

Variabilità biologica dell'emoglobina glicata: un'analisi sistematica della letteratura

Federica Braga¹, Alberto Dolci², Andrea Mosca¹, Mauro Panteghini^{1,2}

¹Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

²Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera 'Luigi Sacco', Milano

ABSTRACT

Biological variability of glycated hemoglobin: a systematic review of the literature. Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) is the product of the nonenzymatic reaction between glucose and the free amino group of the valine of hemoglobin A₀ β -chain. HbA_{1c} is the most important marker for monitoring of the glycemic state in diabetic patients. Different analytical techniques are available for HbA_{1c} determination. The lack of comparability between data from different methods resulted in the need to develop a uniform, scientifically sound, international reference system for HbA_{1c}, i.e. the IFCC reference system. Today, the standardisation of the HbA_{1c} measurement is finally in place, but a clear definition of the clinically allowable total error of measurements is still lacking. Information from biological variation of the analyte can be used to derive these goals. In this study, we systematically reviewed the published studies defining the biological variation of HbA_{1c} to check consistency of available data in order to accurately define analytical goals. All the eight recruited studies showed limitations on the employed analytical methodology, on selected population, and in applying the correct protocol and statistical analyses. In conclusion, there is an urgent need of an accurately designed study to determine biological variability of HbA_{1c} using a traceable and specific assay, appropriate protocol and right statistical derivation of data.

INTRODUZIONE

L'emoglobina glicata o β N1-deossifruuttosil-emoglobina (HbA_{1c}) rappresenta il prodotto di una reazione non enzimatica di glicazione, che consiste in una condensazione tra il gruppo aldeidico del glucosio e il gruppo NH₂ della valina terminale della catena β dell'emoglobina A₀. La quantità di HbA_{1c} formata è strettamente correlata alla concentrazione di glucosio nel sangue. In particolare, considerando la vita media degli eritrociti, si ritiene che il valore di HbA_{1c} rifletta la glicemia media dei 2-3 mesi precedenti alla sua determinazione. L'American Diabetes Association (ADA) raccomanda la determinazione della HbA_{1c} in tutti i soggetti con diabete mellito in terapia al fine di monitorare il controllo glicometabolico a medio-lungo termine per valutare e, nel caso, ridurre il rischio di complicazioni causate da alterazioni del microcircolo (1). In particolare, si raccomanda la determinazione dell'HbA_{1c} con una frequenza variabile in funzione dello stato clinico del paziente: ogni 6 mesi nel diabete di tipo 2 ben compensato, ogni 3-4 mesi nel diabete di tipo 1 in terapia convenzionale ottimizzata oppure nel diabete di tipo 2 trattato con insulina, ogni 1 o 2 mesi nel diabete di tipo 1 scompensato e nel diabete gestazionale. Recenti studi hanno inoltre indicato che in soggetti non diabetici incrementi anche lievi delle concentrazioni ematiche di HbA_{1c} sono correlati ad un aumento del rischio cardiovascolare (2, 3). Infine, è stato appena pubblicato un rapporto che fa presagire un ruolo della HbA_{1c} anche per la diagnostica del diabete, fatto che, se recepito, potrebbe ulteriormente accrescere l'importanza clinica di questo esame di laboratorio (4).

Da un punto di vista analitico, sono disponibili numerose metodiche per la determinazione della HbA_{1c} (5, 6). La maggior parte di quelle basate sulla differenza di carica elettrica tra HbA_{1c} e le altre emoglobine e tutte quelle immunochimiche misurano specificamente la HbA_{1c}, mentre altri metodi (es. cromatografia di affinità) quantificano l'emoglobina glicata totale, includendo anche le molecole col glucosio legato alle lisine β 17 e β 66 e alle valine ammino (N)-terminali delle catene α . La rilevante discordanza tra i risultati delle differenti metodiche disponibili ha indotto in passato ad intraprendere programmi di armonizzazione su base nazionale, tra i quali il principale è stato senz'altro il "National Glycohemoglobin Standardization Program" (NGSP) americano, creato con lo scopo di rendere le misure di HbA_{1c} comparabili al metodo in HPLC a scambio ionico utilizzato nel "Diabetes Control and Complication Trial" (DCCT) (7). Nonostante i programmi nazionali di armonizzazione abbiano rappresentato un importante progresso, i risultati delle determinazioni di HbA_{1c} eseguiti in differenti parti del mondo continuavano, tuttavia, a mostrare significative differenze (8). Per questo nel 1995 l'IFCC ha creato un gruppo di lavoro incaricato di implementare la standardizzazione della misura di HbA_{1c} a livello globale (9). Per raggiungere questo scopo è stato dapprima definito in modo inequivocabile il "misurando" HbA_{1c} ed è quindi stato elaborato un sistema metrologico di riferimento, che comprende il metodo di riferimento, specifico per il misurando così come definito, materiali di riferimento e una rete di laboratori che eseguono in maniera controllata la suddetta procedura (10). Per favorire l'implementazione del sistema, è stato anche racco-

mandato di esprimere i risultati di HbA_{1c} in mmol/mol, in accordo con il Sistema Internazionale di misura (11, 12).

Una volta implementata la riferibilità ("traceability") dei risultati ottenuti con i metodi commerciali a questo sistema, è molto importante definire i traguardi per gli errori di misura dell'HbA_{1c}, che rendano la determinazione utilizzabile dal punto di vista clinico (13). A questo proposito, esiste un ampio consenso nell'indicare la variazione biologica dell'analita come la fonte più attendibile di informazioni utilizzabili nella definizione di questi traguardi (14). La variabilità biologica può essere distinta in variabilità intra-individuale e variabilità inter-individuale. Si definisce variabilità biologica intra-individuale (CV_I) la fluttuazione casuale in un individuo della concentrazione di un analita intorno al suo punto omeostatico. La variabilità inter-individuale (CV_G) è data dalla differenza nei punti omeostatici nei diversi individui. La conoscenza della variabilità biologica di un analita costituisce un insostituibile elemento per la corretta applicazione clinica della sua misura. In particolare, la conoscenza di CV_I e CV_G permette la definizione dei traguardi analitici per imprecisione, inesattezza ed inaccuratezza per un efficace impiego clinico della misura dell'analita in questione.

In questo lavoro, abbiamo quindi voluto valutare gli studi finora pubblicati sulla variabilità biologica della HbA_{1c}, operando una revisione critica ("sistematica") di questi dati, stimandone l'idoneità, il grado di concordanza e/o le eventuali cause di disaccordo. Particolare attenzione è stata posta a come i dati di ogni studio sono stati ottenuti (selezione della popolazione da arruolare, frequenza e numero dei prelievi, conservazione dei campioni fino all'esecuzione dell'analisi, specificità analitica dei metodi utilizzati, analisi statistica dei dati) alla luce di quanto riportato nel lavoro di Fraser and Harris, pietra miliare della teoria della variabilità biologica (15). Questo

al fine di evidenziare o meno se i risultati degli studi presenti in letteratura sono sufficientemente validi e scientificamente rigorosi da poter essere utilizzati per ricavare gli obiettivi analitici per la determinazione della HbA_{1c}.

MATERIALI E METODI

E' stata fatta una ricerca su PubMed, senza limiti di periodo, utilizzando come parole chiave "Biological variation & HbA_{1c}", "CV_I% & HbA_{1c}" e "CV_G% & HbA_{1c}". L'unico criterio di inclusione/esclusione utilizzato era che i lavori avessero come obiettivo dichiarato dello studio la determinazione sperimentale delle componenti di variabilità biologica dell'HbA_{1c}. Erano pertanto esclusi i lavori scientifici che riportavano dati di variabilità biologica ricavati dalla letteratura, anche perché i riferimenti bibliografici riportati coincidevano con i lavori sperimentali già selezionati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Studi selezionati

Sono stati selezionati otto studi relativi alla variabilità biologica dell'HbA_{1c}, le cui principali caratteristiche sono riassunte nella Tabella 1 (16-23). Mentre tutti gli studi definivano il CV_I del HbA_{1c}, solo una minoranza calcolava anche il CV_G.

Definizione dell'analita ed influenza della specificità del metodo utilizzato

Come detto, la possibilità di standardizzare la misura dell'HbA_{1c} si basa innanzitutto sulla definizione del "misurando" [HbA_{1c} come molecole di emoglobina che hanno in comune uno specifico esapeptide, che è l'ad-

Tabella 1
Studi relativi alla variabilità biologica della HbA_{1c}

Autore, anno	No. e tipo di soggetti	No. prelievi (frequenza)	Metodo	CV _I , %	CV _G , %
Godsland, 1985 (16)	10 volontari sani (6 M, 4 F)	11-27 (7 giorni)	Cromatografia a scambio ionico	1,8	-
Howey et al., 1989 (17)	8 diabetici	6 (3-4 giorni)	Elettroendosmosi	7,3	10,8
Phillipou et al., 1993 (18)	73 diabetici ^{a, b}	4 (1 mese) 4 (3 mesi)	Cromatografia di affinità	4,2 ^a ; 5,1 ^b 7,1 ^a ; 9,8 ^b	-
Kolatkart et al., 1994 (19)	29 diabetici	NS (3 mesi) NS (12 mesi)	HPLC (scambio ionico)	2,4 4,1	-
Kilpatrick et al., 1998 (20)	12 volontari sani (7 M, 5 F)	10 (15 giorni)	HPLC (scambio ionico)	1,9	6,8
Garde et al., 2000 (21)	11 volontari sani (solo F)	5 (7 giorni)	HPLC (scambio ionico)	<0,7	3,3
Trapé et al., 2000 (22)	47 diabetici ^{c, d, e}	4-7 (6 mesi)	Immunoturbidimetria	7,9 ^c ; 5,4 ^d ; 3,9 ^e	-
Rohlfing et al., 2002 (23)	45 volontari sani (solo M)	12 (7 giorni)	HPLC (affinità)	1,7 ^f	4

CV_I, variabilità biologica intra-individuale; CV_G, variabilità biologica interindividuale; M, maschi; F, femmine; NS, non specificato.

^a39 diabetici in stabile controllo metabolico (16 valutati nel breve termine e 23 valutati nel lungo termine) e ^b34 diabetici in controllo metabolico variabile (13 valutati nel breve termine e 21 valutati nel lungo termine); ^c13 diabetici con buon controllo glicemico, ^d10 diabetici con controllo glicemico accettabile e ^e24 diabetici in scarso controllo glicemico; ^finclusa la variabilità analitica.

dotto stabile del glucosio alla valina N-terminale della catena β dell'emoglobina (β N1-deossifruktosil-emoglobina)). Se la metodologia utilizzata ha diversa specificità analitica, e misura quindi un diverso "analita" (es. le emoglobine glicate totali, includendo anche quelle glicate in altri siti), ci si può aspettare che anche la variabilità biologica, proprietà strettamente associata con le caratteristiche dell'analita misurato, cambi (24).

Dal punto di vista analitico, i metodi che più si discostano dalla specificità definita dal sistema di riferimento IFCC sono quelli che impiegano la cromatografia a scambio ionico o quella di affinità su microcolonne ed il metodo basato su elettroendosmosi, utilizzati nei tre lavori sulla variabilità biologica più datati (16-18). Effettivamente, Godsland e Howey et al. correttamente definiscono l'analita misurato come HbA₁, indicando con questa abbreviazione l'insieme delle frazioni A1 glicate (HbA_{1a+1b+1c}) (16, 17). D'altra parte, la cromatografia di affinità utilizzata da Phillipou e Phillips (18) e, più recentemente, da Rohlfing et al. (23) si basa sulla reazione dei gruppi cis-1,2-diolo del composto emoglobina-glucosio (ed altri zuccheri) con l'acido boronico immobilizzato, producendo degli esteri boronati. Tale metodica quantifica perciò l'emoglobina glicata totale, rilevando anche il glucosio legato alle lisine ed alle valine N-terminali delle catene α .

Una buona parte degli studi ha utilizzato sistemi in HPLC con colonne a scambio ionico (BioRex 70 o Pharmacia Mono S) (19-21). Rispetto alle metodiche precedenti, questi metodi sono dotati di una maggiore specificità per la HbA_{1c}, anche se la presenza di una significativa intercetta in tutte le correlazioni effettuate con il metodo di riferimento IFCC testimonia una loro diversità in termini di quantità misurata (25, 26).

Un ultimo lavoro ha utilizzato un saggio immunoturbidimetrico competitivo (Tina-quant HbA_{1c}, Roche Diagnostics), applicato su un analizzatore automatico di un altro produttore (Synchron CX7, Beckman Coulter) (22). Questo metodo è effettivamente specifico per l'analita HbA_{1c}, ed il lavoro di Trapé et al. è l'unico che, da questo punto di vista, si presta a poter essere considerato idoneo.

Tipologia dei soggetti studiati

La Tabella 2 riporta le caratteristiche ottimali che un protocollo per la stima della variabilità biologica di un analita dovrebbe avere. Nei protocolli di arruolamento degli studi valutati, una delle limitazioni più frequente-

mente riscontrate è il reclutamento di pazienti diabetici, anziché di soggetti apparentemente sani, come sarebbe richiesto dalla teoria della variabilità biologica, che definisce unicamente la fluttuazione fisiologica di un analita intorno al suo punto omeostatico (15). Il sovrapporsi della presenza di una patologia, specie se instabile e non ben controllata, può marcatamente alterare le informazioni ottenute andando ad amplificare la suddetta fluttuazione. Dai dati riportati nella Tabella 1 è facilmente rilevabile l'inevitabile differenza esistente tra i valori di CV_i calcolati in soggetti sani (da un minimo di 0,7% ad un massimo di 1,9%) e quelli calcolati in pazienti diabetici (da un minimo di 2,4% ad un massimo di 9,8%). In maniera del tutto distorta, c'è chi, come Ricós et al. (27), arriva a concludere che, relativamente alla variabilità biologica della HbA_{1c}, sia meglio considerare i risultati di CV_i ottenuti nei diabetici, poiché la differenza critica ("reference change value") da essa derivata si utilizza nella pratica clinica per il monitoraggio degli stessi e non dei soggetti sani, trascurando il fatto che nei soggetti diabetici interviene un'ulteriore componente di variabilità del controllo omeostatico dovuta alla patologia, che è proprio quella che si vorrebbe evidenziare con l'impiego della differenza critica. Altri lavori, pur ben recependo la necessità di studiare una popolazione di soggetti apparentemente sani, hanno, infine, limitato la valutazione ad un solo genere, femmine (21) o maschi (23), forse perché utilizzavano campioni raccolti in soggetti non specificamente arruolati.

Durata dello studio e frequenza dei prelievi

E' ben noto che la stima della variabilità biologica è strettamente dipendente dal tempo che intercorre tra i prelievi e dalla durata dello studio. In particolare, la durata dello studio non deve essere né troppo corta (qualche giorno), né troppo lunga (anni), ad evitare che la stima della variabilità che ne consegue sia riferita a periodi diversi da quelli nei quali la misura di HbA_{1c} è utilizzata in clinica o che essa possa essere influenzata da altre fonti di variabilità aggiuntive (es. variazioni stagionali) (21, 28). Sembra quindi opportuno calibrare la durata degli studi della variabilità biologica della HbA_{1c} nell'intervallo tra uno e sei mesi, corrispondente alla frequenza consigliata di misura della HbA_{1c} nelle diverse condizioni cliniche. Da questo punto di vista, se la maggioranza degli studi rispetta, almeno in parte, questo criterio, la scelta da parte di alcuni Autori di andare al di là dei sei mesi di durata appare criticabile (18, 19, 22). Come si

Tabella 2

Caratteristiche di un protocollo sperimentale per la stima ottimale della variabilità biologica di un analita

- Eseguito in soggetti apparentemente sani, in condizioni che minimizzino le variabili preanalitiche [abitudini e stile di vita usuali, nessuna assunzione di farmaci (compresi contraccettivi e farmaci da banco), no alcolici o fumo in quantità eccessive durante lo studio, standardizzazione della tecnica di prelievo del sangue (eseguito dallo stesso flebotomista ed alla stessa ora del giorno)]
- Campioni raccolti ad intervalli temporali regolari (es. una volta alla settimana)
- Campioni tutti processati nella stessa maniera, con definizione dei criteri di raccolta, trattamento, aliquotazione, conservazione e trasporto, e conservati in congelatore fino al giorno della misurazione
- Quando tutti i campioni di tutti gli individui arruolati sono disponibili, esecuzione delle misure di tutti i campioni in sequenza casuale, in duplicato, nella stessa seduta analitica

possa pensare che una valutazione che perduri per più anni non rischi di includere anche altre fonti di variabilità oltre la biologica, è difficile da comprendere. Ad esempio, Kolatkar et al. (19) riportano una diminuzione della variabilità delle concentrazioni di HbA_{1c} nei pazienti diabetici valutati lungo l'intervallo dello studio (6 anni), come conseguenza dell'impiego di un trattamento intensivo, erroneamente interpretando questo risultato come una riduzione del CV_I della HbA_{1c}. Le variazioni rilevate nel tempo su questi soggetti possono senza dubbio essere utilizzate per giungere a conclusioni cliniche, ma non certamente per definire la variabilità biologica e la differenza critica della HbA_{1c} che, calcolate invece su un'adeguata popolazione di soggetti apparentemente sani, rappresentano il criterio fondamentale per l'interpretazione dei risultati dell'esame e, di conseguenza, per la valutazione del controllo glicemico nei pazienti diabetici.

Esecuzione delle misure, valutazione della variabilità analitica e analisi statistica dei dati

Dal punto di vista dell'esecuzione delle misure di HbA_{1c}, indipendentemente dal metodo utilizzato, nei lavori considerati si riscontrano frequentemente due limitazioni rispetto al protocollo ideale (Tabella 2). Innanzitutto, le misurazioni di HbA_{1c} spesso non erano eseguite in duplicato su ogni campione di ogni soggetto. La determinazione dei campioni in duplicato consente, infatti, di stimare nel modo più corretto la variabilità analitica nella serie, anziché indirettamente ricavarla dai risultati del CQI, a volte eseguito su materiali di controllo che possono mostrare comportamenti differenti dei campioni dei pazienti (29). Inoltre, le determinazioni della HbA_{1c} erano spesso eseguite sui campioni freschi, il giorno stesso del prelievo, con studi che si articolavano su differenti serie analitiche, una per ogni giorno di raccolta dei campioni, anziché su un'unica seduta per tutti i campioni opportunamente conservati, in modo da eliminare dal calcolo della variabilità totale dei risultati l'apporto della variabilità analitica tra le serie, difficile da stimare correttamente (15).

Eseguire tutte le misure di uno studio di variabilità biologica in duplicato nella stessa serie analitica rappresenta il modello sperimentale ideale, perché limita l'influenza della variabilità analitica sulla variabilità totale dei risultati alla sola variabilità nella serie, con minori possibilità di errore nel successivo calcolo della variabilità

biologica ottenuta per sottrazione (Tabella 3). Sfortunatamente, l'unico studio, che correttamente prevedeva il congelamento dei campioni per eseguire tutte le determinazioni di HbA_{1c} nella stessa seduta analitica alla fine della fase di raccolta, derivava poi la variabilità analitica nella serie dalle misurazioni eseguite su materiali di controllo, perché non prevedeva l'esecuzione in duplicato delle misure dei campioni, con l'impossibilità poi di definire accuratamente il CV_I (21).

In alcuni studi i campioni non erano congelati, e quindi erano misurati in differenti sedute analitiche, con la variabilità analitica stimata utilizzando i risultati ottenuti sui materiali di controllo (18, 20). In altri, la variabilità analitica del metodo utilizzato era ottenuta dai dati della letteratura (19). L'estremo di questa approssimazione procedurale si rileva nello studio di Rohlfing et al. (23) nel quale, oltre a non segnalare il modo di conservazione dei campioni, la misura in singolo degli stessi costringeva a sottrarre alla variabilità totale dei risultati ottenuta sperimentalmente una variabilità analitica "within-day", ottenuta dai dati del controllo di qualità, talmente sovrastimata da ridurre a valori minimi, non definibili in maniera accurata, il CV_I (ancorché riportato come "probabilmente <1%").

L'omogeneità nella raccolta e nel numero dei prelievi eseguiti nei singoli individui è un altro aspetto metodologico critico, da cui dipende, in caso di numero di campioni molto alto, anche l'impossibilità tecnica di eseguire tutti i dosaggi nella stessa serie analitica. Passare, nel gruppo di soggetti studiati, da un minimo di 11 ad un massimo di 27 prelievi con frequenza settimanale vuol dire ottenere stime di variabilità biologica riferite a 3 o a 6 mesi, con impossibilità di approssimare in maniera attendibile i dati individuali in un valore di variabilità biologica medio (16).

Il corretto approccio di quantificazione della variabilità biologica è riassunto nella Tabella 3. In realtà, la metodologia statistica utilizzata per derivare le componenti di variabilità non era, del tutto o in parte, specificata in tre lavori (16, 19, 22); nei rimanenti, gli Autori correttamente dichiaravano di aver utilizzato l'analisi della varianza (ANOVA). Il CV_G, in aggiunta al CV_I, era, tuttavia, stimato in solo 4 studi, tre dei quali condotti su gruppi di soggetti apparentemente sani, con valori rispettivamente di 6,8%, 3,3% e 4,0% (20, 21, 23).

Tabella 3

Quantificazione statistica delle componenti della variabilità biologica

La variabilità (espressa come varianza σ^2) totale deve essere distinta nelle sue componenti:

$$\sigma^2_{\text{totale}} = \sigma^2_{\text{analitica}} + \sigma^2_{\text{biologica intraindividuale}} + \sigma^2_{\text{biologica interindividuale}}$$

Le tre variabilità sono calcolate mediante l'analisi della varianza (ANOVA):

- la $\sigma^2_{\text{analitica}}$ è ricavata dai risultati dei duplicati ottenuti per ogni singolo campione,
- la $\sigma^2_{\text{biologica intraindividuale}}$ è stimata dalla serie di risultati ottenuti in ciascun soggetto,
- la $\sigma^2_{\text{biologica interindividuale}}$ è stimata dalla differenza tra la variabilità totale (σ^2_{totale}) di tutti i risultati e le componenti di variabilità analitica e intraindividuale.

Tutte le componenti di variabilità, una volta ottenute, sono trasformate nei corrispondenti CV utilizzando le medie corrispondenti.

CONCLUSIONI

Un chiaro messaggio finale che deriva da questa analisi sistematica della letteratura disponibile è l'evidente mancanza di dati di variabilità biologica della HbA_{1c} che siano sufficientemente robusti. E' curioso notare che, nonostante i rilevanti limiti messi in luce nel nostro lavoro, le informazioni concernenti la variabilità biologica della HbA_{1c} vengono, in ambito scientifico e professionale, ormai considerate come definitivamente acquisite. Le informazioni relative alla variabilità biologica degli analiti biochimici ed ematologici più utilizzate e consultate nella pratica quotidiana sono quelle curate da Ricós et al., liberamente consultabili per via telematica nel sito www.westgard.com/biodatabase1.htm. I valori di variabilità biologica relativi all'HbA_{1c} riportati in questo "database" (CV_i, 3,4%; CV_G, 5,1%) sono apparentemente ricavati dalla media (pesata?) dei risultati degli studi disponibili in letteratura, ritenuti validi secondo il giudizio degli Autori della tabella. In realtà, non si coglie il criterio (se esiste) con cui questi studi sono valutati e quindi selezionati, per cui i dati riportati per la HbA_{1c} sollevano molte perplessità. Per esempio, pur con tutte le limitazioni sottolineate nel presente lavoro, sulla base dei dati attualmente disponibili in studi condotti su soggetti apparentemente sani (16, 20), il CV_i relativo all'analita "emoglobina glicata totale" dovrebbe approssimativamente essere 1,8-1,9%, molto più basso, quindi, di quello riportato da Ricós et al. nel "database" citato. Per quanto riguarda la variabilità biologica dell'analita HbA_{1c}, definito in accordo al sistema di riferimento IFCC (11), è evidente l'urgente necessità di studi metodologicamente e statisticamente rigorosi che impieghino metodi di misura specifici e dimostratamente riferibili al suddetto sistema di riferimento.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(suppl 1):S15-35.
2. Park S, Barrett-Connor E, Wingard DL, et al. GHb is a better predictor of cardiovascular disease than fasting or post-challenge plasma glucose in women without diabetes. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1996;19:450-6.
3. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, et al. Association of haemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 2004;141:413-20.
4. The International Expert Committee. International expert committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327-34.
5. John WG. Haemoglobin A1c: analysis and standardisation. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1199-212.
6. Mosca A. La determinazione dell'emoglobina glicata nel sangue umano: attualità e prospettive. *Biochim Clin* 2008;32:27-35.
7. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
8. John WG, Mosca A, Weykamp C, et al. HbA_{1c} standardization: history, science and politics. *Clin Biochem Rev* 2007;28:163-8.
9. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardisation of HbA1c/glycohemoglobin determinations. *JIFCC* 1996;9:62-7.
10. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC Scientific Division, Mosca A, Goodall I, Hoshino T, et al. Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1077-80.
11. Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for HbA1c. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1081-2.
12. Panteghini M, John WG. Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system: the way forward. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:942-4.
13. Report. Implementation of standardization of HbA1c measurement. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:573-4.
14. Franzini C. Variabilità biologica e interpretazione degli esami di laboratorio. In: Panteghini M, ed. Interpretazione degli esami di laboratorio. Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio. Vol VII. Padova: Piccin, 2008:13-24.
15. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:409-37.
16. Godsland IF. Intra-individual variation: significant changes in parameters of lipid and carbohydrate metabolism in the individual and intra-individual variation in different test populations. *Ann Clin Biochem* 1985;22:618-24.
17. Howey JEA, Bennet WM, Browning MCK, et al. Clinical utility of assays of glycosylated haemoglobin and serum fructosamine compared: use of data on biological variation. *Diabet Med* 1989;6:793-6.
18. Phillipou G, Phillips PJ. Intraindividual variation of glycohemoglobin: implications for interpretation and analytical goals. *Clin Chem* 1993;39:2305-8.
19. Kolatkar NS, Cembrowski GS, Callahan PL, et al. Intensive diabetes management requires very precise testing of glycohemoglobin. *Clin Chem* 1994;40:1608-9.
20. Kilpatrick ES, Maylor PW, Keevil BG. Biological variation of glycated haemoglobin. Implications for diabetes screening and monitoring. *Diabetes Care* 1998;21:261-4.
21. Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT, et al. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A1c, IgA, prolactin, and free testosterone in healthy women. *Clin Chem* 2000;46:551-9.
22. Trapé J, Aliart M, Brunet M, et al. Reference change value for HbA1c in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1283-7.
23. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, et al. Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002;48:1116-8.
24. Pagani F, Panteghini M. Significance of various parameters derived from biological variability for lipid and lipoprotein analyses. *Clin Biochem* 1993;26:415-20.
25. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004;50:166-74.
26. Geistanger A, Arends S, Berding C, et al. Statistical methods for monitoring the relationship between the IFCC reference measurement procedure for hemoglobin A1c and the designated comparison methods in the United States, Japan, and Sweden. *Clin Chem* 2008;54:1379-85.
27. Ricós C, Iglesias N, Garcia-Lario JV, et al. Within-subject

- biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* 2007;44:343-52.
28. MacDonald MJ, Liston L, Carlson I. Seasonality in glycosylated hemoglobin in normal subjects. Does seasonal incidence in insulin-dependent diabetes suggest specific etiology? *Diabetes* 1987;36:265-8.
 29. Ponzo P, Dolci A, Scapellato L, et al. Valutazione della commutabilità per il sistema analitico Cobas Integra dei materiali di controllo utilizzati nella VEQ per l'emoglobina glicata. *Biochim Clin* 2008;32:44-7.