723 G8 marka HPLC cihazını talasemi taraması bakımından birbirleri ile olan uyumu araştırdık.

Metod: Talasemi taraması yapılan 32'si erkek, 47'si kadın toplam 79 kişi prospektif olarak çalışmaya alındı. Her iki cihazda tek seferde çalışılan hemoglobin A2 (HbA2) değerleri için istatistiksel uyum, iki-yönlü rasgele sınıfıçı korelasyon katsayısı (SKK), Cohen's kappa katsayısı, korelasyon katsayısı (r) ve regresyon analizi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Analiz sonucunda örneklerin 26'sı (%32.9) β-talasemi taşıyıcısı, 29'u (%36.7) anemik ve 24'ü (%30.3) normal olarak saptandı. HbA2 değerleri için $r=0.902$, $SKK=0.831$ ($p<0.0001$) olarak bulundu. Yapılan regresyon analizinde HbA2 için $Y=0.915+0.559X$ ($p<0.0001$) olarak bulundu. Bununla birlikte, Cohen's Kappa katsayısı 1 olarak bulundu.

Sonuç: Korelasyon regresyon ve diğer istatistiksel analizlere göre iki cihazın HbA2 değerleri arasındaki uyum yetersizdir. Bununla birlikte, kesim noktası dikkate alındığında her iki sistemde çalışma grubundaki talasemi taşıyıcılarının ayırımını yapmıştır.

Anahtar Kelimeler: Agilent 1100, hemoglobinopati, HPLC, Tosoh HLC 723 G8, yöntem karşılaştırma

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması yoktur.

ABSTRACT

Objective: Today, different models and trademarks of HPLC (High Performance Liquid Chromatography) equipment have been used in screening for thalassemia. However, the agreement of the results of the analyses performed by these types of equipment are unknown. In this study, the aim was to investigate the agreement between the results of the analyses of thalassemia screening performed in two sets of HPLC equipment with the Agilent 100 (Chromsystems) and the new analyzer Tosoh HLC 723 G8 trademarks.

Methods: This prospective study was included in 79 (32 males and 47 females) individuals performed thalassemia screening. Statistical correlations of hemoglobin A2 (HbA2) values, analyzed in each analyzer as a single analysis from each sample were evaluated using two-way random intraclass correlation coefficient (ICC), Cohen's kappa coefficient, correlation coefficient (r) and regression analysis.

Results: As a result of the analysis, 26 of the samples (32.9%) were detected as β-thalassemia carrier, 29 (36.7%) were diagnosed as anemic and 24 (30.3%) were detected to be normal. Correlation coefficients HbA2 values were found to be as $r=0.902$, $ICC=0.831$ ($p<0.0001$). Regression analysis for HbA2 values were found to be as $Y=0.915+0.559X$ ($p<0.0001$). However, Cohen's kappa statistics were calculated as 1.

Conclusion: According to the regression, correlation and other statistics analysis, agreement between the results HbA2 values measured in the two analyzers are found to be insufficient. However, considering the cutoff values, separation of thalassemia carriers were achieved in both systems.

Key Words: Agilent 1100, Hemoglobinopathy, HPLC, Tosoh HLC 723 G8, Method comparison

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Giriş

Talasemi, hemoglobin yapısında bulunan globin zincirlerinin biri ya da daha fazlasının üretiminde azlığı veya yokluğu ile karakterize olan hemoglobin sentezinin otozomal resesif kalıtsal bir grup hastalığıdır. Dünyada en yaygın genetik hastalar arasındadır ve dünya nüfusunun yaklaşık %1.5 β -talasemi taşıyıcısıdır. Diğer bir grup hemoglobinin yapısal değişiklikleri ise hemoglobin moleküllerinin globin zincirlerindeki özel bir bölgede aminoasitlerin bir veya daha fazlasının yer değiştirmesinden oluşur [1,2].

Gerek talasemi ve gerekse diğer hemoglobinopatilerin tanısı ve taramasında hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve değerlendirilmesi temel esastır [3]. Günümüzde hemoglobin alt tiplerinin ayrımı için selüloz asetat elektroforezi, kromatografik mikro-kolonlar, immünifiksasyon elektroforezi, kapiller elektroforez ve katyon değiştirici HPLC kullanılan metotlar arasındadır [4]. HPLC, hemoglobin A2 (HbA2), hemoglobin F (HbF), hemoglobin A0 (HbA0) ve bunun yanında hemoglobin S (HbS), hemoglobin C (HbC), vb. patolojik hemoglobin varyantlarını ayırmada güvenilir ve yaygın kullanılan bir yöntemdir [5,6]. Hem HPLC hem de diğer metotları kullanarak hemoglobin alt tiplerini tanımlamak zahmetli ve zor bir süreçtir, bundan dolayı bu metotların kullanılması eğitilmiş ve uzman personel gerektirir [4].

Hangi yöntem kullanılırsa kullanılırsın β -talasemi taşıyıcılarını saptamada HbA2 değerleri çok önemlidir. β -talasemi taşıyıcılarının tanısında, kullanılan metoda bağlı olarak %3.5 ile %4 arasında değişen oranlarda yükselmiş HbA2 değerlerine rastlanır [7]. β -talasemi ve diğer hemoglobinopati tarama ve tanısında genel olarak izlenen yol; hemoglobin, hematokrit ve diğer eritrosit endekslerinin tespiti, HbA2 analizini de içeren hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve sonunda kesin tanı için DNA analizini kapsar [4,8].

Günümüzde sürekli gelişen tıp teknolojileri değişik marka ve modelde cihazları tıp laboratuvarlarının kullanımına sunmaktadır. Bu cihazların birbiri ile uyumunu araştırmak ise ilgili uzmanlar için bir sıkıntıdır. Bu nedenle biz bu çalışmada; Chromsystems (Chromsystems, Instruments and Chemicals, München-Germany) reaktifleri kullanarak Agilent 1100 (Agilent Technologies, Germany) marka HPLC cihazı ile yeni geliştirilen Tosoh HLC 723 G8 (Tosoh Bioscience, Japan) kit ve HPLC cihazını talasemi taraması bakımından önemli olan HbA2 açısından karşılaştırmayı hedefledik.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Antalya Eğitim ve Araştırma hastanesi merkez laboratuvarı biyokimya bölümüne 15 Ocak -15 Mart 2012 tarihleri arasında talasemi taraması için başvuran 32'si erkek, 47'i kadın toplam 79 kişi prospektif olarak alındı. Bu kişilerin antekübital venlerinden EDTA'lı (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) tüplere kan örnekleri alındı. Alınan bu örnekler her iki cihazda da tek seferde çalışıldı ve sonuç-

lar kaydedildi. Hastaların eritrosit endeksleri Sysmex xt-2000i (Roche Diagnostics, Japan) cihazında ölçüldü.

Agilent 1100 cihazında Chromsystems marka iyon değiştirici HPLC kolonu ve mobil faz olarak yine bu markanın tamponlarını kullandık. Bu sistemde analiz öncesi tam kandan, hemolysis kiti ile hemolizat hazırlanır. Cihaz tarafından bu hemolizatın 10 μ l'si, akış hızı 1.5 ml/dk olacak şekilde, kolon içine oda sıcaklığında pompalanır. Daha sonra her bir eluat 415 nm'de UV dedektör ile miktarı saptanarak kromatogram çizilir.

Tosoh HLC 723 G8 cihazında Tosoh marka iyon değiştirici HPLC kolonu ve tamponu kullanıldı. Bu cihaz çalışılan numuneye önceden herhangi bir işlem gerektirmeyen örnek dilüsyonunu ve hemolizini otomatik yapan HPLC sistemidir. Cihaz 4 μ l numuneyi akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde kolon içine oda sıcaklığında pompalar ve oluşan her bir eluatı 415 nm'de LED fotometri ile saptayarak kromatogram çizer.

Genel olarak HPLC sistemleri ile hemoglobinin alt tiplerinin ayrılması

Tosoh HLC 723 G8 ve Agilent 1100 cihazlarında hemoglobin alt tiplerinin kantitatif ayrılması genel olarak şöyle özetlenebilir. Dilüe ve hemoliz edilmiş örnekler, özel filtrelerden geçirilir ve kolon içine belirli bir basınçta pompalanır. Kolon içinde hemoglobin proteinlerinin net yükleri ile kolondaki resin yükleri birbirleriyle etkileşime girerler. İlk adımda, eluat-1 için analiz başlayacağı zaman kolon içine diğer tamponlara göre düşük iyonik güçte (düşük pH ve tuz konsantrasyonunda) solüsyon pompalanır. Bu solüsyon HbF gibi zayıf bağlı molekülleri kolon üzerindeki resinden ayırır. İkinci adımda ise kolonun içine ikinci solüsyon pompalanır. Bu solüsyon HbA0 ve HbA2 gibi resine daha güçlü bağlanan hemoglobin alt tiplerini resinden söker. Daha sonraki adımlarda ise daha alkali pH ve yüksek tuz konsantrasyonlardaki solüsyon kolona pompalanarak resine çok daha güçlü bağlanan diğer hemoglobin alt tiplerini resinden söker. Kolondan çıkan elüatlardaki hemoglobin alt tiplerini dedektörler saptar ve buna bağlı olarak kromatogramlar elde edilir.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için Tosoh HLC 723 G8 ve Agilent 1100 HPLC sistemlerinden elde edilen HbA2 değerleri ortalama \pm standart sapma olarak kaydedildi. Elde edilen sonuçlar için, t test, tek yönlü varyans analizi, istatistiksel uyum için ise; korelasyon, regresyon analizleri, sınıfıçı korelasyon katsayısı (SKK) ve Cohen's kappa katsayısı kullanıldı [9]. Analizler SPSS 15.0 ve MedCalc 11.0 paket programları ile yapıldı. İki cihazdan alınan ölçümler için Youden ve Bland & Altman [10] grafiği oluşturuldu. Youden grafiği bir cihazdan elde edilen sonuçların X eksenine, diğer cihazdan elde edilen sonuçların Y eksenine yazılmasıyla oluşturulur. Bu grafikte normal ve patolojik sonuçların aynı alanda toplanması incelenir. Bland & Altman grafiğinde ise; ilk önce her iki cihazdan elde edilen sonuçların ortalaması bulunur, bu ortalamaların farkla-

Tablo 1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımları, yaş (ortalama±standart sapma) eritrosit indeksleri (ortalama±standart sapma) ve referans aralıkları tabloda gösterilmiştir

	Cinsiyet(n)	Yaş	Hemoglobin	Hematokrik	OEH	OEHB
			Erkek:14-18 g/dl Kadın:12-16 g/dl	Erkek:38-50% Kadın:34-44%	78-93 um ³	25-32 pg
Taşıyıcı	Erkek (9)	31.12±15.55	11.33±1.98	35.29±5.57	61.02±2.69	19.61±1.13
	Kadın (17)	26.39±19.1	10.26±0.64	32.88±2.12	61.15±3.68	19.10±1.13
Anemik	Erkek (8)	20.62±20.5	10.78±0.42	34.61±1.06	66.43±19.8	20.66±6.65
	Kadın (21)	34.33±18.38	10.33±0.14	34.04±1.27	73.1±3.04	23.13±2.26
Normal	Erkek (15)	20.87±26.16	14.13±1.55	42.49±7.35	84.61±12.59	28.56±2.40
	Kadın (9)	22.88±14.85	12.9±0.85	39.67±4.45	82.07±10.18	25.94±2.05
	P	0.285	0.01	0.01	<0.001	<0.001

Gruplar arasında yapılan tek yönlü varyans analizinde hastaların yaş ortalamaları arasında anlamlı farklılık yokken eritrosit endeksleri arasında anlamlı farklılık var. OEH: Ortalama Eritrosit Hacmi; OEHB: Ortalama Eritrosit Hemoglobini.

Tablo 2. Her iki cihazda ölçülen HbA2 değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları gösterilmiştir

	Agilent 1100 (chromsystems)	Tosoh HLC 723 G8
	HbA2 (1.7-3.3)*	HbA2 (2.0-3.5)*
Taşıyıcı (26)	4.1±0.4	5.7±0.7
Normal+Anemik (53)	2.2±0.3	2.5±0.5
P	<0.0001	<0.0001

*Referans aralıklar, Student's t test kullanılmıştır.

rı alınır ve güven aralıklar ile birlikte grafiğe işaretlenir. Sonra cihazlardan alınan her bir sonucun farkı bu grafikte işaretlenir. Ortalamalar fark çizgisinin sıfıra ne kadar yakın ve her bir farkın bu çizgiye yakınlığı incelenir.

Bulgular

Elde edilen numunelerin her iki cihazda da çalışması sonucunda örneklerin 26'sı (%32.9) β-talasemi taşıyıcısı, 29'u (%36.7) anemik ve 24'ü (%30.3) normal olarak saptandı. Bu kişilerin yaş, cinsiyet ve eritrosit endeksleri Tablo 1'de verilmiştir.

Her iki HPLC cihazında ölçülen HbA2 değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 2'de verilmiştir.

Tosoh HLC 723 G8 ve Agilent 1100 HPLC (chromsystems) sistemleri ile ölçülen HbA2 değerleri için korelasyon katsayısı, regresyon analizi, sınıfıçı korelasyon katsayısı (iki-yönlü rasgele) ve Cohen' kapa katsayısı Tablo 3'te, regresyon, youden ve Bland-Altman grafikleri ise Şekil 1 verilmiştir.

Çalışmamızda talasemi taramasının pozitifliği için üretici firmaların verdiği kesim noktası kullanılmıştır. Buna göre agilent sisteminin kesim noktası 3.3 tosoh sisteminin kesim noktası ise 3.5 olarak alınmıştır. Çalışma grubumuzda referans değerler dikkate alınarak karşılaştırma yapıldığında her iki sistemde örnekleri normal veya taşıyıcı olarak ayırmaktadır. Her iki cihazın değerleri birbirleri

Tablo 3. Her iki cihazda ölçülen HbA2 değerlerinin karşılaştırılması

Tosoh-Agilent	HbA2 (%)
Korelasyon	r=0.902
Regresyon	y = 0.915+0.559x
Sınıfıçı korelasyon	0,831 (%95 GA 0.751-0.890)
Cohen' kapa	1.0

GA: güven aralığı, tüm değerler için p<0.0001

Tablo 4. Cihazlardan elde edilen %CV değerleri

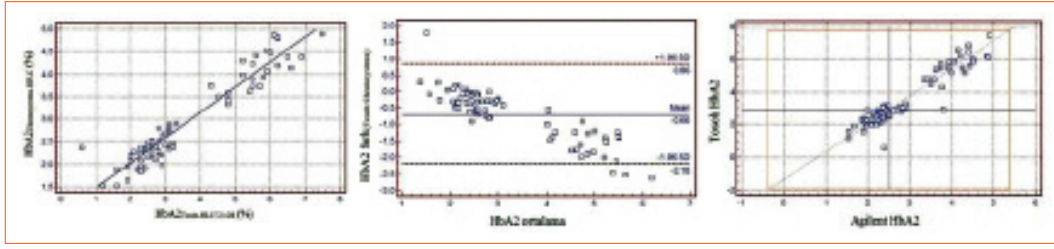
	Agilent 1100	Tosoh HLC 723 G8
%CV	HbA2 (%)	HbA2 (%)
Gün içi	3.04	1.68
Günler arası	3.58	1.94

ile karşılaştırıldığında birinin diğerine göre yanlış negatif veya yanlış pozitif sonucu bulunmamaktadır (Cohen's kapa=1).

Cihazlara ait normal kontrol ile yapılan gün içi ve günler arası %CV (belirsizlik katsayısı) çalışması Tablo 4'te verilmiştir.

Tartışma

İki cihazın uyumunu incelediğimiz çalışmamızda yaptığımız korelasyon ve regresyon analizlerine göre HbA2 için r=0.902, slope=0.559 bulunmuştur. CLSI'nin metot karşılaştırma protokolüne (EP-9) göre korelasyon katsayısının, tek başına yeterli olmamakla birlikte, 0.97'den büyük olması önerilmektedir [11]. Buna göre bulunan korelasyon katsayısının yeterli uygunlukta olmadığı görülmüştür. Regresyon analizleri incelendiğinde HbA2 için saptanan slope değerinin çok düşük olduğu görülmüştür. Bu değerler güven aralıklarına göre değerlendirildiğinde iki cihazın HbA2 ölçümü için uyumsuz oldukları ve HbA2



Şekil 1. Tosoh HLC 723 G8 ve Agilent 1100 HPCL cihazlarından elde edilen HbA2 ölçümlerinin Regresyon, Bland & Altman ve Youden grafikleri görülmektedir.

değerleri bakımından iki cihaz arasında anlamlı fark olduğu gözlenmektedir.

İki cihazın uyumunu incelemek için yaptığımız sınıfı-çi korelasyon katsayısı (SKK) analizinde; HbA2 için SKK=0.831 olarak bulduk. Fleiss'e göre SKK'nın 0.90'ın üzerinde olması uyumun çok iyi olduğunu gösterir [12]. Buna göre iki cihaz arasında HbA2 uyumunun çok iyi olmadığı anlaşılmaktadır. Bland-Altman grafiğinde ise %3 değerinden sonraki değerler için ortalama çizgisinden daha çok uzaklaştığı ve saçılmanın daha geniş olduğu görülmüştür.

Yukarıdaki istatistiksel analizlerin tersine, her iki yöntemin talasemi pozitifliği için kesim noktası dikkate alınarak yapılan Cohen's Kappa katsayısı analizinde (Kappa=1) mükemmel uyum bulunmuştur [9]. Cohen's Kappa katsayısı analizinde her iki yöntemin verdiği sonucun tanı uyumlarını -yani bir yöntemin taşıyıcı olarak saptadığını diğerinin de saptayıp saptayamadığını- değerlendiren bir yöntemdir. HbA2 için kesim noktası (chromsystems:3.3, Tosoh:3.5) dikkate alındığında; çalışma grubundaki örneklerin her iki sistemde de taşıyıcı veya normal olarak ayrıldığı görülmüştür. Fakat yine de, Bland-Altman grafiğinde de görüldüğü gibi her iki sistemden elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki fark 0.66'dır. Oysa kesim noktası arasındaki fark sadece 0.2 dir. Sonuç olarak agilent sisteminin %3 verdiği sonucu tosoh yaklaşık olarak 3.6 verecektir. Bu durum sınır değerlerde bu iki sistemden birinin normal değer verecekken diğerinin patolojik sonuç verebileceğini göstermiştir. Bizim çalışma grubumuzda sınır değerler olmamasına rağmen, Mosca A. [13] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HbA2 sınır değerlerinin nadir olmadığını göstermişlerdir.

Her iki cihaza ait kontrol serumları ile yaptığımız tekrarlanabilirlik çalışmasında Tosoh HLC 723 G8 HPLC sisteminin CV değerlerinin Agilent 1100 HPLC CV değerlerine göre daha iyi olduğunu tespit ettik. Bizim çalışmamıza benzer olarak Francois M. [14] ve arkadaşları Tosoh HLC 723 G8 cihazında yaptıkları CV çalışmasında HbA2'in günler arası CV değerini %2.11 bularak iyi bir kesinlik saptamışlardır. Agilent sistemine göre Tosoh sisteminde daha iyi bir kesinlik sağlanmasının nedeni; Tosoh sisteminin tam otomatik olmasından kaynaklandığını sanmaktayız.

Son yıllarda özellikle kapiller elektroforezin hemoglobi-

nopati taramasında yaygın kullanılmaya başlanması, likit kromatografi metotlarının belirli sorunlarını giderebilir. Yapılan çalışmalarda; Sebia marka kapiller elektroforez sistemi ile Biorad marka Variant II HPLC sistemleri karşılaştırılmış, HPLC yöntemindeki glike HbS ve HbE'nin, kapiller elektroforezde ise HbC'nin HbA2'e bozucu etkisi dışında sonuçların uyumlu olduğu bulunmuştur [15,16]. Bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere, her bir hemoglobin varyant analiz metodunun belirli kısıtlamaları vardır ve tüm hemoglobin varyantlarını tam olarak saptayacak tek bir yöntem bulunmamaktadır. Hemoglobin varyant çeşitliliğinin en sık görüldüğü etnik bölgeye göre metot seçilmesi daha doğru olacaktır [14].

Sonuç olarak, bu iki cihaz arasında talasemi taraması bakımından önemli bir belirteç olan HbA2 değerlerinin elde edilen mutlak değerlerin karşılaştırılmasında uyumsuz olduğunu, fakat kesim noktası dikkate alındığında her iki sistemde çalışma grubundaki normal ve taşıyıcıları ayırmada uyumlu olduğunu bulduk. Buna göre yöntem karşılaştırmada yalnızca sayısal verilerle değil iki yöntemin verdiği sonucun tanı uyumunu da kıyaslamak gerektirdiği ortaya koyduk. Çalışmamızı sınırlayan en önemli faktör; çalışma grubumuza ileri genetik tetkik yaparak kesin tanı koymak ve bu sonuçlara göre sistemlerden elde ettiğimiz HbA2 değerlerinin kendi kesim noktası içinde yalancı pozitif ya da yalancı negatif sonuç alınan hastaları tespit edememektir. Bir başka sınırlayıcı faktör ise çalışma grubumuzda sınır değerlere ait hastaların bulunmamasıdır. Özellikle HbA2 talasemi taramalarında hayati bir öneme sahiptir. Yanlış negatif sonuçlar evlilik öncesi yapılan taramalar için istenmeyen sonuçlar doğurabilir. Yine farklı yöntem kullanan merkezlerden gelen farklı sonuçlar klinisyenlerin kafasını karıştırabilir. Talasemi taramalarında HbA2 eritrosit indeksleri ve serum demir parametreleri ile beraber yorumlanmalı şüpheli durumlarda daha ileri tetkik ve araştırmalar yapılmalıdır.

Tarafsızlık Beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- [1] Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ 2001; 79(8):704-12.
- [2] Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes 2001; pp.

- 1-3 4th ed. Oxford: Blackwell Science LTD, Publication.
- [3] Merono F, Agouti I, Bonello-Palot N, Paolasso C, Levy N, et al. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. *Clin Biochem* 2011; 44(5-6):441-3.
- [4] Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 2009; 42(18):1786-96.
- [5] Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr* 2007; 74(7):657-62.
- [6] Van Kirk R, Sandhaus LM, Hoyer JD. The detection and diagnosis of hemoglobin A2' by high-performance liquid chromatography. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(5):657-61.
- [7] Wild BJ, Bain BJ. Investigation of abnormal hemoglobins and thalassemia. In (Eds. Lewis SM, Bain BJ, Bates I). *Dacie & Lewis Practical Hematology* 2001; pp. 231-68. 9th ed. Churchill Livingstone.
- [8] Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000; 46(8 Pt 2):1284-90.
- [9] Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005; 37(5):360-3.
- [10] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307-10.
- [11] A Good Example. http://www.medical.siemens.com/siemens/nl_NLDIAG/gg_diag_FBAs/files/EP_Evaluator/Webinars/02-EE9-Mods-Fall_2010.pdf (Last accessed: March 2013)
- [12] Fleiss JL. *The design and analysis of clinical experiments*, New York, John Wiley and Sons, 1986: 1-32.
- [13] Mosca A, Paleari R, Galanello R, Sollaino C, Perseu L, et al. New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassemia. *Bioelectrochemistry* 2008; 73(2):137-40.
- [14] Merono F, Agouti I, Bonello-Palot N, Paolasso C, Levy N, et al. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. *Clin Biochem* 2011; 44(5-6):441-3.
- [15] Higgins T, Mack M, Khajuria A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. *Clin Biochem* 2009; 42(7-8):701-5.
- [16] Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillarys Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta* 2012; 413(15-16):1232-8.