

Standardizzazione dell'emoglobina glicata nell'ambito dello studio DAI

Andrea MOSCA, Renata PALEARI, per il Gruppo di studio DAI (*)

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

Riassunto. - Vengono riassunti i dati ottenuti da 85 centri antidiabetici partecipanti allo studio DAI, ai quali sono stati distribuiti 8 campioni di controllo liofilati e due calibratori per la misura dell'emoglobina glicata. I materiali sono stati forniti da un laboratorio della rete internazionale della Federazione di Chimica Clinica con titolo allineato al sistema Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Il 75% circa dei centri utilizza metodiche *high-performance liquid chromatography* (HPLC), il 21% metodiche immunochimiche e meno del 5% metodiche in cromatografia di affinità. I dati ottenuti dai centri che hanno completato il lavoro previsto dimostrano che nel 64% dei centri le metodiche sono ben allineate al sistema di riferimento DCCT. La riproducibilità delle metodiche, oscilla dal 3,7 al 5,8% (in termini di coefficiente di variazione, %), e deve pertanto essere oggetto di ulteriori sforzi.

Parole chiave: emoglobina glicata, standardizzazione, controllo di qualità.

Summary (*Standardization of glycosylated hemoglobin within the DAI study*). - The results obtained from 85 antidiabetic centers enrolled in the DAI study are presented with regard to the external quality assessment scheme for glycohemoglobin. The materials have been prepared by a laboratory of the network of reference laboratories of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). To each control a Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) traceable target value was assigned. The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods for glycohemoglobin are used in 75% of the centers, the immunochemical techniques in 21% and less than 5% is using affinity chromatography based methods. The data collected from the laboratories who completed the set of measurements show that 64% of the centers are well aligned to the DCCT system. The reproducibility of the methods varied between 3.7 and 5.8% (as CV, %) and has to be improved.

Key words: glycosylated hemoglobin, standardization, quality control.

(*) La composizione del Gruppo di studio DAI è riportata prima della Bibliografia.

Introduzione

In ambito diabetologico, tra i parametri di laboratorio la cui trasferibilità pone maggiori difficoltà, sicuramente al primo posto c'è il test dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) che da tempo è riconosciuto il migliore indicatore del controllo glicometabolico a medio-lungo termine anche alla luce del fatto che livelli alti di HbA_{1c} sono associati a maggior rischio di danno cardiovascolare anche in soggetti non diabetici [1, 2]. Diversi studi, a livello nazionale [3, 4] ed internazionale [5], dimostrano purtroppo che la variabilità inter-laboratorio per la misura dell'HbA_{1c} è ancora discretamente elevata (coefficienti di variazione (CV) compresi tra il 4% ed il 9% circa), anche per utenti della stessa metodica analitica. Ne consegue

che, se da un punto di vista clinico l'utilizzo dell'HbA_{1c} è fortemente raccomandato per la sorveglianza dei diabetici, il suo possibile utilizzo ai fini diagnostici non è ancora stato accettato.

Nell'ambito dello studio DAI [6] si è voluto pertanto porre particolare attenzione alla raccolta dei dati di laboratorio relativi alla misura dell'emoglobina glicata ed alla loro armonizzazione, operazione possibile anche se le metodiche analitiche sono basate su diversi principi purché si disponga di materiali di calibrazione commutabili con i campioni dei pazienti. A tal fine all'interno dello studio DAI è stato messo a punto un protocollo a parte mirato alla standardizzazione dell'emoglobina glicata in tutti i centri antidiabetici partecipanti ed i risultati ottenuti in un anno di lavoro sono riassunti in questo lavoro.

Materiali e metodi

A maggio 2001 sono stati distribuiti a 190 centri arruolati nello studio DAI otto controlli liofilici (A-H) e due calibratori (Cal 1 e Cal 2) costituiti da emolisi stabilizzati di origine umana, prodotti sotto forma liofila da parte di un laboratorio della rete internazionale dei laboratori di riferimento per l'emoglobina glicata [7]. Tali materiali, una volta ricostituiti con acqua distillata, presentano identiche caratteristiche di matrice rispetto ai campioni di sangue, sono molto stabili e possono essere utilizzati per la calibrazione di diverse metodiche analitiche grazie alla loro completa commutabilità. Di fatto questi materiali sono gli attuali materiali secondari di riferimento per l'emoglobina glicata. Dei 190 centri ai quali sono stati distribuiti i materiali, 130 hanno contattato gli organizzatori del programma di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ), e di questi 85 hanno fornito i risultati delle misure effettuate sui materiali distribuiti. I rimanenti 45 centri hanno segnalato gli estremi dei laboratori nei quali vengono effettuate le analisi dell'emoglobina glicata. La Tab. 1 mostra i valori di HbA_{1c} dei vari materiali distribuiti ai partecipanti ed il calendario delle prove. Il titolo di HbA_{1c} era stato precedentemente assegnato dal laboratorio della rete mediante metodica *high-performance liquid chromatography* (HPLC) certificata, allineata al metodo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). La tolleranza del titolo è tipicamente attorno a 0,1 - 0,2 unità di HbA_{1c} (percentuale sul totale delle emoglobine eritrocitarie).

Si noti che i materiali A e C, ed i materiali E e G avevano gli stessi valori di HbA_{1c}, di fatto essendo aliquote diverse degli stessi lotti. Questo era stato appositamente preparato al fine di poter valutare la reale riproducibilità tra-le-serie dei centri che erano chiamati ad analizzare gli stessi lotti in tempi diversi.

In sintesi, si chiedeva quindi ai partecipanti di analizzare i calibratori Cal 1 e Cal 2, di calibrare le

proprie metodiche con tali materiali, e di analizzare i controlli A-H secondo le scadenze di cui alla Tab. 1, per un totale di quattro esercizi distribuiti nell'arco di un anno, e di inviare al termine di ogni scadenza i risultati via fax al coordinatore della ricerca.

Al fine di rispettare la privacy, come previsto dalle attuali raccomandazioni per gli organizzatori dei programmi di VEQ [8], i codici dei laboratori sono stati arbitrariamente attribuiti con un processo di randomizzazione e non sono in alcun modo riconducibili ai codici di identificazione dei centri nello studio DAI.

Risultati

La Tab. 2 mostra la distribuzione delle metodiche analitiche utilizzate presso gli 85 centri antidiabetici dello studio DAI che hanno fornito risultati. Alcuni centri hanno, tuttavia, cambiato metodica analitica durante lo svolgimento del programma o hanno effettuato analisi in duplicato su un altro strumento, tipicamente per effettuare un controllo interno tra il dato del centro antidiabetico e quello del laboratorio analisi della struttura di appartenenza. Si è quindi confermato quanto noto da studi precedenti, cioè il fatto che la maggior parte dei centri utilizza metodiche di tipo HPLC, anche se una parte non trascurabile utilizza metodiche di tipo immunochimico automatizzate (Roche) o con apparecchio dedicato (Bayer).

La Fig. 1 mostra i dati grezzi ottenuti da tutti i partecipanti nell'arco del programma di VEQ per l'emoglobina glicata. Nelle ascisse sono riportati i codici degli esercizi e dei relativi materiali (I esercizio, campione A, prima misura, ecc.). Visivamente si apprezza una significativa variabilità dei risultati relativi agli stessi campioni, con valori che, in certi casi (ad es. campione H) oscillano anche di 3 unità percentuali di HbA_{1c}.

Tabella 1. - Materiali di calibrazione e di controllo utilizzati per la standardizzazione della HbA_{1c}

Materiali	Utilizzo	HbA _{1c} (%) valore assegnato	Periodo di analisi
Cal 1 Cal 2	Come calibratori	5,7 10,0	Entro il 9.6.2001
A B C D E F G H	Come controlli per la VEQ	6,9 5,3 6,9 5,9 8,9 7,9 8,9 9,6	21.5.2001 - 9.6.2001 (A + E) 10.9.2001 - 29.9.2001 (B + F) 25.2.2002 - 16.3.2001 (C + G) 10.12.2001 - 29.12.2001 (D + H)

Tabella 2. - Metodiche analitiche utilizzate nei centri DAI per la misura dell'emoglobina glicata nel sangue

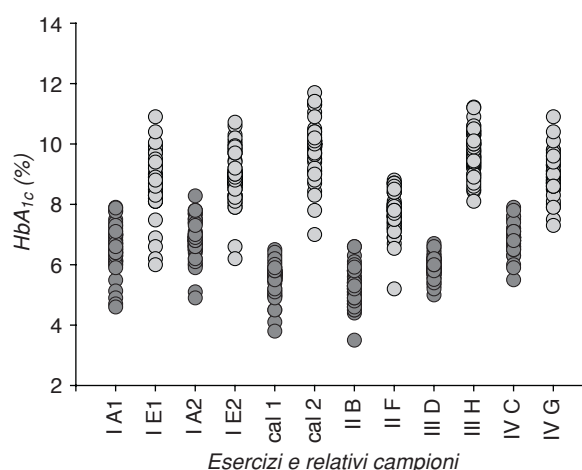
Tipologia di metodo	Ditta produttrice	n.	(%)
HPLC	Bio-Rad laboratories	30	35,3
	Bracco Merck-Hitachi	4	4,7
	Eurogenetics Tosoh	8	9,4
	Kontron Bio-tek	1	1,2
	Menarini	21	24,7
Immunochimiche	Bayer DCA 2000	7	8,2
	Roche	11	12,9
Affinità	Abbott IMx	2	2,4
	Helena	1	1,2

HPLC: *high-performance liquid chromatography*.

La Fig. 2 mostra i risultati più significativi, cioè quelli ottenuti dai centri che utilizzavano tutti la stessa metodica analitica, in un numero minimo di 5 centri per metodica. I risultati ottenuti dimostrano un lieve miglioramento della variabilità inter-laboratorio dopo la calibrazione e provano che i valori medi ottenuti dai partecipanti sono abbastanza vicini ai valori DCCT assegnati ai materiali, a riprova che l'accuratezza media è abbastanza buona a tutte le concentrazioni di HbA_{1c} testate.

La Tab. 3 mostra i risultati relativi a tre dei campioni analizzati, particolarmente significativi per avere concentrazioni di HbA_{1c} di particolare interesse clinico (campione A: HbA_{1c} moderatamente elevata; B: HbA_{1c} normale; G: HbA_{1c} molto alta). E' possibile notare come la variabilità intra-metodica sia diversa a seconda della metodica analitica, con CV compresi tra 2,8 e 12,4%. Nonostante le diverse metodiche siano state allineate con materiali di calibrazione comuni, alcune di esse mostrano una variabilità tra laboratori ancora piuttosto elevata. In particolare tre diversi sistemi HPLC mostrano CV maggiori del 10% e uno dei due metodi immunochimici presenta un CV attorno a 8% per tutti i campioni. La variabilità globale tra le misure di tutti i partecipanti è mediamente attorno al 6% per i campioni con livelli di HbA_{1c} patologici, mentre è leggermente più elevata per il campione con concentrazione di HbA_{1c} normale. Gli stessi dati sono rappresentati in maniera più sintetica nella Fig. 3, da cui forse emerge più chiaramente come anche per stesse metodiche analitiche, e tipicamente per quelle HPLC, si possono osservare variabilità significativamente discrete tra campioni diversi.

Per quanto riguarda infine la riproducibilità nella Fig. 4 sono riportate le differenze tra le misure effettuate sulle coppie di campioni, come dato assoluto, e come CV inter-serie calcolato dai duplicati. I risultati dimostrano che la riproducibilità del risultato oscilla dal 3,7 al 5,8% circa.

**Fig. 1.** - Risultati relativi a tutti i materiali distribuiti ai centri partecipanti al programma di VEQ.

In sintesi, l'analisi dei risultati ottenuti dimostra quindi che nei 39 centri che hanno portato a completamento il lavoro richiesto, analizzando almeno 8 o più di 8 dei 10 campioni loro inviati, il 64% (25) sono ben allineati al sistema DCCT, il 10% (4) è allineato almeno su un valore di emoglobina glicata, mentre il 26% (10) misura l'emoglobina glicata con uno scostamento, rispetto al valore assegnato, superiore all'errore totale ammissibile (6,2%, valore relativo).

Per quanto riguarda invece gli altri 46 centri, che hanno svolto solo una parte minore del lavoro richiesto (su 7 o meno dei 10 materiali inviati), l'eventuale correzione dei risultati sulla base delle rette di regressione calcolate dai dati sperimentali forniti avrà un livello di incertezza superiore. Sarà quindi opportuno coinvolgere tali laboratori in un esercizio integrativo per accertarsi che l'allineamento possa essere ritenuto valido per l'intera durata dello studio DAI.

Tabella 3. - Risultati per metodica e generali, relativi ai campioni 2001/A, B e G. Sono riportati i risultati delle metodiche utilizzate da almeno 5 centri

	Metodo	n. utenti	HbA _{1c} (%)			CV (%)
			Media	DS	Range min-max	
Campione 2001/A						
HPLC	Bio-Rad Diamat	4	6,9	0,7	6,0-7,7	10,1
	Bio-Rad Variant	7	6,9	0,4	6,5-7,8	6,0
	Bio-Rad Variant II	11	6,7	0,2	6,4-6,9	3,0
	Eurogenetics Tosoh	6	7,0	0,2	6,8-7,3	2,8
	Menarini HA 8121	5	6,8	0,4	6,0-7,1	5,9
	Menarini HA 8140	15	6,6	0,3	5,9-6,9	4,5
Immunoc.	Bayer DCA 2000	4	7,4	0,3	7,1-7,7	4,1
	Roche tina-quant	8	7,1	0,5	6,6-7,8	7,0
	Tutti i partecipanti	60	6,8	0,4	5,9-7,8	5,9
	Valore assegnato DCCT	-	6,9	-	-	-
Campione 2001/B						
HPLC	Bio-Rad Diamat	3	4,8	0,2	4,6-5,0	4,2
	Bio-Rad Variant	7	5,4	0,6	4,6-6,6	11,1
	Bio-Rad Variant II	12	4,9	0,3	4,4-5,6	6,1
	Eurogenetics Tosoh	5	5,0	0,2	4,8-5,3	4,0
	Menarini HA 8121	3	5,3	0,2	5,1-5,4	3,8
	Menarini HA 8140	11	5,0	0,3	4,5-5,4	6,0
Immunoc.	Bayer DCA 2000	6	5,6	0,2	5,3-5,8	3,6
	Roche tina-quant	7	5,7	0,5	4,8-6,3	8,8
	Tutti i partecipanti	54	5,2	0,5	4,4-5,6	9,6
	Valore assegnato DCCT	-	5,3	-	-	-
Campione 2001/G						
HPLC	Bio-Rad Diamat	1	9,0	-	-	-
	Bio-Rad Variant	4	8,3	0,3	8,0-8,7	3,6
	Bio-Rad Variant II	9	8,7	0,6	7,5-9,3	6,9
	Eurogenetics Tosoh	4	9,1	0,5	8,6-9,6	5,5
	Menarini HA 8121	4	8,9	1,1	7,3-9,7	12,4
	Menarini HA 8140	7	8,7	0,4	7,9-9,0	4,6
Immunoc.	Bayer DCA 2000	5	9,5	0,3	9,1-9,8	3,1
	Roche tina-quant	4	9,1	0,7	8,7-10,1	7,7
	Tutti i partecipanti	38	8,9	0,6	7,3-10,1	6,7
	Valore assegnato DCCT	-	8,9	-	-	-

HPLC: *high-performance liquid chromatography*; DCCT: *diabetes control and complications trial*.

Discussione

$$ET_a = \text{bias} + 1,96CV_a$$

La valutazione della qualità delle analisi di laboratorio viene generalmente valutata sulla base dei risultati di prove di precisione, di accuratezza ed altro, ma spesso non si valuta con sufficiente attenzione l'aspetto dei traguardi analitici. Da questo punto di vista, è opportuno rammentare che le teorie correnti in campo laboratoristico utilizzano, per la definizione dei traguardi analitici di precisione e di accuratezza, i dati basati sulla variabilità biologica dei test. A tal fine si tenga presente che l'errore totale ammissibile (ET_a) viene normalmente calcolato con la formula

dove $\text{bias} = 1/4(CV_B^2 + CV_W^2)^{1/2}$ e CV_a , CV_B e CV_W sono, rispettivamente, il coefficiente di variazione analitico, quello della variabilità intra-individuale e quello della variabilità inter-individuale [9]. Non è semplice, nel caso dell'emoglobina glicata, trovare consenso sui valori di CV_B e CV_W , soprattutto trattando di soggetti diabetici in vario grado di possibile controllo glicometabolico. In uno dei primi lavori su questo punto Phillippou [10] ha riportato valori di CV_W variabili tra il 4,2% (soggetti diabetici in buon controllo) e 9,8% (soggetti in cattivo controllo).

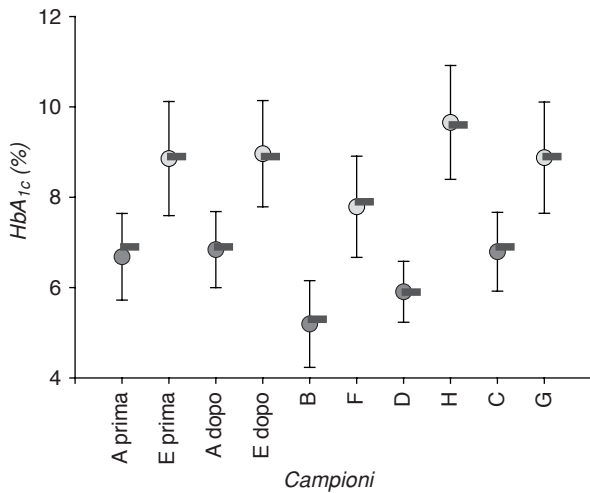


Fig. 2. - Risultati (medie e range a 2 DS) ottenuti da 74 centri con metodiche presenti in almeno 5 centri. Le barrette orizzontali indicano, per ogni materiale, il valore assegnato con metodo di riferimento riferibile allo studio Diabetes Control and Complications Trial (DCCT).

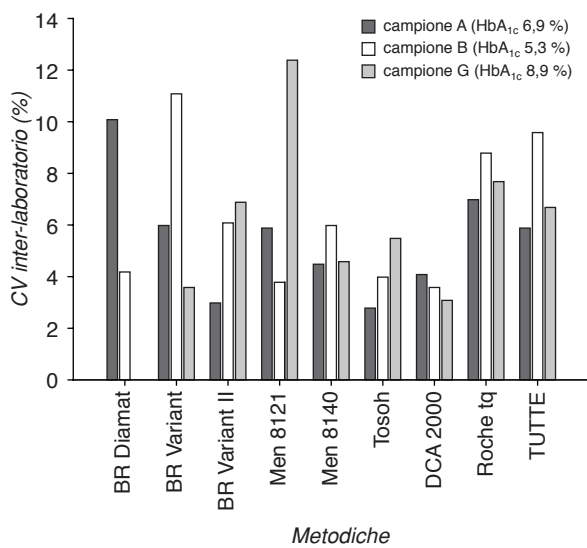


Fig. 3. - Variabilità per utenti dello stesso metodo e variabilità totale rilevate su tre campioni (A, B, G) con valori di emoglobina glicata di particolare rilievo clinico.

Successivamente Trapè *et al.* [11] hanno segnalato variabilità comprese tra 3,9% e 7,9% in un gruppo di 42 soggetti con diabete di tipo 2 clinicamente stabile. Vari autori concordano invece che la variabilità intra-individuale è, in condizioni di equilibrio, molto ridotta (CV_B attorno a 1%) [12, 13].

Considerando come limite di imprecisione un valore di CV_a pari a 2,5%, ormai accettato in più ambiti, e prendendo come valore di CV_w un dato medio pari al 5%, il traguardo desiderabile per l'errore totale della misura dell'HbA_{1c} risulta essere pari a 6,2%.

Con queste premesse si può quindi disporre anche di una chiave di lettura per i risultati di un programma esterno di qualità quale quello svolto all'interno dello studio DAI. A questo proposito si può dire che è possibile allineare le misure dell'emoglobina glicata ottenute nei diversi centri antidiabetici anche con metodiche analitiche tra loro differenti, effettuando una calibrazione comune ma anche con una correzione a posteriori dei dati centro per centro. Questa operazione permette quindi di poter confrontare su una base comune i dati forniti dai partecipanti attivi, mentre evidentemente nulla è possibile dire sull'allineamento al sistema DCCT dei centri che non hanno finora fornito alcun risultato.

Con riferimento in particolare ai risultati ottenuti dai vari centri, si possono fare le seguenti considerazioni. Per i centri che hanno dimostrato un allineamento parziale, tutti utilizzatori di sistemi HPLC, è possibile una correzione a posteriori dei dati relativi alle misure su pazienti, utilizzando le rispettive rette di

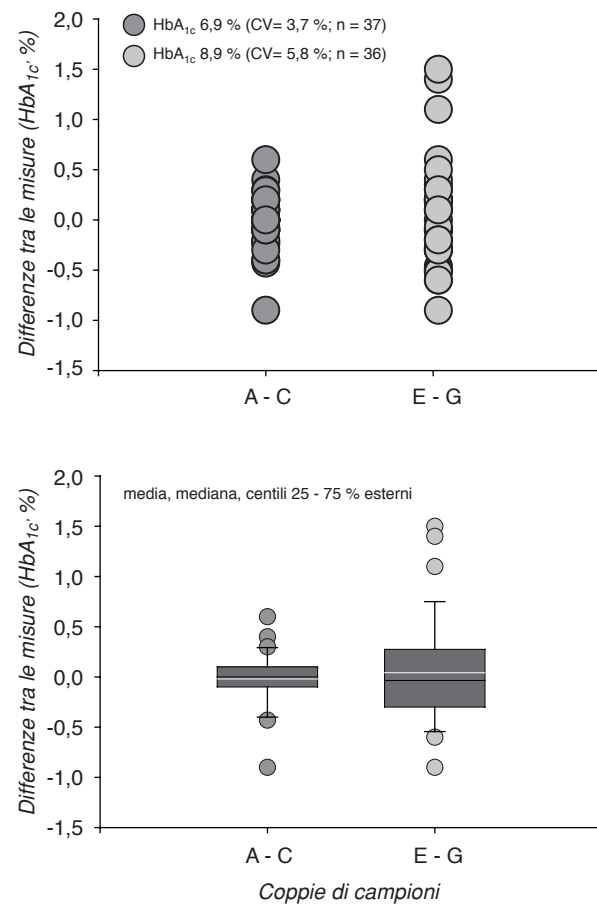


Fig. 4. - Analisi della riproducibilità tra-le-serie valutata dalle differenze tra le misure replicate effettuate sulle coppie di campioni A - C ed E - G, analizzati nell'arco di un anno.

Tabella 4. - Punti chiave per una buona esecuzione della determinazione della HbA_{1c}

1. Risultato dell'analisi	Deve essere espresso come HbA _{1c} % (equivalenti DCCT)
2. Riproducibilità della metodica	Deve essere valutata sia entro- che tra-le-serie Utilizzare metodiche con CV _{tot} < 2,5 %
3. Calibrazione	Effettuare la calibrazione a due punti Utilizzare materiali di calibrazione con titolo di HbA _{1c} assegnato con metodica certificata DCCT Va effettuata con la metodica sotto controllo
4. Controllo interno di qualità	Ogni serie analitica deve comprendere misure su materiali di controllo, almeno a due livelli Per la valutazione dei risultati utilizzare regole (ad es. le regole di Westgard)
5. Valutazione esterna di qualità	La partecipazione a programmi di valutazione esterna di qualità è fortemente consigliata Rappresenta il miglior modo per valutare l'attendibilità nel tempo delle proprie misure di HbA _{1c}

regressione. E' noto agli autori infatti che diversi utilizzatori di metodiche HPLC utilizzano fattori di calibrazione metodo-dipendenti ed è stato dimostrato [3] che, per questi casi, è possibile e corretto effettuare una calibrazione comune sui dati già raccolti. I dati relativi ai centri utilizzatori di metodiche immunochimiche con allineamento parziale al DCCT vanno presi con cautela ed abbisognano di alcune verifiche, soprattutto mirate ad escludere un uso non appropriato dei materiali di controllo (la precedente esperienza ha dimostrato che in taluni casi, soprattutto con metodiche immunochimiche, l'uso dei controlli liofilici richiede ad esempio l'utilizzo di diluenti appositi). Una considerazione analoga vale per l'unico centro con metodica in cromatografia d'affinità (centro n. 44), con l'aggiunta che gli autori sconsigliano l'utilizzo di questa metodica perché non rispondente agli attuali traguardi di imprecisione.

E' comunque importante sottolineare che i centri dovrebbero partecipare in maniera continuativa ad un programma di valutazione esterna di qualità, perché non è affatto garantito che l'allineamento al sistema DCCT, ottenuto nell'ambito del presente progetto possa essere mantenuto anche a distanza di tempo e nell'ambito di contesti diversi (ad esempio quelli derivanti dal cambio di metodica analitica o di deterioramento delle prestazioni analitiche delle metodiche utilizzate al tempo dello studio DAI). Esiste al momento, ed è sempre aperta l'adesione, un programma permanente di valutazione esterna della qualità per l'emoglobina glicata patrocinato dalle società scientifiche di laboratorio (Associazione Italiana Patologi Clinici, Società Italiana di Biochimica Clinica e di Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) e Società Italiana di Medicina di Laboratorio) e di diabetologia (Associazione Medici Diabetologi, Società

Italiana di Diabetologia) con il quale è possibile verificare a cadenza regolare l'allineamento al sistema DCCT (www.glicata.org). E' anche opportuno ricordare che la partecipazione attiva ad un programma di valutazione esterna di qualità è sicuramente un fatto positivo per il laboratorio, e che tale misura deve essere comunque accompagnata da una serie di altre prassi che sono sinteticamente riassunte nella Tab. 4.

Infine, vorremmo cogliere l'occasione per rammentare che la Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha recentemente votato ed approvato un nuovo metodo di riferimento per la misura dell'emoglobina glicata [14] che costituirà il futuro standard a livello internazionale. La nuova metodica, sviluppata unitamente alla messa a punto di nuovi materiali di calibrazione e di controllo, permetterà una effettiva armonizzazione globale delle tecniche di misura dell'HbA_{1c}, di cui verrà data ampia notizia in collaborazione tra le Società di Medicina di Laboratorio, le Società di Diabetologia, le industrie diagnostiche interessate e tutti i laboratori di analisi ed i centri antidiabetici. L'adozione del nuovo sistema di riferimento imporrà necessariamente una revisione degli intervalli di riferimento, ed una conversione dei risultati finora raggiunti affinché le preziose informazioni su questo parametro maturate nel corso degli ultimi 20 anni circa non vadano perse. Sono già allo studio incontri e documenti di consenso per poter effettuare la transizione al nuovo sistema di riferimento nella maniera più rapida ed efficace.

Rigraziamenti

Lo studio è stato parzialmente finanziato attraverso la convenzione ISS-Ministero della Salute "Programma speciale di ricerche in farmacoepidemiologia"

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 28 maggio 2003.

Componenti del Gruppo di studio DAI

Comitato scientifico: A. Avogaro, C. Giorda, M. Maggini, E. Mannucci, R. Raschetti, S. Turco, M. Velussi.

Gestione dei dati: R. Da Cas, E. Sarli.

Registrazione dei dati: C. Crescioli, A. De Bellis, F. Iacovino, L. Ianni, A. Mencucci, A. Pezzatini, E. Pierazzuoli, L. Pala, I. Sposato.

Analisi dei dati: A. Avogaro, C. Giorda, M. Maggini, E. Mannucci, R. Raschetti, S. Turco, M. Velussi, S. Spila Alegiani.

Centri clinici: La lista di tutti i medici partecipanti allo studio è riportata nella pubblicazione: "The DAI prospective study on macrovascular complications in patients with type 2 diabetes. Characteristics of the study population" *Ann Ist Super Sanità* 2001;37:289-96. (www.iss.it).

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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;392:837-53.
3. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M. A re-evaluation of glycohaemoglobin standardization: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:243-8.
4. Mosca A, Paleari R. Standardizzazione dell'emoglobina glicata: rapporto sugli ultimi tre anni di attività. *Biochim Clin* 1998;22:645-9.
5. Weykamp CW, Penders CG, Petersen PH. A comparison of analytical goals for haemoglobin A1c assays derived using different strategies. *Ann Clin Biochem* 1991;28:272-278.
6. The DAI study group. The DAI prospective study on macrovascular complications in patients with type 2 diabetes. Characteristics of the study population. *Ann Ist Super Sanità* 2001;37:289-96.
7. Weykamp CA, Penders TJ, Muskiet FAJ, van der Slik W. Evaluation of a reference material for glycated haemoglobin. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:67-72.
8. Ceriotti F, per il Consiglio Direttivo SIBioC. Requisiti minimi dei Programmi di VEQ. Documento per la concessione del patrocinio SIBioC ai programmi di VEQ. *Biochim Clin* 2001; 25:463-5.
9. Brambilla S, Pagani A, Luraschi P, Infusino I, Franzini C. Variabilità biologica intra- ed inter-individuale: aggiornamento. *Biochim Clin* 2000;24:167-74.
10. Phillipou G, Phillips PJ. Intraindividual variation of glycohemoglobin: implications for interpretation and analytical goals. *Clin Chem* 1993;39:2305-8.
11. Trapè J, Aliart ML, Brunet M, Dern E, Abadal E, Queralto JM. Reference change value for HbA1c in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:283-7.
12. Howey JE, Bennet WM, Browning MC, Jung RT, Fraser CG. Clinical utility of assays of glycosylated haemoglobin and serum fructosamine compared: use of data on biological variation. *Diabetic Med* 1989;6(9):793-6.
13. Kilpatrick ES, Maylor PW, Keevil BG. Biological variation of glycated hemoglobin. Implications for diabetes screening and monitoring. *Diabetes Care* 1998;21:261-4.
14. 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 HbA_{1c} in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.