

# HbA2 Ölçümü İçin BioRad D-10TM ve Adams HA-8180T HPLC Sistemlerinin Karşılaştırılması

## Comparison of BioRad D-10TM and Adams HA-8180T HPLC Instrumnets for the Detection of HbA2

İD Saadet ÇELİK,<sup>a</sup>

İD Rifat BÜLBÜL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Biyokimya Bölümü,  
Bilecik Halk Sağlığı Laboratuvarı,  
<sup>b</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği,  
Bilecik Devlet Hastanesi,  
Bilecik

Received: 17.01.2018  
Received in revised form: 08.03.2018  
Accepted: 22.03.2018  
Available online: 04.06.2018

Correspondence:  
Saadet ÇELİK  
Bilecik Halk Sağlığı Laboratuvarı,  
Tıbbi Biyokimya Bölümü, Bilecik,  
TÜRKİYE/TURKEY  
saadetkader@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 çalışmanın amacı; D-10TM Hemoglobin testing system (BioRad, Hercules, USA) marka HPLC cihazı ile Adams HA-8180T (Menarini Diagnostics, Floransa, İtalya) HPLC cihazını hemoglobinopati tanı ve taraması açısından önemli olan HbA2 parametresi ölçümü bakımından karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla, biz bu çalışmada chromsystems kolon ve kitlerini kullanarak Bio-rad D-10 TM analizör marka HPLC cihazı ile Adams HA-8180T marka HPLC cihazını talasemi taraması bakımından birbirleri ile olan uyumu araştırdık. **Gereç ve Yöntemler:** Talasemi taraması yapılan 22'si erkek, 18'i kadın toplam 40 kişi prospektif olarak çalışmaya alındı. Her iki cihaz da tek seferde çalışılan hemoglobin A2 (HbA2) değerleri için istatistiksel uyum, iki-yönlü rasgele sınıfıçı korelasyon katsayısı (SKK), Wilcoxon Eş Testi, Spearman korelasyon katsayısı ve uyum korelasyon katsayısı (UKK) kullanılarak değerlendirildi. **Bulgular:** Yapılan iki grup fark testlerine göre erkeklerin Hb, Htc ve OEHB (Ortalama Eritrosit Hemoglobini) düzeyleri kadınlardan anlamlı şekilde yüksek bulundu. HbA2 değerleri için sınıfıçı korelasyon katsayısı (SKK)=0,960 ve uyum korelasyon katsayısı (UKK)= 0,953 olarak bulundu. Bununla birlikte Spearman korelasyon katsayısı rho: 0,806 olarak bulundu. **Sonuç:** İki cihaz arasında HbA2 değerlerinin karşılaştırılmasında CLS'nin metot karşılaştırma protokolüne (EP-9) göre uyum yetersizdir. Bununla birlikte Fleiss'in önerdiği sınıfıçı korelasyon katsayısına göre ve Lin'nin önerdiği uyum korelasyon katsayısına göre her iki sistemde çalışılan HbA2 ölçümlerinin uyumlu olduğunu bulduk. HbA2 değerleri farklı yöntemlerle ve diğer biyokimyasal parametrelerle (serum demir parametreleri) birlikte yorumlandığında kişilere ve klinisyenlere daha yol gösterici olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Bio-rad D-10 TM; HbA2; hemoglobinopati; HPLC; Adams HA-8180T; yöntem karşılaştırma

**ABSTRACT Objective:** Today, different trademarks of HPLC (High Performance Liquid Chromatography) equipment have been used in screening for thalassemia. In this study, the aim was to investigate the agreement between the results of the analyses of HbA2 values with D-10TM Hemoglobin testing system (BioRad,Hercules,USA) and Adams HA-8180T (Menarini Diagnostics, Florance, Italy) trademarks. **Material and Methods:** This prospective study was included in 40 (22 males and 18 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), Wilcoxon Signed Ranks Test, Spearman's correlation coefficient and concordance correlation coefficient (UCC). **Results:** Hb, Htc and OEHB levels of men were significantly higher than women. Intraclass correlation coefficients HbA2 values were found to be as ICC=0.960, and Concordance correlation coefficient (UCC)= 0.953. However, Spearman's correlation coefficient were calculated as rho:0.806. **Conclusion:** According to the method comparison protocol of CLS (EP-9), agreement between the results HbA2 values measured in the two analyzers are found to be insufficient. However, according to Fleiss's Intraclass correlation coefficient and Lin's concordance correlation coefficient the results HbA2 values were found to be sufficient in both systems. HbA2 values will be better guided by people and clinicians when interpreted with different methods and with other biochemical parameters (serum iron parameters).

**Keywords:** Bio-rad D-10 TM; HbA2; hemoglobinopathy; HPLC; Adams HA-8180T; method comparison

**T**alasemi, hemoglobin tetramer yapısında bulunan globin zincirlerinin biri ya da daha fazlasının üretiminin azlığı veya yokluğu ile karakterize olan kalıtsal heterojen bir hastalık grubudur.<sup>1</sup> Bu gruptaki hastalıklar, bizim ülkemizin de yer aldığı Akdeniz havzası, Orta Doğu, Hindistan, Kuzey Afrika içeren bölgelerde yüksek oranlarda görülür.<sup>2</sup>

Gerek talasemi ve gerekse diğer hemoglobino-patilerin tanısında klinik tablo ve hemogram testinde görülen anormallikler yol gösterici olsa da asıl tanı hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve değerlendirilmesi ile konur.<sup>3</sup> Günümüzde hemoglobin alt tiplerinin ayrımı için selüloz asetat elektroforezi, kromatografik mikro-kolonlar, immün-fiksasyon elektroforezi, kapiller elektroforez ve katyon değiştirici HPLC kullanılan metotlar arasındadır.<sup>4</sup> 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.<sup>5,6</sup> 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.<sup>4</sup>

Talasemi bozukluklarının önlenmesi amacıyla genetik danışmanlık verilebilmesi için  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığının doğru tanısı şarttır. Hemoglobin (HbA2) fraksiyonundaki artışın belirlenmesi en tipik tanısal belirteç olduğundan hastalığın tanısında anahtar rol oynamaktadır.<sup>5</sup>

Hemoglobinopati tarama ve tanısında genel olarak izlenen yol; hemoglobin, hematokrit ve diğer eritrosit endekslerinin tespiti, HbF ve HbA2 analizlerini de içeren hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve sonunda kesin tanı için DNA analizini kapsamaktadır.<sup>4,6</sup>

Son yıllarda tıp teknolojisi alanında yaşanan büyük gelişmeler tıp laboratuvarlarında oldukça fazla marka ve model cihazın kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu cihazların birbiri ile uyumunu araştırmak ise ilgili uzmanlar için bir problemdir. Bu nedenle bu çalışmada; D-10TM Hemoglobin Testing System (BioRad, Hercules,

USA) marka HPLC cihazı (Sistem 1) ile Adams HA-8180T (Menarini Diagnostics, Floransa, İtalya) HPLC cihazını hemoglobinopati tanı ve taraması açısından önemli olan HbA2 ve HbF parametreleri ölçümü bakımından karşılaştırılması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmaya Bilecik Merkez Halk Sağlığı Laboratuvarı biyokimya bölümüne 11 Temmuz -11 Ağustos 2017 tarihleri arasında talasemi taraması için başvuran 22 si erkek, 18'i kadın toplam 40 sağlıklı fert prospektif olarak dahil edildi. Bu kişilerin antekü-bital venlerinden EDTA'lı (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) tüplere kan örnekleri alındı. Alınan bu örnekler her iki cihazda da tek seferde çalışıldı ve sonuçlar kaydedildi. Ayrıca bu fertlerin eritrosit endeksleri Mindray BC5800 (Shenzhen, China) cihazında ölçüldü.

D-10TM ve Adams HA-8180T analizler HPLC sistemlerinde cihazlara spesifik iyon değiştirici HPLC kolon ve tamponları kullanıldı. Bu cihazlar çalışılan numuneye önceden herhangi bir işlem gerektirmeyen örnek dilisyonunu ve hemolizini otomatik yapan HPLC sistemleridir.<sup>3,7</sup>

## HPLC SİSTEMLERİ İLE HEMOGLOBİNİN ALT TİPLERİNİN AYRILMASI

D-10TM ve Adams HA-8180T analizler HPLC sistemlerinin her ikisi de hemoglobinleri alt fraksiyonlarına iyon değişim yöntemi ile ayırmaktadır. 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 konsantrasyonlarıdaki 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.<sup>8</sup> Cihazların uyumu ve yanlılık durumu Youden ve Bland Altman grafiği ile incelendi.

### İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için SPSS 15,0 for Windows ve MedCalc 15,2 paket programı kullanıldı. D-10TM ve Adams HA-8180T HPLC sistemlerinden elde edilen HbA2 değerleri ortalama±standart sapma olarak kaydedildi. Tanımlayıcı istatistikler; sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, medyan, kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Hastalara ait yaş ve eritrosit indekslerinin karşılaştırması normal dağılım koşulu sağlandığında Student t Testi, normal dağılım koşulu sağlanmadığında Mann Whitney U testi ile yapıldı. Sayısal değişkenler arası ilişkiler parametrik test koşulu sağlanmadığından Spearman Korelasyon Analizi ile incelendi. Bağımlı grupta (herbir hastanın iki farklı cihazdaki sonuçları kıyaslanırken) sayısal değişkenlerin farkları normal dağılım koşulunu sağlanmadığından Wilcoxon testi ile analiz edildi. Ölçümler arasındaki istatistiksel olarak uyum iki yönlü rastgele sınıf içi korelasyon katsayısı ve uyum (concordance) korelasyon katsayısı ile verildi. Cihazların uyumu ve yanlılık durumu Youden ve Bland Altman grafiği ile incelendi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi p<0,05 olarak kabul edildi.

### BULGULAR

Kadın ve erkeklerin yaşları ve eritrosit endeksleri değerleri arasındaki farklar Tablo 1’de verildi. Hct ve OEH için student t testi, yaş, Hgb, OEHb için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Yapılan iki grup fark testlerine göre erkeklerin Hb, Htc ve OEHb düzeyleri kadınlardan anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,001).

Gruplar arasında yapılan tek yönlü varyans analizinde hastaların yaş ortalamaları arasında anlamlı farklılık yokken eritrosit endeksleri arasında anlamlı farklılık bulundu.

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

D-10TM ve Adams HA-8180T HPLC (chromsystems) sistemleri ile ölçülen HbA2 değerleri için Wilcoxon Eş Testi, Spearman korelasyon katsayısı, sınıfıçi korelasyon katsayısı (iki-yönlü rasgele), uyum korelasyon katsayısı ve bias Tablo 3’te, korelasyon, youden ve Bland-Altman grafikleri ise Şekil 1 verilmiştir.

### TARTIŞMA

Günümüzde kullanımı ve yorumlama kolaylığı nedeniyle hemoglobin varyantlarının tespiti için HPLC tekniğinin kullanılması tercih edilir olmuştur. Dünyada hemoglobin varyantları taranması için birkaç ticari HPLC yöntemi bulunmaktadır.<sup>9</sup>

**TABLO 1:** Kişilerin cinsiyetlerine göre dağılımları, yaş (ortalama±standart sapma (SD)) eritrosit indeksleri (ortalama±standart sapma) ve referans aralıkları tabloda gösterilmiştir.

	Cinsiyet							
	Ort.±SD	Kadın (N=18)			Erkek (N=22)			p
		Min-Maks	Medyan	Ort.±SD	Min-Maks	Medyan		
Yaş (yıl)	29,3±13,4	10-78	25	30,8±16,6	1-79	26	0,270	
Hemoglobin	12,7±1,2	9,3-14,7	12,8	15,3±1,1	12,9-16,9	15,3	<0,001	
Hematokrit	38,0±3,1	30,1-44,1	37,85	44,6±2,6	39,4-49,4	44,6	<0,001	
OEH	88,7±7,5	64,4-98,2	89,9	87,4±6,8	63,9-100,7	88,1	0,486	
OEHb	31,9±3,5	21,6-34,9	33	33,5±2,4	25,4-36,1	34,1	0,002	

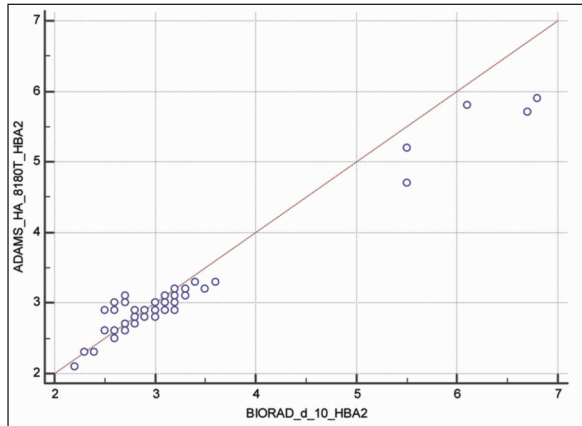
OEH: Ortalama Eritrosit Hacmi; OEHb: Ortalama Eritrosit Hemoglobini.

**TABLO 2:** Her iki cihazda ölçülen HbA2 değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları gösterilmiştir.

		Ort.±SD	Cinsiyet					p
			Kadın (N=18)	Medyan	Ort.±SD	Erkek(N=22)	Medyan	
HbA2	ADAMS HA-8180T	2,90±0,41	Min-Maks	2,9	3,18±0,90	Min-Maks	2,9	0,320
	BIORAD d 10	2,98±0,54	2,1-4,7	3	3,28±1,10	2,3-5,9	2,9	0,731
			2,2-5,5			2,4-6,8		

**TABLO 3:** Her iki cihazda ölçülen HbA2 değerlerinin karşılaştırılması.

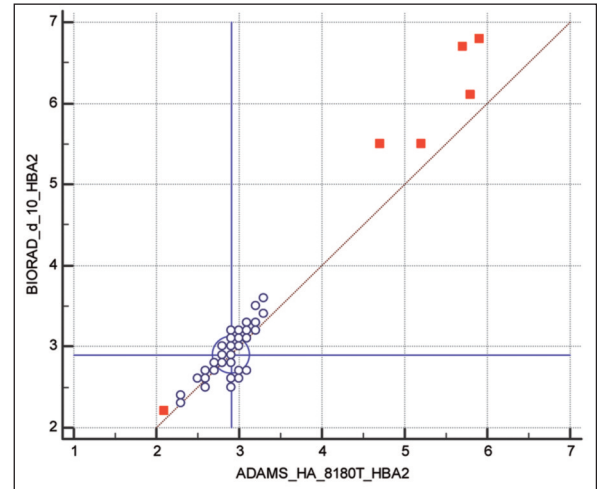
	HbA2 BIORAD d 10 & ADAMS HA-8180T
Wilcoxon Eş Testi	z:-3,706 p<0,001
Spearman korelasyon katsayısı	rho: 0,806 p<0,001
Sınıfıçı korelasyon katsayısı	0,960 (%95 CI 0,936-0,975)
Uyum korelasyon katsayısı	0,953 (%95 CI 0,935-0,967)
Bias	-0,091 (%95 CI-0,146-0,037) Min:-0,541 Maks:0,358



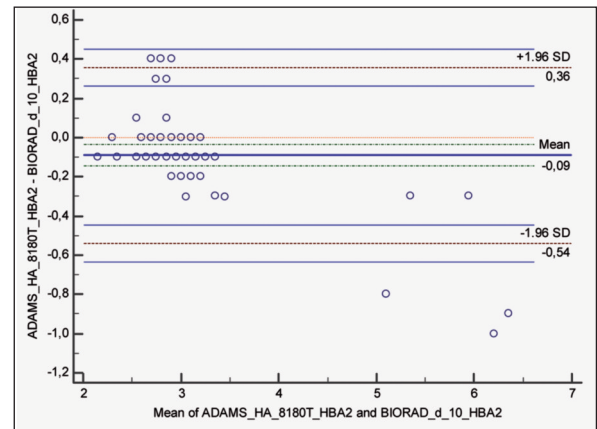
ŞEKİL 1: A) Korelasyon grafiği.

Talasemi taramasında kullanılan iki cihazın uyumunu incelediğimiz çalışmamızda yaptığımız korelasyon analizine göre HbA2 için  $r=0,960$  bulunmuştur. CLSI'nin metot karşılaştırma protokolüne (EP-9) göre korelasyon katsayısının, tek başına yeterli olmamakla birlikte, 0,97'den büyük olması önerilmektedir.<sup>8,10</sup> Buna göre bulunan korelasyon katsayısının yeterli uygunlukta olmadığı görülmüştür. Bu değerler güven aralıklarına göre değerlendirildiğinde iki cihazın HbA2 ölçümü için uyumsuz oldukları ve HbA2 değerleri bakımından iki cihaz arasında anlamlı fark olduğu gözlenmektedir.

İki cihaz arasındaki uyum değerlendirilirken, sınıf içi korelasyon katsayısı (SKK) esas alınmaktadır. Değerlendirme yapılırken bazı yayınlarda Sınıf içi korelasyon katsayısının 0,90'ın üzerinde olması uyumun çok iyi olduğu şeklinde yorumlanırken, bazılarının da ise 0,90-0,95 arasında bulunmasını orta dereceli uyum olarak yorumlanmıştır.<sup>11,12</sup> Bizim çalışmamızdaki İki cihazın uyumunu incelemek için yaptığımız SKK analizinde; HbA2 için SKK=0,960



ŞEKİL 1: B) Youden grafiği.



ŞEKİL 1: C) Bland-Altman grafiği.

olarak bulduk. Buna göre iki cihaz arasında HbA2 uyumunun çok iyi olduğu anlaşılmaktadır. Bland-Altman grafiğinde ise %3 değerinden sonraki değerler için ortalama çizgisinden daha çok uzaklaştığı ve saçılmanın daha geniş olduğu görülmüştür (Şekil 1 C).

Son yıllarda özellikle kapiller elektroforezin hemoglobinopati 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.<sup>13,14</sup> 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.<sup>3</sup>

Sonuç olarak, bu iki cihaz arasında talasemi taraması bakımından önemli bir belirteç olan HbA2 değerlerinin elde edilen mutlak değerlerin karşılaştırılmasında CLS'nin metot karşılaştırma protokolüne (EP-9) göre uyumsuz olduğunu, fakat Fleiss'in önerdiği sınıfıçi korelasyon katsayısına göre ve Lin'nin önerdiği uyum korelasyon katsayısına göre her iki sistemde çalışılan HbA2 ölçümlerinin uyumlu olduğunu bulduk. Buna göre yöntem karşılaştırmada yalnızca tek bir protokole bağlı kalmadan mevcut diğer protokoller de kıyaslayarak karar verilmesini önermekteyiz.

Çalışmamızı sınırlayan en önemli faktör; çalışma grubumuza ileri genetik tetkik yaparak kesin tanı koyamamış olmamız ve bu sonuçlara göre sistemlerden elde ettiğimiz HbA2 değerlerinin kendi

kesim noktası içinde yalancı pozitif ya da yalancı negatif sonuç alınan hastaları tespit edemememizdir. Bir başka sınırlayıcı faktör ise hemoglobin A2 ve F ölçümünde altın standart olan kolon kromatografisi ve alkali denatürasyon ile karşılaştırılmasıdır. Aynı şekilde kapiller elektroforez ile de karşılaştırma yapılmamasıdır. Bu yöntemler rutin laboratuvarlarda çok nadiren kullanılmaktadır. 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.

#### **Finansal Kaynak**

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

#### **Çıkar Çatışması**

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

#### **Yazar Katkıları**

**Fikir/Kavram:** Saadet Çelik; **Tasarım:** Saadet Çelik; **Denetleme/Danışmanlık:** Saadet Çelik, Rifat Bülbül; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Saadet Çelik; **Analiz ve/veya Yorum:** Saadet Çelik; **Kaynak Taraması:** Saadet Çelik, Rifat Bülbül; **Makalenin Yazımı:** Saadet Çelik, Rifat Bülbül; **Eleştirel İnceleme:** Saadet Çelik, Rifat Bülbül; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Saadet Çelik; **Malzemeler:** Saadet Çelik.

## KAYNAKLAR

1. Hoffman R, Benz E, Silberstein LE, Heslop H, Anastasi J, Weitz J. Hematology: Basic Principles and Practice. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007;(5) p.505-8.
2. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. Scand J Clin Lab Invest 2007;67(1): 11-25.
3. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010;5-11.
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. Paleari R, Gulbis B, Cotton F, Mosca A. Inter laboratory comparison of current high-performance methods for HbA2. Int J Lab Hematol 2012;34(4):362-8.
6. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clin Chem 2000;46(8 Pt 2):1284-90.
7. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillary Flex capillary electrophoresis with the Bio Rad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Clin Chim Acta 2012;413(15-16):1232-8.
8. Ellidağ H, Eren E, Aydın Ö, Arslan İnce F, Gök İ, Yılmaz N. [Comparison of agilent 1100 (Chromsystems) and Tosoh HLC-723 G8 HPLC systems in thalassemia screening]. Turk J Biochem 2014;39(4):544-8.
9. Gosselin RC, Carlin AC, Dwyre DM. Comparison of the BioRad Variant and Primus Ultra2 high-pressure liquid chromatography (HPLC) instruments for the detection of variant hemoglobins. Int J Lab Hematol 2011;33(2):159-67.
10. Krouwer JS. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. Vol. 22. No. 19 CLSI document EP9-A2. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002. p.56.
11. Fleiss JL. The Design and Analysis of Clinical Experiments. 1<sup>st</sup> ed. New York: John Wiley & Sons; 1986;(1) p.1-32.
12. Lin K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics 1989; 45(1):255-68.
13. 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.
14. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillary 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.