

Avanzamenti nella misura e nell'utilizzo clinico dell'emoglobina glicata

Andrea Mosca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

ABSTRACT

Advances in the measurement and clinical utility of glycated hemoglobin. Aim of the present work is to give an update about the clinical utility of the measurement of glycated hemoglobin, as well to summarize the state-of-the-art of the process of standardization of HbA_{1c} worldwide. Recent data collected from various EQAS studies are presented, with some more details about the quality of HbA_{1c} measurement in Italy. A brief discussion about the problems related to the transition to the IFCC standardized assays is presented, together with the most recent proposals related to the studies on the relationship between HbA_{1c} and mean blood glucose.

UTILIZZO CLINICO DEL TEST

La misura dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}, beta, β N1-deossifruktosil-emoglobina) è molto utilizzata in pazienti con diabete mellito, soprattutto al fine di monitorare il controllo glico-metabolico a medio-lungo periodo^{1,2}. Tale prassi è suffragata da una raccomandazione con livello di evidenza di forza "A" nel documento dell'AACC, che dice inoltre che i goal di trattamento debbono essere basati sulla base dei risultati di studi clinici retrospettivi randomizzati. Tali studi, i più famosi dei quali sono il DCCT e l'UKPDS^{3,4}, hanno infatti provato che vi è una stretta correlazione tra il grado di controllo glicemico, valutato in base ad una serie di misure dell'HbA_{1c}, ed il rischio dello sviluppo e della progressione delle complicanze croniche del diabete.

Le più recenti indicazioni di letteratura indicherebbero inoltre che, anche in soggetti senza diabete, aumenti anche lievi dell'emoglobina glicata si associano ad un rischio crescente di patologie cardiovascolari^{5,6,7}. In particolare in soggetti non diabetici con glicemia normale un aumento dell'1% nei livelli dell'HbA_{1c} sarebbe associato ad un aumento del 28% del rischio di morte per cause cardiovascolari, indipendentemente dall'età, dalla pressione, dai livelli di colesterolo, dall'indice di massa corporea e dal fumo di sigarette.

Per quanto riguarda invece l'utilizzo dell'HbA_{1c} ai fini diagnostici ci sono dati per ora contrastanti e l'ADA ne sconsiglia l'utilizzo⁸ tuttavia va tenuto presente che i dati ottenuti da Ko e coll⁹ hanno per altro provato che l'utilizzo combinato dell'HbA_{1c} e della glicemia a digiuno permetterebbe di evitare circa l'80% delle curve da carico. A riconferma di questo dato, i risultati dello studio NHANES III¹⁰ hanno poi dimostrato che per valori di HbA_{1c} pari a 6,1% (2 DS al di sopra della media) la specificità del test è abbastanza alta, pari al 97,4%, e che pertanto la probabilità di escludere il diabete in soggetti che hanno valori inferiori a 6,1% di HbA_{1c} è molto significativa. Ulteriori studi clinici tuttora in corso di svolgimento su popolazio-

ni ben definite e di ampie dimensioni (Inter-Heart, DREAM, PURE) permetteranno tra alcuni anni di conoscere con esattezza se l'HbA_{1c} potrà essere impiegata in routine per diagnosticare il diabete e l'intolleranza al glucosio, quale sia il suo potere di predire vari tipi di rischio di complicanze e se eventualmente sarà utile per definire nuove categorie a rischio, oltre a quelle dei soggetti con alterata glicemia a digiuno (IFG) ed alterata tolleranza al glucosio (IGT)¹¹.

METODICHE ANALITICHE ATTUALI E LORO ALLINEAMENTO

A tutt'oggi sono disponibili sul mercato oltre una trentina di metodiche per misurare l'emoglobina glicata, principalmente basate su tre tipi di principi e cioè la differenza di carica elettrica tra HbA_{1c} ed HbA (minicolonnine, HPLC, isoelettrofocalizzazione ed elettroforesi), la natura di determinanti antigenici dei primi 8 residui amminocidici della catena beta (metodiche immunochimiche) e la presenza di glucosio legato covalentemente all'emoglobina (cromatografia di affinità). Ciò spiega in parte perchè nel corso degli anni, in mancanza di uno standard di riferimento internazionale, si siano sviluppati intervalli di riferimento metodo-dipendenti e perchè i dati ottenuti in ambiti diversi siano spesso non confrontabili tra loro. Una rassegna recente delle diverse metodiche analitiche è stata curata da John¹². Ricordo che da un punto di vista di terminologia alcuni usano il termine di glico-emoglobine (GHb) riferendosi alla emoglobina glicata misurata con metodiche in cromatografia di affinità.

I dati che abbiamo a disposizione sul grado attuale di concordanza delle metodiche per l'HbA_{1c} sono ricavabili essenzialmente dai programmi di valutazione esterna di qualità, che si sono sviluppati in maniera autonoma in diverse nazioni e che periodicamente forniscono elaborati relativi ai loro esercizi. Senza la pretesa di voler stilare un elenco completo di tali programmi menziono quello americano del CAP (v. sotto), quello inglese del

NEQAS¹³, quello olandese dello ERL coordinato da Weykamp¹⁴, il francese promosso da Valdiguié¹⁵, lo svedese di EQALIS¹⁶, il tedesco INSTAND¹⁷ e quelli italiani (intersocietario a partecipazione volontaria¹⁸; inter-regionale a partecipazione obbligatoria¹⁹). In occasione del meeting IFCC del 2003 si è costituita un'associazione (European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine, EQALM²⁰) che riunisce le organizzazioni non-profit che si occupano di valutazioni esterne di qualità e che presumibilmente in futuro potrebbe riuscire ad uniformare i protocolli degli studi di VEQ ora forniti separatamente da vari enti.

Negli Stati Uniti è obbligatoria la partecipazione alla survey del College of American Pathologists (CAP²¹) e la maggior parte dei laboratori che vi partecipa si accredita presso il National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP²²), che si è costituito nel 1993 per facilitare la standardizzazione dell'HbA_{1c} in USA in modo che i risultati che tutti i laboratori ottengono possano essere confrontati e riferiti con quelli riportati nello studio DCCT³.

Gli studi del CAP sono tutti fatti facendo analizzare ai partecipanti pool di sangue fresco, spedito in condizioni di temperatura controllata (non congelati), ed analizzati entro brevissimo tempo dalla raccolta in maniera da minimizzare eventuali fonti di variabilità confondenti. Per quanto riguarda l'accuratezza delle misure i dati degli esercizi 2005 del CAP dimostrano che oltre il 99% dei laboratori americani che vi ha partecipato usava metodiche certificate dallo NGSP e riferiva l'emoglobina glicata come HbA_{1c} od in equivalenti di HbA_{1c} (per coloro che usavano le metodiche in cromatografia di affinità). I valori mediani trovati dai partecipanti erano tutti tra lo 0,4% e l'1,0% dei valori target NGSP, con circa l'80% dei partecipanti che si discostava non più di 0,2-0,3% di HbA_{1c} sul campione a bassa concentrazione e non più dello 0,5% di HbA_{1c} sul campione ad alta concentrazione. Il CV interlaboratorio oscillava dal 1,9% al 9,7%. I metodi Metrika A_{1c} Now, Bayer Advia 1650/2400 ed Olympus sono risultati essere affetti dalla maggiore imprecisione (intesa come variabilità inter-laboratorio), mentre i metodi Bio-Rad D-10, Primus HPLC, Tosoh G7 e Tosoh A_{1c} 2.2 Plus hanno dimostrato un CV interlaboratorio <3,0% ad entrambi i livelli di HbA_{1c}.

Per quanto riguarda l'imprecisione, dato che due dei campioni inviati erano aliquote diverse dello stesso pool di materiale, sono stati ricavati dei dati che hanno dimostrato che oltre il 95% dei laboratori ha riportato uno scostamento non superiore allo 0,5% di HbA_{1c} tra le due misure replicate, con i metodi Bio-Rad Variant e Variant II Turbo, Tosoh G7, e Primus HPLC che hanno riportato il più piccolo scostamento tra le repliche. In generale si è osservato che i metodi in HPLC (sia a scambio ionico che in cromatografia di affinità) hanno dimostrato di avere una minore variabilità rispetto alle metodiche immunochimiche.

Dati più o meno simili si possono ricavare dagli altri programmi di VEQ sopra menzionati. In Italia, i dati raccolti negli ultimi esercizi interlaboratorio a partire dal 2004 dimostrano una variabilità media inter-laboratorio

compresa tra il 4% ed il 7% circa, per valori di HbA_{1c} compresi tra 5,2% e 10,1% (Fig. 1). Non sembra rilevarsi un significativo peggioramento delle prestazioni ai bassi livelli di emoglobina glicata rispetto agli alti livelli. La Fig. 2 riporta il trend dell'accettabilità dei risultati forniti dai partecipanti negli esercizi degli ultimi anni, valutata in base ai già descritti criteri (traguardo minimale di accettabilità per l'errore totale sulla singola misura pari 7,8%; traguardo accettabile, 5,2%; traguardo ottimale 2,6%). Si noti il progressivo miglioramento delle prestazioni analitiche a partire da quando il programma di VEQ intersocietario è stato avviato.

STATO ATTUALE DELLA STANDARDIZZAZIONE DELLE MISURE DELL'EMOGLOBINA GLICATA

A parte il sistema di riferimento implementato dallo NGSP e prima citato, il processo di standardizzazione dell'emoglobina glicata è stato affrontato separatamente in altri paesi. In Svezia ed in Giappone si sono sviluppa-

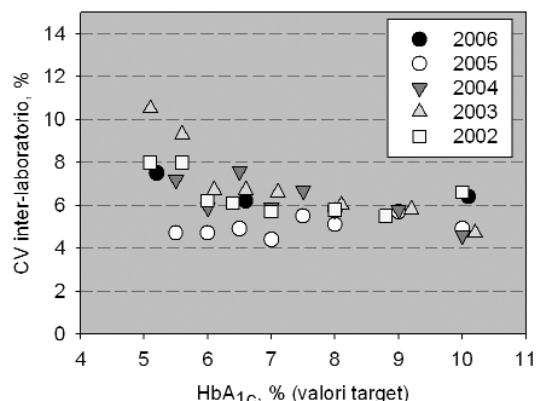


Figura 1 Variabilità inter-laboratorio negli esercizi della VEQ intersocietaria italiana negli ultimi tre anni, in relazione ai livelli di emoglobina glicata nei campioni analizzati

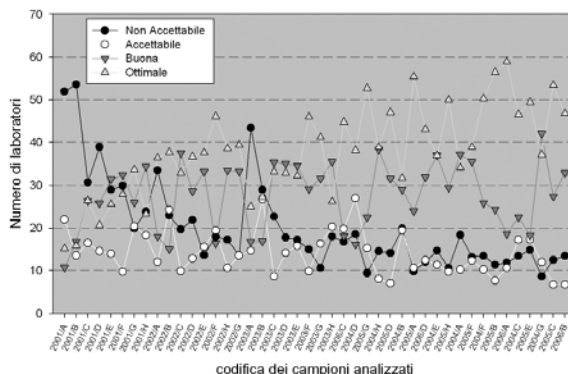


Figura 2 Trend nella accettabilità dei risultati rilevati dalla VEQ intersocietaria a partire dal 2001

ti altri programmi di standardizzazione finalizzati a ridurre la variabilità inter-laboratorio dei risultati sia mediante lo sviluppo di un metodo analitico più altamente risolutivo per la misura dell'HbA_{1c}²³, sia mediante l'assegnazione di titoli di consenso ricavati da laboratori di riferimento²⁴. Infine nel 1995 la IFCC ha istituito un gruppo di lavoro che avesse il compito appunto di armonizzare i risultati della HbA_{1c} a livello globale (IFCC Working Group on HbA_{1c} Standardization;²⁵. Tale gruppo di lavoro ha proceduto a:

- a) produrre materiali altamente purificati di HbA₀ e di HbA_{1c} che potessero servire da base per la preparazione di calibratori²⁶;
- b) sviluppare e validare un metodo di riferimento per l'emoglobina glicata basato sulla digestione proteolitica delle emoglobine mediante endoproteasi Glu-C. I peptidi risultanti dalla digestione, tra i quali gli esapeptidi N-terminali glicati e non glicati delle catene beta, vengono separati e quantificati mediante HPLC e spettrometria di massa, oppure mediante HPLC ed elettroforesi capillare e l'HbA_{1c} calcolata con un algoritmo dal rapporto di tali peptidi²⁷;
- c) raffrontare i risultati ottenuti con la metodica di riferimento rispetto a quelli ottenuti dai metodi nazionali di riferimento (americano, giapponese e svedese), elaborando quindi delle equazioni di conversione ("master equations") che potessero poi in un domani essere utilizzate per convertire tra loro i risultati ottenuti con diversi sistemi di riferimento²⁸;
- d) implementare una rete internazionale di laboratori di riferimento che regolarmente svolge due esercizi all'anno allo scopo di mantenere sempre attivi i metodi di riferimento, aggiornare le relative procedure operative, assegnare titoli ai calibratori ed ai materiali di controllo che di volta in volta vengono preparati e messi a disposizione dei produttori di diagnostici²⁹.

Il metodo sviluppato dal gruppo di lavoro è stato quindi votato dalle società nazionali affiliate e pubblicato come metodo di riferimento IFCC³⁰.

Al momento in cui si sta scrivendo questo rapporto, forse solo un paese al mondo (la Cecoslovacchia) ha adottato come sistema di riferimento quello prodotto dal gruppo IFCC, in quanto, come fatto rimarcare da diverse fonti, l'adozione del sistema di riferimento IFCC comporterebbe un inevitabile abbassamento dei valori numerici di HbA_{1c}, all'incirca pari a 1,3-1,9 unità percentuali di HbA_{1c} nell'intero intervallo fisiopatologico. Questo fatto, che dal punto di vista analitico è facilmente spiegabile in base alla maggiore specificità della metodica di riferimento IFCC rispetto a qualsiasi altra metodica usata come riferimento nei sistemi di riferimento americano, giapponese o svedese, dal punto di vista dell'utilizzo clinico del risultato desta una notevole preoccupazione.

Pertanto all'inizio del 2004 si è costituito un altro gruppo di lavoro per la misura dell'HbA_{1c} (ADA/EASD/IDF Working Group of the HbA_{1c} Assay), costituito prevalentemente da clinici afferenti a tre gran-

di associazioni diabetologiche, l'American Diabetes Association (ADA), l'European Association for the Study of Diabetes (EASD) e l'International Diabetes Federation (IDF) con il compito di vedere come si potesse quindi raggiungere una armonizzazione globale dei risultati dell'HbA_{1c}, alla luce dei traguardi raggiunti dal gruppo di lavoro IFCC. Le conclusioni che tale gruppo ha raggiunto³¹ possono essere così schematizzate:

- 1) Il nuovo sistema di riferimento IFCC deve da subito essere adottato come standard globale per la calibrazione delle metodiche per l'HbA_{1c} a livello dei produttori di diagnostici; la Tab. 1 testimonia in maniera riassuntiva della partecipazione dei maggiori produttori di diagnostici alle attività della rete di laboratori di riferimento IFCC e riassume lo stato dell'arte del loro allineamento ("ancoraggio") al sistema IFCC;
- 2) Il nuovo sistema di riferimento IFCC deve essere utilizzato parimenti per ancorare un processo internazionale di certificazione all'interno delle reti di riferimento dei sistemi secondari di riferimento nazionali prima citati (USA, Giappone e Svezia);
- 3) I produttori di diagnostici sono per il momento caldamente invitati a non cambiare i valori di HbA_{1c} dei loro referti fintanto che non saranno stati completati alcuni nuovi studi clinici (v. sotto)

LA STANDARDIZZAZIONE DELL'HBA_{1c}, DOMANI

Il gruppo di lavoro ADA/EASD/IDF ha successivamente reso noto che, al fine di evitare confusioni tra i diversi modi di intendere la standardizzazione dell'emoglobina glicata, e soprattutto per cercare di aumentare il valore del dato clinico, sulla base della relazione che vi è tra HbA_{1c} e glicemia media giornaliera che è stata oggetto di elaborazioni varie a conclusioni dello studio DCCT³², l'HbA_{1c} potrebbe in un domani essere misurata come tale e quindi refertata in termini di glicemia media giornaliera³³. Dato però che la relazione tra HbA_{1c} e glicemia media giornaliera è stata elaborata principalmente in diabetici di tipo 1, si rende necessario studiare più attentamente tale punto, che è quindi diventato l'oggetto di alcuni nuovi studi prospettici su diverse popolazioni nel mondo.

A tal fine poco prima dell'estate 2005 è stato definito il protocollo di lavoro di uno studio clinico apposito (EASD Equivalence) che verosimilmente si concluderà entro un paio di anni, anche se nelle originarie intenzioni i primi risultati dovrebbero essere presentati al 19° congresso mondiale della IDF a dicembre 2006, e che dovrebbe servire a ridefinire l'utilizzo dell'HbA_{1c} per la valutazione del controllo glicemico a lungo termine nei diabetici di tipo 1 e di tipo 2 (in condizioni di controllo glicometabolico stabile). Si spera che tale studio permetta di rispondere a domande quali le seguenti:

- Che relazione c'è tra glicemia media giornaliera (valutata mediante curva a 7 punti e monitoraggio continuo

Tabella 1

Prestazioni dei principali produttori di diagnostici valutata sulla base di un programma di allineamento al sistema IFCC (IFCC Monitoring Programme 2004-2005), promosso dal coordinatore della Network dei laboratori di riferimento. I produttori sono raggruppati secondo il principio del loro test e sono identificati da codifiche (da 1a a 11). L'elenco dei produttori che hanno partecipato all'esercizio 2004-2005 (non necessariamente nell'ordine delle codifiche) è il seguente: Axis/Shield, Arkray, Bayer, Beckman Coulter, Bio-Merieux, Bio-Rad, Dade Behring, Drew, Menarini, Olympus Diagnostics, Ortho Diagnostics, Primus, Provalis, Roche, Thermo Electron Oy, Tosoh. La riproducibilità è stata valutata col metodo delle analisi replicate, sulla base dei risultati forniti su 12 campioni analizzati in duplicato in tempi diversi durante l'arco di un intero anno. La colonna di destra riporta una stima della linearità delle diverse metodiche, valutata sulla base del coefficiente di correlazione calcolato sulla base dei risultati ottenuti dalle diverse metodiche, rispetto ai risultati attesi sui campioni distribuiti, assegnati ai materiali medesimi mediante il metodo di riferimento IFCC. Si conviene che la linearità è ottimale per valori di $r > 0.9950$ e scarsa per $r < 0.9900$

Produttori di diagnostici		Scostamento medio rispetto al valore target IFCC a 3 livelli di HbA _{1c} (%)			Riproducibilità CV (%)	Linearità r
Principio analitico	codifica	3%	6%	9%		
	1a	0.1	0.2	0.2	1.1	0.9978
	1b	0.0	0.0	0.0	0.6	0.9994
	1c	0.0	0.0	0.0	0.7	0.9992
HPLC	2	0.1	0.1	0.2	0.7	0.9992
	3a	0.1	-0.1	-0.3	2.3	0.9981
	3b	0.2	0.0	-0.2	2.2	0.9971
	3c	0.1	-0.1	-0.2	1.8	0.9972
	4a	-0.1	0.1	0.4	4.7	0.9947
	4b	0.3	0.4	0.6	4.0	0.9950
LPLC	5	0.1	0.0	0.0	1.7	0.9981
	6a	-0.1	-0.2	-0.3	3.6	0.9932
	6b	0.5	0.3	0.0	3.8	0.9279
	6c	0.5	-0.1	-0.6	5.7	0.9408
	7a	-0.2	0.0	0.2	2.5	0.9958
	7b	0.3	0.5	0.7	2.4	0.9970
Immunochimica	8	0.3	-0.1	-0.6	4.5	0.9912
	9a	0.3	0.2	0.2	4.4	0.9926
	9b	0.3	0.2	0.0	4.1	0.9942
	9c	0.4	0.1	-0.1	5.4	0.9727
	10a	0.1	0.2	0.2	0.8	0.9993
	10b	0.1	0.2	0.3	0.9	0.9995
Affinità	10c	0.1	0.1	0.2	2.7	0.9982
	10d	0.3	0.4	0.4	1.5	0.9991
	11	-0.1	0.0	0.1	4.9	0.9952

della glicemia in sottocute) in pazienti diabetici di tipo 1 e di tipo 2?

- La relazione tra glicemia media giornaliera ed HbA_{1c} è uguale in diverse etnie?
- La relazione tra glicemia media giornaliera ed HbA_{1c} è lineare a differenti valori di MBG?
- Variazioni rapide della glicemia, a parità di glicemia media giornaliera, possono far cambiare i valori di

HbA_{1c}?

- La relazione tra glicemia media giornaliera ed HbA_{1c} è stabile anche quando la MBG sale oppure è in fase di diminuzione?
- Farmaci o medicinali vari in che modo alterano tale relazione?
Naturalmente a studio concluso si potrà senza dubbio dare più peso alla misura dell'HbA_{1c} ma ci sono per-

plexità, in ambito laboratoristico, ad accettare la proposta che la glicemia media giornaliera possa essere referata sulla base di una misura dell'HbA_{1c}. A tal proposito il gruppo di lavoro IFCC non si è ancora ufficialmente espresso, ma lo farà probabilmente nei prossimi mesi.

Intanto è da segnalare un documento in via di pubblicazione, elaborato da Gunnar Nordin a nome del comitato IFCC C-NPU (Committee on Nomenclature, Properties and Units). Tale documento propone, sulla base di rigorose considerazioni metrologiche, nuove unità di misura per l'emoglobina glicata, che potrebbero essere utilizzate una volta che venisse deciso il passaggio al nuovo sistema di riferimento IFCC anche nella refertazione dell'HbA_{1c} su esami per pazienti. Le vecchie e consuete unità di % sono infatti da eliminare quanto prima, perchè ambigue (percentuale di che cosa, tutti intendono dell'emoglobina totale, ma in realtà non è esplicitato) e non conformi al sistema S.I.. Le unità che dovrebbero essere invece utilizzate sarebbero le mmol/mol di emoglobina totale. In tale ottica, in un domani un'emoglobina glicata che vale 6,3% in unità tradizionali, sarebbe equivalente a circa 45 mmol/mol (tenendo conto anche della conversione tra misure allineate al sistema di riferimento NGSP e misure allineate al sistema IFCC).

Indubbiamente l'uso di nuove unità di misura ed eventualmente l'utilizzo di un nuovo nome per il test (quest'ultimo ancora in discussione) potrebbe evitare confusioni e disorientamento tra i pazienti qualora si passasse al nuovo sistema di riferimento. Indubbiamente solo con la piena collaborazione tra clinici, laboratoristi, industrie diagnostiche, medici di base, istituzioni pubbliche e tutti gli altri Enti interessati il tanto atteso processo di armonizzazione globale delle misure dell'HbA_{1c} potrà finalmente essere concluso.

E' in fase di preparazione un documento nel quale il gruppo di studio IFCC per la standardizzazione dell'HbA_{1c} esplicherà la sua posizione sui tempi e le modalità del passaggio alla standardizzazione IFCC.

BIBLIOGRAFIA

- Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48: 436-72.
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(Suppl 1):S15-35.
- DCCT 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.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
- Park S, Barrett-Connor E, Wingard DL, Shan J, Edelstein S. GHb is a better predictor of cardiovascular disease than fasting or postchallenge plasma glucose in women without diabetes. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1996;19:450-6.
- Khaw K-T, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, et al. Glycosylated haemoglobin, diabetes and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 2001;322:15-8
- Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Association of Hemoglobin A1c with Cardiovascular Disease and Mortality in Adults: The European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk. *Ann Intern Med*. 2004;141:413-420.
- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 28:S37-S42, 2005
- Ko GT, Chan JC, Yeung VT, Chow CC, Tsang LW, Li JK, So WJ, Wai WP, Cockram CS. Combined use of a fasting plasma glucose concentration and HbA1c or fructosamine predicts the likelihood of having diabetes in high-risk subjects. *Diabetes Care* 1998;21:1221-5.
- U.S. Department of Health and Human Services. National Center for Health Statistics. National Health and Nutrition Examination Survey, III 1988-94, NAHNES III Examination Data File (CD-ROM). Hyattsville, MD: Center for Disease Control and Prevention; 1997
- McQueen JM, comunicazione personale.
- John WG. Haemoglobin A1c: analysis and standardisation. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(9):1199-1212
- <http://www.ukneqas.org.uk/>
- <http://www.euroreflab.com/>
- Valdiguie P, de Graeve J, Corberand JX, Fernet P. 20 years of quality control in clinical laboratories. *Ann Biol Clin* 2000;58:659-61. www.ctcb.com
- <http://www.equalis.se/>
- <http://www.instand-ev.de/>
- <http://www.glicata.org/>
- <http://www.ao-careggi.toscana.it/crrveq/>
- <http://www.eqalm.org/>
- <http://www.cap.org/apps/cap.portal>
- <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp/index.html>
- Arnquist H, Wallensteen M, Jeppsson JO. Standardization of longterm glucose measurements established. *Lakartidningen* 1997;50:4789-90.
- Shima K, Endo J, Oimomi M, Oshima I, Omori Y, Katayama Y. Inter-laboratory difference in HbA1c measurement in Japan. A report of the Committee on an Inter-laboratory Standardization of HbA1c Determination, the Japan Diabetes Society. *J Jpn Diabetes Soc* 1994;37:855-64.
- Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardisation of HbA1c/glycohemoglobin determinations. *JIFCC* 1996; 9:62-7.
- Finke A., Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA1c determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:299-308.
- Kobold U, Jeppsson JO, Dülffer Th, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate Reference Methods for HbA1c based on Peptide Mapping. *Clin Chem* 1997; 43: 1944-51.
- Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John WG, Kobold U, Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M, Wiedmeyer HM. 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.
- <http://www.ifcchba1c.net/>

30. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78–89.
31. Report of the ADA/EASD/IDF Working Group of the HbA1c Assay, London, UK, January 2004. *Diabetologia* 2004;47:R53–4.
32. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: analysis of glucose profiles and HbA1c in the diabetes control and complications trial I. *Diabetes Care* 2002;25:275-8.
33. Sacks DB for the ADA/EASD/IDF Working group for the HbA1c Assay. Global harmonization of hemoglobin A1c. *Clin Chem* 2005;51:681-3.