

HEMOGLOBİN VARYANTLARININ ÖLÇÜMÜNDE INTERLAB-G26 ELEKTROFOREZİ VE PRİMUS ULTRA² HPLC YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Comparison of Interlab-G26 Electrophoresis With the Primus Ultra² High-Pressure Liquid Chromatography in the Evaluation of Hemoglobin Variants

Oğuzhan Özcan¹, Özgür Yıldırım Kurtgöz², Ahmet Burak Gürpınar³,
Sedat Motor¹, Zafer Yönden¹.

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Hatay, Türkiye

²Turhal Devlet Hastanesi, Klinik Biyokimya Bölümü, Tokat, Türkiye.

³Tokat Devlet Hastanesi, Klinik Biyokimya Bölümü, Tokat, Türkiye

ÖZ

Amaç: Herediter hemoglobinopatiler genetik olarak sık görülen hastalıklar olup dünyada ve Türkiye’de önemli bir sağlık sorunudur. Hemoglobin varyantlarının tespitinde tarama amaçlı olarak hemoglobin elektroforezi ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemleri kullanılır. Bu çalışmada HbA, HbA₂ ve HbS varyantlarının ölçümünde HPLC (Primus Ultra²) ile hemoglobin elektroforez yöntemleri (Interlab-G26) arasındaki uyumun karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hemoglobinopati taraması istenen 122 hasta çalışmaya dahil edildi. EDTA’lı tüplere 2 ml hacimde alınan örnekler soğuk zincirde laboratuvara transfer edildi. Tüm örneklerin Hb A, Hb A₂, ve Hb S düzeyleri kromatografik yöntem ile çalışan Primus Ultra II HPLC cihazı ve elektroforez yöntemi ile çalışan Interlab G26 elektroforez cihazları ile ölçüldü. Hematolojik parametreler Mindray BC 6800 tam kan cihazı ile ölçüldü. Her iki yöntemi karşılaştırmak için Korelasyon analizi, Passing-Bablok Regresyon Analizi ve Bland-Altman Uyum Grafiği kullanıldı.

Bulgular: Her iki cihaz için Hb A, Hb S ve Hb A₂ parametrelerine ait değerler arasında pozitif korelasyon mevcuttu. Passing-Bablok regresyon analizinde, Hb A ve Hb S parametreleri için yöntemler birbiri ile uyumlu idi. P-B regresyon denkleminde göre linearityden sapma yoktu (CUSUM testi p değerleri sırasıyla 0.12 ve 0.94). Hb A₂ parametresinde ise linearityden sapma mevcut olup yöntemler arasında uyumsuzluk tespit edildi (p<0.01). Bland-Altman Grafiğinde Hb S parametresi için her iki yöntem arasında uyumluluk mevcut iken, Hb A ve Hb A₂ parametreleri açısından iki yöntem arasında uyumsuzluk tespit edildi.

Sonuç: Beta talasemi taşıyıcıları ve orak hücre bozukluğu olan hastalarda elektroforez yöntemi, Hb A₂’nin tespitinde daha düşük sonuçlar vermiş ve HPLC yöntemi ile uyumsuzluk göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Hemoglobinopati, Bland-Altman, Orak hücre hastalığı, Kromatografi, Elektroforez

ABSTRACT

Introduction: Hereditary hemoglobinopathies are very common genetic diseases and an important healthcare problem in the worldwide and Turkey. Both the hemoglobin electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC) methods are used to investigate the detection of hemoglobin variants for screening purpose. We aimed to compare two common methods, HPLC (Primus Ultra²) and electrophoresis (Interlab-G26), used in the screening of Hb A, Hb A₂ and Hb S variants.

Materials and Methods: A total of 122 patients were enrolled in the study. Two milliliter of whole blood samples were drawn into EDTA containing tubes and transferred into the laboratory. Hb A, Hb A₂ and Hb S levels of all samples were measured by both Interlab G26 Electrophoresis and Primus Ultra II HPLC devices. Hematological parameters were evaluated by Mindray BC 6800 auto analyzer. Correlation analysis, Passing-Bablok regression analysis and Bland-Altman graphics were used to compare both methods.

Results: Positive correlation was observed between two methods for determination of Hb A, HbS and Hb A₂ parameters. In Passing-Bablok Regression analysis, both methods were compatible for detection of Hb A and Hb S variants (CUSUM test p values, respectively, 0.12 and 0.94) but deviation from linearity were observed for Hb A₂ parameter (p<0.01). In Bland-Altman Graphics, there was a good agreement between HPLC and electrophoresis methods for Hb S but incompatibility for Hb A and Hb A₂ parameters.

Conclusion: Electrophoresis method has led to lower results in detection of Hb A₂ variants especially for patients with β-Thalassemia trait and sickle cell disorders and was incompatible with HPLC.

Keywords: Hemoglobinopathy, Bland-Altman, Sickle Cell Disease, Chromatography, Electrophoresis

Gönderme tarihi / Received: 21.02.2016 Kabul tarihi / Accepted: 27.04.2016

İletişim: Oğuzhan Özcan, Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Hatay, Türkiye

Faks: +90-326-2213320, Tel: +90-326-2213317, E-mail: drozan29@hotmail.com

GİRİŞ

Dünya nüfusunun yaklaşık % 4.5'ini etkileyen herediter hemoglobinopatiler, genetik olarak sık görülen hastalıklar olup ülkemizde başta Çukurova bölgesi olmak üzere en çok Hatay ilinde görülmektedir (1). Hemoglobin molekülü "hem" adı verilen prostetik grup ile globin adı verilen protein kısımdan oluşur ve normalde vücutta bulunan hemoglobinin % 95-96' sı Hemoglobin A1, % 2.5-3.5'i Hemoglobin A2 ve % 1' den azı Hemoglobin F 'dir (2). Talasemiler hemoglobinin globin geninde meydana gelen sentez eksikliğine bağlı olarak oluşur ve eksik olan zincir tipine göre alfa veya beta talesemi olarak adlandırılır.

Hemoglobinin globin zincirindeki aminoasit dizisindeki değişiklikler ise hemoglobinopati olarak isimlendirilir ve en yaygın olarak görülen hemoglobin varyantı globin zincirinde 6. pozisyonda glutamik asit-valin değişimi ile karakterize hemoglobin S (Hb S)' tir (3,4). Bugüne kadar 900' ün üzerinde hemoglobin varyantı tespit edilmiştir (5). Hemoglobinopatilerin tespiti hem anemik kişilerin değerlendirilmesinde hem de evlilik öncesi çiftlerin koruyucu hekimlik açısından taranmasında klinik açıdan oldukça büyük önem taşır.

Klinik bulgu veya aile hikâyesi yanında düşük ortalama eritrosit hacmi (MCV<72) ve ortalama hemoglobin (MCH<27 pg) değerlerine sahip hipokrom mikrositer anemisi olan kişilerde tarama amaçlı testler yapılır. Hemoglobin varyantlarının tanısı için kullanılan yöntemler tarama testleri ve kesin tanı yöntemleri olarak ikiye ayrılır. Hemoglobin A2 gibi normal hemoglobin varyantlarında artma veya Hemoglobin S gibi anormal hemoglobin varyantlarının tespitinde tarama testi olarak başlıca alkali ve asit elektroforezi ile otomatize

edilmiş yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemleri kullanılır (6,8). Ancak, HPLC yöntemi ile çalışılan çeşitli hasta sonuçları için özel eğitim gerekmektedir. Bu yüzden çoğu laboratuvar hemoglobinopati taraması için halen nispeten kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle asit ve alkali jel elektroforezi kullanmaktadır. Hemoglobin varyantlarının kesin tanısı ise globin zincirinde yer alan genlerin incelenmesi ile konur.

Bu çalışmada Hb A, Hb A2 ve Hb S varyantlarının tarama amaçlı analizinde yaygın olarak kullanılan HPLC yöntemi ile hemoglobin elektroforezi arasındaki uyumun Passing-Bablok regresyon analizi ve Bland-Altman Uyum Grafiği kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kan örneklerinin elde edilmesi

Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran ve hemoglobinopati taraması istenen 122 birey çalışmaya dahil edildi. Tüm örneklerin ölçümünde Elektroforez yöntemi ile çalışan Interlab firmasının G26 cihazı (Grifols Inc, USA) ve HPLC yöntemi ile çalışan Primus Ultra II cihazları (Primus Corporation, USA) kullanıldı. EDTA içeren 2 ml hacimdeki alınan örnekler soğuk zincir kurallarına dikkat edilerek laboratuvara transfer edildi. Hematolojik parametreler Mindray BC 6800 tam kan cihazı (Mindray, China) ile incelendi. Her örneğin Hb A, Hb A2, ve Hb S düzeyleri HPLC ve Hb elektroforez yöntemleri kullanılarak ölçüldü. Çalışma öncesinde Mustafa Kemal Üniversitesi İnsan Etik Kurul'unda etik onayı alınmıştır.

Hemoglobin Elektroforezi (Interlab G26)

Alkali pH'ta negatif yüklenen hemoglobin moleküllerinin elektriksel alanın etkisi ile anoda doğru farklı hızlarda göç etmesi prensibine dayalıdır. EDTA'lı tüplere alınan tam kan örnekleri 5.000 rpm' de 15 dak. santrifüj edildi. Altta kalan eritrosit pelletten mikro pipet yardımı ile 30 µL alındı ve 240 µL ye saf su ile tamamlanarak hücrelerin hemoliz olması sağlandı. Numune cihaza yüklendikten sonra; numunenin agaroz jel plak üzerine uygulanması, elektroforetik migrasyonu, jel denaturasyonu, jel boyama, jel kurutma ve dansitometrik okuma işlemleri cihaz tarafından otomatik bir şekilde gerçekleştirildi.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi –HPLC (Primus Ultra II)

Primus Ultra II cihazı katyon değiştirici kolon tekniğinin kullanıldığı HPLC yöntemi ile çalışır. Hareketli sıvı deposu, pompa, enjeksiyon halkası, kolon, değişken dalga boyu saptayıcısı, kaydedici ve sonikator bölümlerinden oluşmaktadır. Hareketli faz kolon içine yüksek basınç ile pompalanmaktadır. Durgun faz, hareketli faz ve örnek arasındaki etkileşime bağlı olarak, HPLC'de hemoglobin varyantları ayrıştırılır. Bu yöntemde, Hb F, Hb A, Hb S, ve Hb C' nin kolon içindeki kalma süreleri farklıdır. EDTA' lı tüpe alınan tam kan örnekleri hemolizat kiti kullanılarak hemoliz elde edildi ve kolon içine enjekte edildi. Adsorbe olan hemoglobinlerin elüsyonu için Bis-tris (hidroksimetil) aminometan ve farklı pH değerlerindeki 1 mmol potasyum siyanür içeren iki mobil faz kullanıldı.

İstatistiksel analiz

Hb A, Hb A2 ve Hb S parametreler için önce korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon yapılırken gruplar normal dağılıma uymadığı için Spearman

korelasyon uygulandı. $p < 0.01$ ' ten küçük değerler anlamlı bulundu.

Her iki yöntemi karşılaştırmak için Passing-Bablok Regresyon Analizi kullanıldı. Denklemde y karşılaştırmak istediğimiz yöntem olan elektroforez yöntemi (Interlab G 26 cihazı), x ise referans kabul ettiğimiz yöntem olan HPLC yöntemi (Primus cihazı) ile elde edilen değerleri temsil etmektedir. Regresyon denklemi oluşturulduktan sonra regresyon doğrusuna ait doğrusallığın değerlendirilmesinde, kümülatif toplam (CUSUM) kullanıldı. Denklem doğrusal olması için anlamlılık $p < 0.01$ ile ifade edildi. p değeri < 0.01 olması doğrusallıktan anlamlı sapma olarak kabul edildi.

Regresyon analizine ek olarak iki yöntemi karşılaştırmak amacıyla yöntemler arasındaki farklılığı en iyi şekilde ortaya koyan Bland-Altman Uyum Grafiği kullanıldı. Bu grafikte eş değerler arasındaki fark y eksenini üzerinde, ortalama ise x eksenini üzerinde tanımlandığında bazı eş değerler arasında fark olup olmadığı grafik üzerinde değerlendirildi. Uyum sınırı olarak tanımlanan "precision" (tekrarlanabilirlik), ortalama farkı ± 1.96 SD olarak hesaplandı. Güven aralığı sıfırı içerdiğinde doğruluğun var olduğu kabul edildiğinden doğruluk, iki yöntem arası %95'lik güven aralığı ortalama farkı kullanılarak ortalama farkının sıfırı olup olmadığının test edilmesiyle incelendi.

BULGULAR

Taraması yapılan bireylerin 32'si sağlıklı (Hb;13.7 \pm 1.7 g/dl, MCV;82.8 \pm 7.1 fl), 44 tanesi demir eksikliği anemisi (Hb;9.23 \pm 1.59g/dl, MCV;69.2 \pm 8.25fl), 19 tanesi orak hücre hastası (Hb;8.16 \pm 1.58g/dl, MCV; 93.7 \pm 13.9 fl), 15 tanesi orak hücre taşıyıcı (Hb;12.5 \pm 1,87 g/dl,

MCV;80.4±8.31 fl) ve 12 tanesi de beta talesemi taşıyıcısı (Hb;11±1.78, MCV;62.5±3,26 fl) idi. Her iki cihaz için Hb A, Hb S ve Hb A2 parametrelerine ait değerler arasında pozitif korelasyon mevcuttu (**Tablo 1**). Passing-Bablok Regresyon Analizinde, Hb A ve Hb S parametrelerinde P-B regresyon denklemine göre linearityden sapma yoktu (**Tablo 2**). Yani iki cihaz bu parametreler açısından birbiri ile uyumlu idi (**Şekil 1a, 1b**). Hb

A2 parametresinde ise linearityden sapma mevcut olup yöntemler arasında uyumsuzluk tespit edildi (**Şekil1c**). Bland-Altman Grafiğinde Hb S parametresi için her iki yöntem arasında uyumluluk mevcut iken (**Şekil 2b**), Hb A ve Hb A2 parametreleri açısından iki yöntem arasında uyumsuzluk tespit edildi (**Şekil 2a, 2c**). Parametrelerin dağılımı **Tablo 3**'de gösterildi.

Tablo 1. Korelasyon Analiz Tablosu.

Parametreler	N	r	95% CI	P değeri
Hb A	122	0,760	0,673-0,826	P<0.0001
Hb A ₂	122	0,372	0,208-0,516	P<0.0001
Hb S	34	0,951	0,904-0,976	P<0.0001

Tablo 2. Passing-Bablok Regresyon Analizi Tablosu.

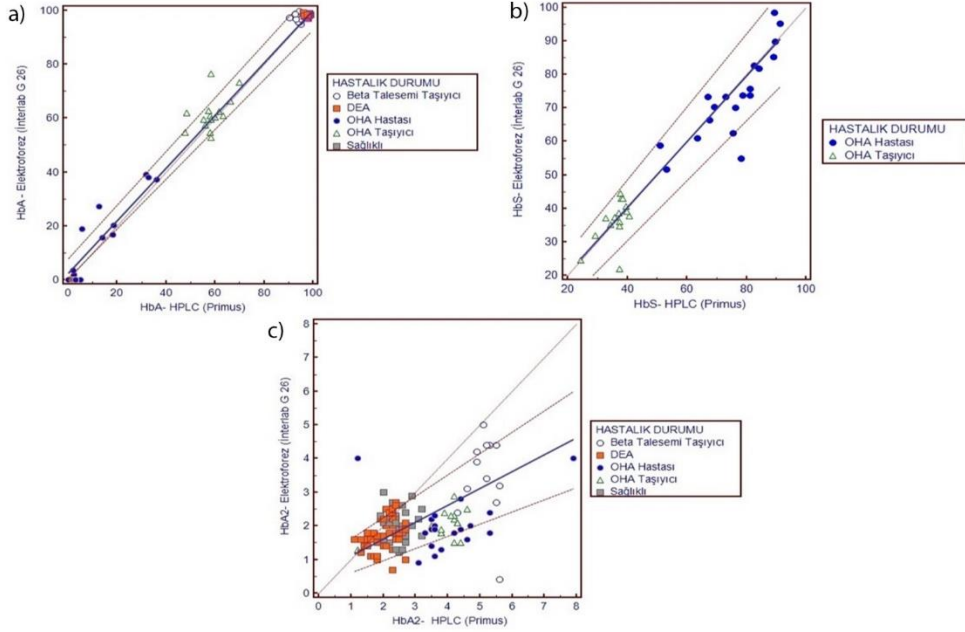
Parametreler	N	P-B Regresyon Denklemi*	Slope (b) 95% CI	Intercept (a) 95% CI	CUSUM testi P değeri
Hb A	122	$y = 2,417178 + 0,979227 x$	0,92 - 1,0	0,6 - 7,8	0.12
Hb A ₂	122	$y = 0,625000 + 0,500000 x$	0,36 - 0,63	0,23 - 0,97	<0.01
Hb S	34	$y = 0,945635 + 0,984194 x$	0,90 - 1,09	-5,78 - 4,93	0.94

P-B Regresyon Denklemi, $y=bx + a$ 'dır. Bu denklemde y karşılaştırmak istediğimiz yöntem olan Elektroforez yöntemi (Interlab G 26)' dir. X ise referans kabul ettiğimiz yöntem olan HPLC yöntemi (Primus Ultra II)' dir.

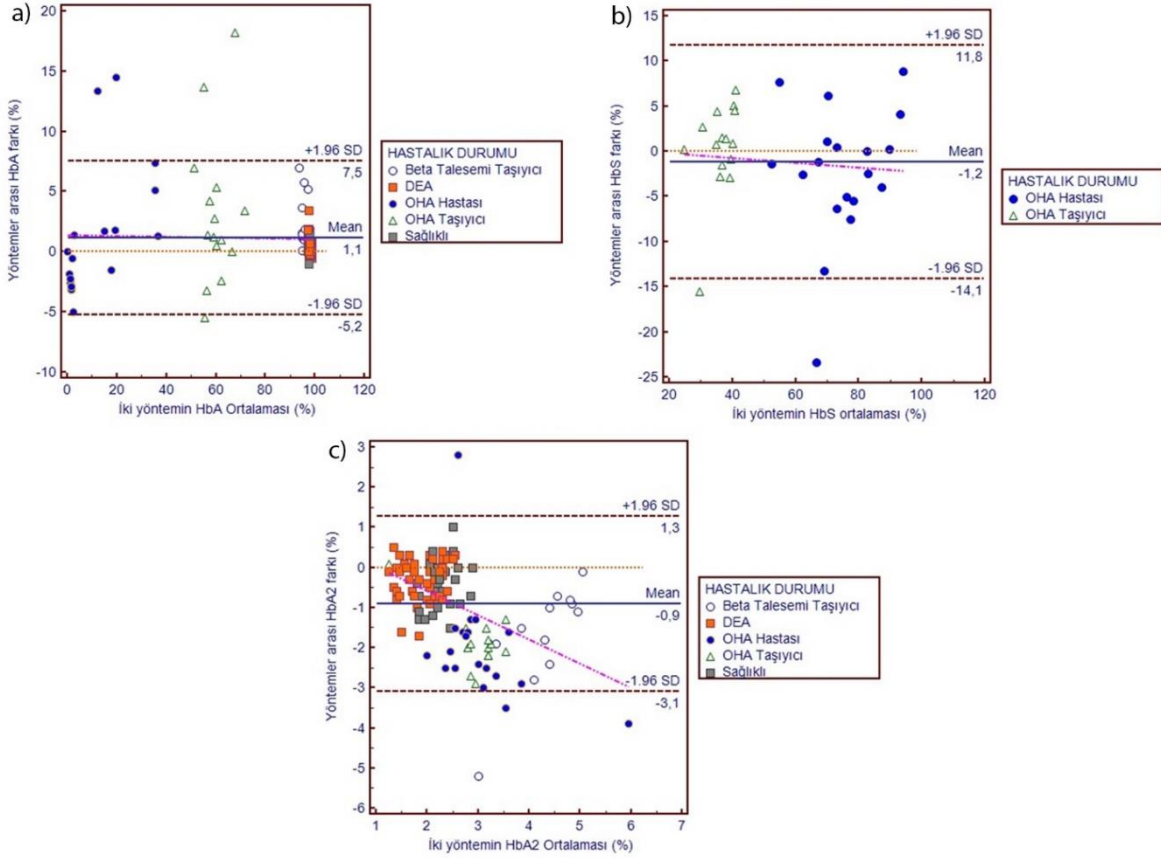
Tablo 3. Bland-Altman Grafiği Analiz Tablosu

Parametreler	N	Aritmetik Ortalama {95% CI}	Alt Limit {95% CI}	Üst Limit {95% CI}
Hb A	122	1,14 {0,55 - 1,72}	-5,24 {-6,24 - (-4,24)}	7,52 {6,52 - 8,52}
Hb A ₂	122	-0,90 {-1,10 - (-0,70)}	-3,10{-3,44 - (-2,75)}	1,28 {0,94 - 1,63}
Hb S	34	-1,16 {-3,46 - 1,14}	-14,11 {-18,09 - (-10,13)}	11,79 {7,81 - 15,77}

Şekil 1. Şekilde her üç parametre için Passing-Bablok regresyon analizi sonuçları görülmektedir.



Şekil 2. Şekilde her üç parametre için Bland-Altman Grafiği sonuçları görülmektedir.



TARTIŞMA

Ülkemizde hemoglobin elektroforezi ve HPLC yöntemi, farklı hemoglobin varyantlarının tespitinde yaygın olarak kullanılan tarama metotlarıdır. Bu çalışmada, Hb A, Hb A2 ve Hb S ölçümünde Interlab firmasının G26 elektroforez cihazı ile referans metot olarak kabul edilen HPLC yöntemi ile çalışan Primus Ultra II cihazı karşılaştırıldı.

HPLC yöntemi nispeten daha sensitif olması, yüksek ayırma gücü ve hemoglobin varyantlarının tespitinde daha doğru sonuçlar vermesi yönüyle elektroforez yöntemine göre daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (9). Elektroforez yöntemi ise daha fazla manuel işlem gerektirmesine, düşük konsantrasyonlardaki Hb A2 düzeyini belirlemede daha az sensitif olmasına ve uzun süren çalışma prosedürüne rağmen, nispeten düşük maliyeti ve yarı otomatize cihazların kullanıma girmesiyle tarama yöntemi olarak ülkemizde halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda öncelikle iki yöntem arasında korelasyon analizi yapıldı. Buna göre her iki cihaz arasında 122 örnekte Hb A ve Hb A2 açısından (sırasıyla $r=0.760$, $r=0.372$) ve 34 hastada da HbS açısından anlamlı bir korelasyon mevcuttu ($r=0.951$). Karşılaştırılan iki metot için tüm analitik ölçüm aralığında hedef değerler arasındaki ilişkiyi incelemesinden dolayı avantajlı olduğundan her iki yöntem Passing-Bablok regresyon analizi ile karşılaştırıldı. Bu teknik hem sabit hem de oransal sistematik hataların olduğu durumlarda uygulanır. Buna göre Hb A ve Hb S parametrelerinde P-B regresyon denkleminde göre lineariteden sapma yoktu (Şekil 1a,b). Özellikle Hb S için P-B regresyon denkleminde göre hem oran (slope) 1'i kapsamaktadır, hem de kesim (intercept) 0' ı kapsamaktadır (Tablo 2). Yani her iki yöntem

arasında uyumluluk söz konusuydu. HbA2 parametresinde ise P-B regresyon denkleminde göre lineariteden sapma mevcuttu (Şekil 1c). Yani yöntemler arasında uyumsuzluk söz konusudur. Bunun nedeni Beta talasemi taşıyıcıları ve orak hücre taşıyıcı ve hastalarının elektroforez cihazında ölçülen Hb A2 değerlerinin, HPLC yöntemiyle ölçülenden daha düşük olmasıdır. Regresyon analizine ek olarak iki yöntemi karşılaştırmak amacıyla Bland-Altman uyum grafiği kullanılmıştır. Bland-Altman grafiği, ortalamalar ile farklar arasındaki ilişkiyi görselleştirerek, sistematik farklılık tespiti ve dış değerlerin görsel açıdan tanımlanması için kullanışlıdır. Bu çalışmada Bland-Altman'a göre Hb S ölçümünde her iki yöntem de P-B regresyon analizi ile benzer şekilde tüm gruplarda uyumlu görülmüştür. HbA2 parametrelerinde ise her iki parametreye ait ortalamalar güven aralığı içerisinde sıfırı içermediğinden her iki yöntem arasında uyumsuzluk söz konusudur (Tablo 3). Ayrıca yöntemler arasında oransal sistematik farklılık grafikte göze çarpmaktadır (Şekil 2c). Bu uyumsuzluk regresyon analizinde görülen sonuçla benzer olup elektroforez yöntemi ile ölçülen HbA2 değerlerinin Beta talasemi taşıyıcıları, orak hücre taşıyıcı ve hastalarında daha düşük ölçülmesinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç önceki çalışmalarla uyumlu olup elektroforez yöntemlerinin genel olarak düşük konsantrasyonlardaki HbA2 gibi varyantların belirlenmesinde yetersiz olabileceği ile ilişkili olabilir (10).

Diğer taraftan HPLC yöntemi ile Hb A2 ölçümünün özellikle Hb S bulunan bireylerde yüksek çıkabileceği bildirilmiştir. Bu durumun HbS eklenme ürünlerinden (HbS adducts) kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (11,12).

Ayrıca beta talasemi taşıyıcılığı olan bireylerde HbA2 miktarının belirlenmesi eşlik eden önemli derecede demir eksikliği anemisi varsa tanıda karışıklığa yol açabileceği bildirilmiştir (13). Bizim çalışmamızda demir eksikliği tanısı olan tüm hastalarda her iki yöntem de birbiri ile uyumlu idi. Yani anemik hastalarda iki yöntem de birbiri ile uyumlu idi.

Bir başka çalışmada ise HPLC yönteminin hem kesinlik (precision) hem de doğruluk (accuracy) açısından elektroforetik yöntemlerden daha iyi olduğu gösterilmiş ve hemoglobinopati taramalarında daha üstün olduğu ileri sürülmüştür (14). Bazı laboratuvarlar ise her iki yöntemdeki bu kısıtlılıklar nedeniyle HPLC ve elektroforezi kombine olarak kullanmayı önermektedirler (15).

Sonuç olarak bu çalışmada beta talasemi taşıyıcıları ve orak hücre taşıyıcı ve hastalarının elektroforez cihazında ölçülen Hb A2 değerlerinin, HPLC yöntemiyle ölçülenden daha düşük olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla ülkemizde özellikle bu hastalıkların yaygın olduğu bölgelerde bireylerin hemoglobinopati yönünden taranmasında elektroforetik yöntemin bu kısıtlılıkları nedeniyle, şüpheli sonuçların HPLC yöntemi ile tekrarlanmasının daha uygun olacağını düşünüyoruz. Ancak her iki yöntemde kısıtlılıkları nedeniyle hastalar tam kan parametreleri ve aile öyküsü ile birlikte değerlendirilmeli ve tarama testlerinde şüpheli bulunan hastalara genetik doğrulama yapılması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızın bir kısıtlılığı çalışmamıza dahil edilen hastaların klinik tanılarına göre seçilmiş olup ayrıca genetik doğrulamanın yapılmamış olmasıdır.

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No:9900).

REFERANSLAR

1. Oktay G, Acipayam C, İlhan G, Karal Y, Sakallı G, Yılmazoğlu N, et al. The results of hemoglobinopathy screening in Hatay, the southern part of Turkey. *JCAM* 2014 DOI: 10.4328/JCAM.2427.
2. Saraf SL, Molokie RE, Nouraie M, Sable CA, Luchtman-Jones L, Ensing GJ, et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *2014*;15:4-12.
3. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* 2010;115:4331-6.
4. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376:2018-31.
5. Kleinert PK, Schmidt K, Speer O, Schmutz M, Roschitzki B, Durka SS, et al. Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of haemoglobin variants. *Clin Chem* 2008;54:69-76.
6. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem* 2004;50:1736-47.
7. Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs HPLC. *Clin Chem Acta* 2001;313:187-94.
8. Anagnostopoulos K, Tentis I, Kalleas C, et al. Effect of HbS in the determination of HbA2 with the Menarini HA-8160 analyser and comparison with other instruments. *Int J Lab Hematol* 2009;31:665-72.
9. Papadea C, Cate JC. Identification and quantification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography. *Clin Chem* 1996;42:57-63.
10. Dogaru M, Daniel C, Trefor H. Comparison of two analytical methods (electrophoresis and HPLC) to detect thalassemias and hemoglobinopathies. *Revista Rev Romana Med Lab* 2007;9:39-48.
11. White JM, Christie BS, Nam D, Daar S, Higgs DR. Frequency and clinical significance of erythrocyte genetic abnormalities in Omanis. *J Med Genet* 1993;30:396-400.
12. Suh DD, Kruss JS, Bures K. Influence of hemoglobin S adducts on hemoglobin A2 quantification by HPLC. *Clin Chem* 1996;42:113-4.
13. Campbell M, Joan S, Davies H. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clin Chem* 1999;45:969-75.
14. Lafferty J. College of American Pathologists hemoglobinopathy survey HG-B. Chicago, IL: College of American Pathologists, 1999.
15. Clarke GM and Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and Update. *Clin Chem* 2000;46:1284-90.