

Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina

Palabras clave: Diabetes mellitus, glicohemoglobina, GHB, HbA1c, NGSP.

Key words: Diabetes mellitus, glycohemoglobin, GHB, HbA1c, NGSP.

Recibido: 07/07/2006
Aceptado: 10/07/2006

Arturo M. Terrés-Speziale*

* Director ejecutivo de Asesoría, Investigación y Desarrollo

Correspondencia:
Dr. Arturo M. Terrés Speziale
Asesoría, Investigación y Desarrollo
Blvd. Adolfo López Mateos 2109-501
01710 México, D.F.
www.qualitat.com.mx
E-mail: aterres@aidmx.com

Resumen

Antecedentes: En tres estudios internacionales multicéntricos llevados a cabo en la década pasada en los Estados Unidos (DCCT), Inglaterra (UKPDS) y Japón (Kumamoto) se demostró claramente que el riesgo para el desarrollo y la progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus está estrechamente relacionado con el grado de control de la glicemia, lo que se puede evaluar de manera confiable sobre la base de determinaciones de la glicohemoglobina HbA1c en forma trimestral. Una nueva disposición del Código de la Salud de la Ciudad de Nueva York –donde los ancianos, los negros, los hispanos y los miembros de algunos otros grupos étnicos son desproporcionadamente afectados– entró en efecto en enero de 2006, obligando a los laboratorios clínicos a informar los resultados de HbA1c al Consejo de Salubridad de la Ciudad como un método para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica de diabetes mellitus, utilizando métodos certificados por el *Nacional Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). **Objetivo:** Revisar los antecedentes, fundamentos, estructura e implicaciones del NGSP para orientar a los profesionales del laboratorio clínico en la selección y utilización de métodos para la determinación de HbA1c. **Método:** Este es un trabajo retrolectivo en el que, para alcanzar el objetivo planteado, durante el segundo trimestre del año 2006 nos abocamos a revisar, estudiar y discutir la información bibliográfica básica disponible. **Resultados:** Para la vigilancia epidemiológica de la diabetes mellitus, se exige la utilización de métodos certificados por el NGSP. El propósito de este

Abstract

Background: In three multicentric international studies that were carried out in the United States (DCCT), England (UKPDS) and Japan (Kumamoto) it was clearly demonstrated that the risk for the development and the progression of the chronic complications of diabetes mellitus is closely related to the degree glycemic control, that can be reliably evaluated through glycohemoglobin HbA1c determinations quarterly. A new disposition of the health board in New York City –where old ones, Afro Americans, Hispanics, and the members of some other ethnic groups are severely affected–, entered in effect on January of 2006 forcing the clinical laboratories to inform the results into HbA1c to the Health Department of the City, as an effective method to monitor the DM epidemic, using only certified National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) methods. **Goal:** To review the antecedents, foundations, structure and implications of NGSP in order to orient Clinical Laboratory Professionals on the procedure selection and use of methods for the determination of HbA1c. **Method:** This it is a revision work that was developed during the second trimester of year 2006, when we led ourselves to review, to study and to discuss basic the bibliographical information of available documents. **Results:** For the epidemiological monitoring of DM, the use of methods certified by NGSP is demanded. The intention of this program is standardize GHB test procedures so that clinical laboratory results may be comparable to DCCT where the correlation of hyperglucemia with the chronic complications risk

programa es el de estandarizar los resultados de la prueba de la glicohemoglobina (GHB) para que los resultados clínicos del laboratorio sean comparables al ensayo de las complicaciones del proyecto denominado DCCT, donde se estableció la correlación de la hiperglucemia con el riesgo de sufrir complicaciones crónico-degenerativas. El hecho de que existan muchos métodos para la determinación de la GHB hace necesaria la estandarización en la industria del diagnóstico y entre los laboratorios clínicos, ya que de otra manera no se podrá alcanzar el uso óptimo de esta prueba. Estudios recientes han demostrado la necesidad, las ventajas y la viabilidad de llevar a cabo la estandarización de los métodos para el análisis de GHB con base en la trazabilidad hacia el método de referencia que es el método cromatográfico en el cual no sólo se informa una cifra porcentual, sino que es posible detectar y cuantificar la presencia de hemoglobinopatías. **Discusión:** Es deseable que los laboratorios utilicen solamente los métodos de comprobación de la prueba de HbA1c que han acreditado la certificación. Es también deseable que todos los laboratorios que realizan la determinación de HbA1c participen a su vez en verificaciones de aptitud similares a las del Colegio Americano de Patólogos que comenzó en 1996, utilizando especímenes de sangre entera. La meta para los pacientes en general es un nivel de 6 a 7%, sin importar el tipo del método de comprobación, todos los resultados se deben divulgar como porcentaje de HbA1c.

was settled. Since many methods for the determination of the GHB are available, standardization in the industry is necessary for the diagnosis, also inter laboratories proficiency testing is recommended. Recent studies have demonstrated the necessity, the advantages and the viability to carry out methodological standardization for GHB analysis. Traceability towards the chromatographic reference method is required. Reference method is preferred because it allows to detect and to quantify the presence of hemoglobinopathies. **Discussion:** It is desirable that the laboratories use only certified methods for HbA1c. It is also desirable that all the laboratories that perform the test HbA1c participate on Proficiency Testing such as the CAP scheme that has been running since 1996 using whole blood as preferred specimen. The therapeutic goal for patient control is a level of 6 to 7 percent. With respect to any type of method for testing, results are required to disclose the report as the percent of HbA1c.

Antecedentes

Diabetes mellitus (DM) es la primera causa de muerte en México. Se trata de una enfermedad que no distingue edad, sexo, raza, ni condición socioeconómica. Diabetes mellitus es un serio problema de salud pública. Actualmente, se estima que de 5 a 10% de los mexicanos son diabéticos y que de 10 a 20% tienen intolerancia a la glucosa.¹ La variabilidad de los porcentajes mencionados depende básicamente de dos variables, la edad y el sexo, siendo más frecuente en mujeres a partir de los 40 años. Se calcula que en general afecta a 8.2% de la población entre 20 y 69 años y que cuando menos 30% de los pacientes ignoran que la padecen; en nuestro país existen más de cuatro millones de pacientes diagnosticados y se calcula que cuando menos hay

un millón más en los que aún no se ha establecido el diagnóstico.²

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por deficiencia real o relativa de insulina, hiperglicemia y alto riesgo para el desarrollo de problemas crónico-degenerativos en todo el organismo que se manifiestan preferentemente en ojos, riñones, nervios periféricos, corazón y vasos sanguíneos. La diabetes mellitus es una enfermedad que evoluciona silenciosamente durante más de 20 años, a través de un síndrome de envejecimiento prematuro hasta producir una serie de problemas y complicaciones que pueden llevar a la muerte incluyendo:

- Neurológicas: neuropatía periférica y accidente vascular cerebral
- Ceguera: retinopatía y cataratas

- Cardíacas: aterosclerosis e infarto
- Vasculares: gangrena
- Renales: insuficiencia renal

Por razones genéticas, sumadas a las ambientales y culturales, la enfermedad es más frecuente en mexicanos que radican en los Estados Unidos de Norteamérica, donde se calcula que afecta a 16 millones de personas. La enfermedad además de frecuente es costosa. En términos de sufrimiento y dinero se estima que aproximadamente uno de cada siete dólares del cuidado médico pagados en los Estados Unidos va al cuidado de la diabetes mellitus, sobre todo para el tratamiento de las complicaciones crónicas. En los Estados Unidos, es la causa más común de ceguera en adultos jóvenes, de insuficiencia renal y de amputación no traumática de extremidades.⁴⁻⁷

Estudios clínicos, longitudinales, multicéntricos, prospectivos, aleatorios, bien controlados, de reconocida importancia y trascendencia han sido llevados a cabo durante las dos últimas décadas en tres partes del mundo:

1. Estados Unidos: DCCT (*Diabetes Control And Complications Trial*).
2. Inglaterra: UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*).
3. Japón: Kumamoto. *Study of Optimal Diabetes Control in Type 2 Diabetes Mellitus*.

En ellos se demostró claramente que el riesgo para el desarrollo y la progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus está estrechamente relacionado con el grado de control de la glicemia, lo que se puede evaluar de manera confiable sobre la base de determinaciones de la glicohemoglobina HbA1c en forma trimestral.⁸

Los tres estudios mencionados, proporcionaron una sólida evidencia sobre la correlación de los niveles de HbA1c con los niveles de glucosa promedio del trimestre previo (GPT) y con las complicaciones crónico-degenerativas. En resu-

men, podemos concluir que en los tres estudios quedó demostrado que por cada cambio de 1% en HbA1c ocurre un cambio de aproximadamente 35 mg/dL de glicemia promedio trimestral y que la disminución de 1% en HbA1c produce una reducción de 25% en la morbilidad y mortalidad. De tal manera que ya no queda duda sobre la importancia de la evaluación de la glicohemoglobina HbA1c, la cual:

- Refleja la concentración promedio de glucosa sanguínea de más de 120 días.
- Refleja el estado del paciente diabético tres meses previos a la evaluación.
- Tiene un enorme potencial para el diagnóstico temprano de diabetes mellitas.
- Es el mejor indicador de la terapia del paciente diabético.
- Es el indicador temprano de enfermedades crónicas degenerativas.
- Es un excelente marcador biológico para la vigilancia epidemiológica.

Vigilancia epidemiológica

Una nueva disposición del Código de la Salud de la Ciudad de Nueva York –donde los ancianos, los negros, los hispanos y los miembros de algunos otros grupos étnicos son desproporcionadamente afectados–, entró en efecto en enero de 2006, obligando a los laboratorios clínicos a informar los resultados de HbA1c al Consejo de Salubridad de la Ciudad como un método para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica de diabetes mellitus, utilizando métodos certificados por el *Nacional Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP).⁹

La epidemia de diabetes mellitus en los Estados Unidos no ha dejado de crecer, generando un incremento en complicaciones agudas y crónicas y en el número de muertes. El primer culpable es la falta de control de la glicemia, además de hipertensión, tabaquismo, obesidad y niveles ele-

vados de los lípidos del colesterol. Aunque los médicos saben tratar la diabetes mellitus en pacientes individuales, el progreso global contra la epidemia requiere de una mejora extensa en el control de la glicemia, según lo subrayado, por encontrar recientemente que esa terapia intensiva con insulina reduce el riesgo de la enfermedad cardiovascular entre pacientes con diabetes mellitus tipo 1.

En diciembre de 2005, el Consejo de Salud de la Ciudad de Nueva York aprobó una nueva estrategia para enfrentar la epidemia de diabetes mellitus basada en el reporte electrónico obligatorio de los valores de HbA1c desde los laboratorios clínicos al Departamento de Salud de la Ciudad. El requisito, que tomó efecto el 15 de enero de 2006, fue promulgado por el departamento de autoridad estatutaria para las enfermedades crónicas, informe y control regular de los laboratorios clínicos.

Se calcula que en Nueva York se creará un registro de uno a dos millones de resultados por año, el cual contemplará información sobre los pacientes y los médicos que ordenaron la prueba. Los datos incluirán el nombre completo, la fecha de nacimiento y la dirección de la persona en estudio, así como la fecha en que la prueba fue realizada. El registro, que será financiado por el Departamento de la Salud, será utilizado como trazador de la epidemiología de la hiperglicemia para, de esta manera, supervisar la epidemia. La Asociación Americana de Diabetes Mellitus recomienda que el análisis de sangre, que mide el nivel medio de glicemia en los dos a tres meses que preceden, se realice por lo menos dos veces por año en los pacientes que están alcanzando las metas del tratamiento, que son quienes tienen control estable de la glicemia, y trimestralmente en los sujetos en los que el tratamiento ha cambiado o en los que las metas no se están alcanzando. La meta para todos los pacientes en general es lograr una HbA1c de menos de 7%. La meta para cada individuo en particular es de menos de 6%.

Desafortunadamente, estas metas a menudo no se alcanzan. En 1999 y 2000, solamente 37.0% de adultos mayores de 20 años de edad con diabetes mellitus diagnosticados por toda la nación estaban logrando tener valores debajo de 7%. Por otra parte, mucha gente con diabetes mellitus (89%) no conoce sus valores de HbA1c, ya sea porque no se la han medido o porque no se han informado sobre sus resultados, o simplemente porque no la recuerdan.

NGSP: Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina

Para la realización de la vigilancia epidemiológica de la diabetes mellitus, se exige la utilización de métodos certificados por el NGSP (*figura 1*). El propósito de este programa es el de estandarizar los resultados de la prueba de la glicohemoglobina para que los resultados clínicos del laboratorio sean comparables al ensayo de las complicaciones (DCCT) de la diabetes mellitus donde se estableció la correlación de la hiperglucemia con el riesgo de sufrir complicaciones crónico-degenerativas.¹⁰

El NGSP comenzó a mediados de 1996. Hoy día puede ser accesado vía internet en www.dgsp.org; es patrocinado en parte por la Asociación Americana de Diabetes Mellitus para estandarizar determinaciones de la prueba de HbA1c a los valores de DCCT. Sobre una base anual, los fabricantes de los métodos de comprobación de la prueba de HbA1c obtienen un certificado de trazabilidad al método de referencia de DCCT (*figura 1*), si su método de comprobación satisface los rigurosos criterios de prueba para la precisión y la exactitud.¹¹⁻¹⁴ Es deseable que los laboratorios utilicen solamente los métodos de comprobación de la prueba de HbA1c que han acreditado la certificación. Es también deseable que todos los laboratorios que realizan la medición de HbA1c participen a su vez en la prueba



National Glycohemoglobin Standardization Program

CERTIFICATE OF TRACEABILITY
Manufacturer Certification

This certifies that _____, using **II HbA1c**
Program has participated in and successfully completed the National Glycohemoglobin Standardization Program certification for manufacturers and is traceable to the **Diabetes Control and Complications Trial** Reference method. The comparison was performed with: **University of Minnesota SRL #6**

The system evaluated was:

Instrument: Variant II	Calibrator Lot: AA10979, AA10980	Column Lot: CN01948
Reagent Lot: AA10968, AA10969, AA11158	Calibrator Assigned Values: 5.4%, 12.2%	Program: HbA1c Program

Date of Certification: December 1, 2001 Certification Expires: December 1, 2002


NGSP Steering Committee Chair


NGSP Network Coordinator


SRL director/supervisor

Figura 1. Muestra del certificado de trazabilidad extendido por el NGSP.

de aptitud del Colegio Americano de Patólogos que comenzó en 1996, utilizando especímenes de sangre entera. La meta para los pacientes en general es un nivel de 6 a 7%, sin importar el tipo del método de comprobación, todos los resultados se deben divulgar como porcentaje de HbA1c.

El hecho de que existan muchos métodos para la determinación de la glicohemoglobina (GHB) hace necesaria la estandarización en la industria del diagnóstico y entre los laboratorios clínicos, ya que de otra manera no se podrá alcanzar el uso óptimo de esta prueba. Estudios recientes han demostrado la necesidad, las ventajas y la viabilidad de llevar a cabo la estandarización de los métodos para el análisis de glicohemoglobina (GHB) con base en la trazabilidad hacia el método cromatográfico de referencia.¹⁵⁻¹⁹

Sobre la base del impacto positivo que tendría la estandarización de las determinaciones de GHB en el cuidado de pacientes diabéticos, la Asocia-

ción Americana de Química Clínica (AACC) estableció un Subcomité para la Estandarización de GHB en abril de 1993. La meta del subcomité fue la de desarrollar un plan para la estandarización de GHB que permitiera en última instancia que los laboratorios clínicos individuales relacionen sus resultados del análisis de GHB con las conclusiones de los Protocolos DCCT, donde se ha establecido que la correlación de los valores de GHB con los de la glicemia correlacionan bien con el riesgo de desarrollar complicaciones diabéticas crónicas.

Al iniciar un programa de estandarización, el subcomité recomendó que se utilizara el método cromatográfico de DCCT como procedimiento de referencia, mientras se realizaban más estudios para determinar cuál sería el método de referencia definitivo y mientras se fabricaban los estándares purificados de GHB.

Los esfuerzos tempranos de estandarizar valores de GHB entre laboratorios clínicos, usando un «calibrador universal», probaron que esto es

Cuadro I. Correlación de los niveles de HbA1c con los de la glicemia promedio trimestral (GPT). $GPT = (HbA1c \times 35.6) - 77.3$. Asociación Americana de Diabetes (ADA).

Glicohemoglobina HbA1c (%)	GPT (mg/dL)	Interpretación
4	67	No diabético
5	103	No diabético
6	139	No diabético
7	175	Meta ADA
8	211	Diabetes mellitus
9	247	Diabetes mellitus
10	283	Diabetes mellitus
11	319	Diabetes mellitus
12	355	Diabetes mellitus

Fuente: *Diabetes Healthcare* 2004; 27 (supl 1): S91-S93.

factible con algunas técnicas de comprobación. Estudios más recientes demostraron, sin embargo, que tal enfoque, aunque relativamente simple, no es adecuado para muchos de los métodos existentes.

Se encontró que los materiales preparados para calibrar, y que los materiales de control de calidad interno y externo, están sujetos a efectos de matriz que generan múltiples problemas que pueden hacerlos rendir resultados diferentes en magnitudes significativas cuando se les compara con los de especímenes de pacientes.

Dado que la meta importante fue alcanzar la estandarización de la mayoría de los métodos existentes y de los que están en desarrollo, se propuso que, para la mayoría de los procedimientos, la correlación con el método de referencia de DCCT se debería realizar desde el nivel de la fabricación, empleando los materiales y los formatos más apropiados para cada método. También se propuso que la verificación de la estandarización del método se debería basar en comparaciones con muestras clínicas frescas *versus* el método de referencia, tal y como se llevó a cabo cuando se realizó el programa de estandarización del colesterol.²⁰⁻²²

Actualmente, los criterios y las metas específicas del tratamiento de la diabetes mellitus están perfectamente validados usando GHB como índice de la glicemia promedio trimestral (GPT). Está bien demostrado que dentro de los niveles de GHB sólo HbA1c guarda una relación estrecha con la GPT. Múltiples estudios han demostrado que HbA1c es un índice de la glicemia promedio trimestral confiable. La vida media del eritrocito es de 120 días. El nivel de HbA1c en cualquier punto de tiempo es proporcional al promedio del glóbulo rojo más joven al más viejo.

¿Cómo se relaciona la HbA1C con la glicemia promedio trimestral (GPT)?

En el *cuadro I* se presenta la relación entre HbA1C y GPT. En resumen, podemos asegurar que cada cambio de 1% en HbA1c representa un cambio de aproximadamente 35 mg/dL en glicemia promedio trimestral. Por cada 1% menos en HbA1c se reduce 25% la morbilidad y la mortalidad. Esta relación solamente es aplicable cuando se emplean métodos de HbA1c certificados por el NGSP. Los cuales, debemos reconocer, están basados en promedios totales y pueden variar levemente en pacientes individuales.

La base de datos más grande es precisamente la que procede del estudio DCCT. Aunque las determinaciones trimestrales de HbA1c fueron el parámetro más importante para el control de la glicemia, el estudio incluyó múltiples determinaciones de glicemia a lo largo de todo el tiempo, incluyendo las basales en ayuno, pre y posprandiales de 90 minutos. El análisis de los datos de DCCT publicado más recientemente demostró que, en una muestra de 1,439 casos, existe una correlación lineal de Pearson de 0.82 con una regresión lineal conforme a la fórmula $GPT = (35.6 \times HbA1c) - 77.3$.^{23,24}

Un coeficiente de correlación de Pearson de 0.82 es indicativo de que existen factores que in-

terfieren en la correlación entre HbA1c con GPT dentro de los que destacan:

1. Variantes y derivados de la hemoglobina:

es importante comprender y recordar los componentes normales de la hemoglobina, según presenta la *figura 2*, ya que existen situaciones clínicas y cuestiones tecnológicas que pueden afectar los resultados obtenidos.^{25,26} Para que un método pueda ser certificado por el NGSP es necesario que cumpla varios requisitos dentro de los que se incluyen:

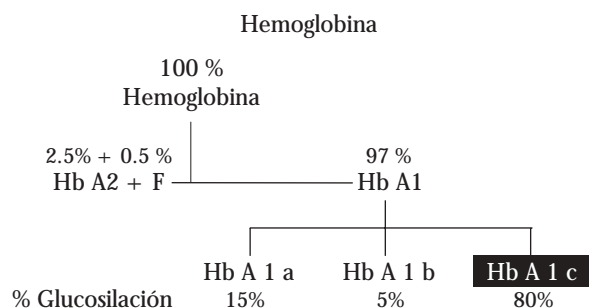


Figura 2. Fracciones de la hemoglobina normal conforme al método cromatográfico de referencia.

- Las mediciones de Hba1 total no son válidas.
- El método debe ser específico para HbA1c.
- Estar libre de interferencias.
- CV < 5%.
- Detectar variantes de hemoglobina.
- Rango de referencia 4 a 6%.

Es importante reconocer que existen condiciones hereditarias que pueden afectar la determinación de HbA1c, dentro de las que destacan hemoglobinopatías como la talasemia y la drepanocitosis. Los resultados de la glicohemoglobina en pacientes con HbSS, HbCC y HbSC se deben interpretar con precaución.²⁷⁻³¹ Es claro que los métodos cromatográficos en los que se pueden determinar todas las fracciones de la hemoglobina son más confiables que aquellos en los que sólo se reporta una cifra porcentual (*figuras 3 y 4*).³²

2. Supervivencia acortada del eritrocito: cualquier condición que acorte la supervivencia del glóbulo rojo bajará el resultado de la prueba de

163

CROMATOGRAFÍA HbA1C

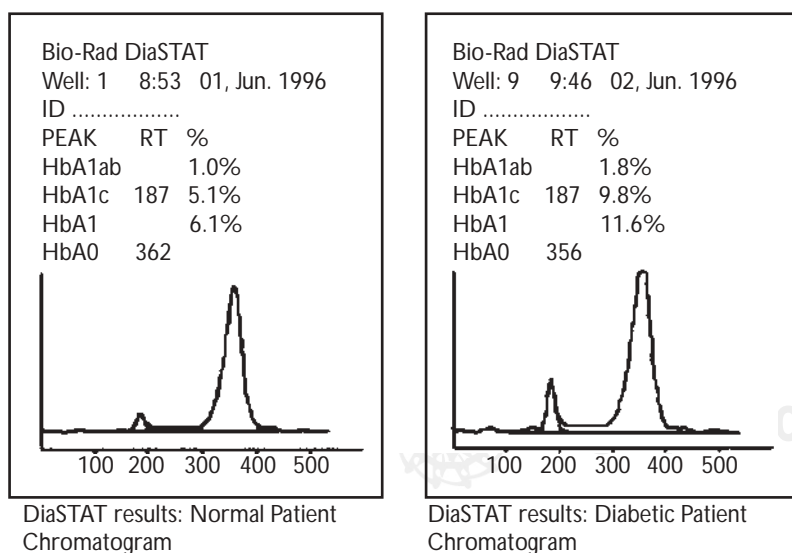


Figura 3. Cromatografía de la hemoglobina A conforme al método cromatográfico de baja presión (LPLC).

Bio-Rad CDM System
Bio-Rad Variant VFE Instrument #2

PATIENT REPORT
AV2050DE

Patient Data

Sample ID: Unknow
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:
Comments:

Analysis Data

Analysis Performed: 15/12/1998 10:34
Injection Number: 196
Run Number: 8
Rack ID: 015
Tube Number: 7
Report Generated: 16/12/1998 08:40
Operator ID: 12/15 Run20

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Ala	---	1.1	0.14	30498
Alb	---	2.5	0.25	69316
LalC	---	2.5	0.68	69409
Alc	10.8*	---	0.90	213082
F3	---	4.4	1.60	123139
Ao	---	81.9	1.80	2291002

Total Area: 2796445

Alc Concentration = 10.8* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:

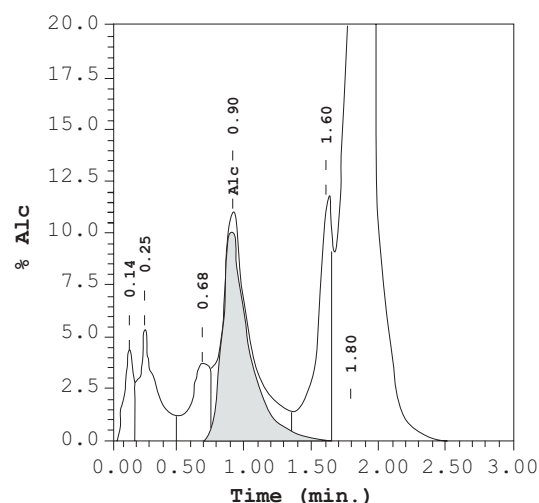


Figura 4. Cromatografía de la hemoglobina conforme al método de referencia DCCT, que es el método cromatográfico de alta presión (HPLC).

GHB sin importar el método usado, incluyendo uremia, anemia y transfusión.³³⁻⁴⁰ En estos casos, se pueden recomendar formas alternativas de prueba, por ejemplo la fructosamina.

3. **Otros factores. Resultados falsamente bajos:** se ha informado que las vitaminas C y E pueden condicionar resultados bajos, probablemente por inhibición de la glicosilación de la hemoglobina.^{41,42}

Resultados falsamente elevados: se ha informado que pueden sobreestimarse los resultados de HbA1c en: anemia por deficiencia de hierro, hipertrigliceridemia, hiperbilirrubinemia, uremia, alcoholismo crónico, ingestión crónica de salicilatos y abuso de narcóticos.⁴³⁻⁴⁶

Bibliografía

1. Terrés Speziale AM. Glicemia. Límites de referencia biocronológicos y niveles de decisión clínica. *Rev Mex Patol Clin* 1999; 46: 133-143.
2. Terrés Speziale A. Confiabilidad y aplicabilidad de los nuevos criterios internacionales para el diagnóstico de DM. *Rev Mex Patol Clin* 2002; 49 (4): 212-220.
3. Terrés Speziale AM. Evaluación de tres estudios internacionales para comparar el impacto del tratamiento intensificado vs el manejo convencional de pacientes con DM tipo 1 y 2. *DM Hoy* 2003; (4) 1: 1010-1016.
4. American DM Association. *Direct and indirect costs of DM in the United States in 1992*. Alexandria, VA: American DM Association, 1993; 27.
5. Rubin RJ, Altman WM, Mendelson DN. Health care expenditures for people with DM, 1992. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 809A-F.
6. National DM Data Group. *DM in America*. 2nd ed. National Institutes of Health, National Institute of DM and Digestive and Kidney Diseases, NIH Publication No. 95-1468, 1995.
7. Harris MI. Summary. Chapter I in *DM in America*, National DM Data Group. NIH Publication No. 95-1468, 1995.
8. Canahuati Rock L, Terrés Speziale AM. Aterogénesis y glicosilación de las proteínas en DM. *Rev Mex Patol Clin* 1996; 43: 67-79.
9. Steinbrook R. Diabetes Surveillance in New York State. *NEJM* 2006; 354: 545-554.
10. DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of DM on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent DM. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
11. Little RR, England JD, Wiedmeyer HM et al. Interlaboratory standardization of glycosylated hemoglobin determinations. *Clin Chem* 1986; 32: 358-360.
12. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD et al. Interlaboratory comparison of glycosylated hemoglobin results: College of American Pathologists (CAP) survey data. *Clin Chem* 1991; 37: 1725-1729.
13. Bodor G, Little R, Garrett N et al. Standardization of glycosylated hemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years experience. *Clin Chem* 1992; 38: 2414-2418.
14. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1992; 38: 2472-2478.
15. Feichtner M, Ramp J, England B et al. Affinity binding assay of glycosylated hemoglobin by two-dimensional centrifugation referenced to hemoglobin A1c. *Clin Chem* 1992; 38: 2372-2379.
16. Weykamp CW, Penders TJ, Frits AJ et al. Effect of calibration on dispersion of glycosylated hemoglobin values as determined by

- 111 laboratories using 21 methods. *Clin Chem* 1994; 40: 138-144.
17. Goldstein DE, Little RR, England JD et al. Methods for quantitating glycosylated hemoglobins: high performance liquid chromatography and thiobarbituric acid colorimetry. In: Clarke WL, Lerner J, Pohl SL (eds). *Methods in DM Research*. Vol 2. Clinical Methods. New York: John Wiley, 1986; 475-504.
18. DCCT Research Group. Feasibility of centralized measurements of glycated in the DM control and complications trial: A multicenter study. *Clin Chem* 1987; 33: 2267-2271.
19. NCCLS. Development of designated comparison methods for analytes in the clinical laboratory. Proposed Guideline. NCCLS publication NRSL6-P2. 2nd ed. Villanova, PA: NCCLS, 1993.
20. Myers GL et al. Standardization of lipid and lipoprotein measurement. In: Rifai N, Warnick GR (eds). *Laboratory measurements of lipids, lipoproteins and apolipoproteins*. Washington, DC: AACC Press, 1994; 177-205.
21. NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. NCCLS document EP5-A2. 2nd ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2004.
22. Bland JM, Altman DD. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; i: 307-310.
23. DCCT: DM Control and Complications Trial or DCCT: *New Engl J Med* 1993; 329: 977-986
24. DCCT: Analysis of the DCCT glucose profile data. *DM Care* 2002; 25: 275-278.
25. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycated hemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-163.
26. Frank EL, Moulton L, Little RR, Wiedmeyer HM, Rohlfing C, Roberts WL. Effects of Hemoglobin C and S Traits on Seven glycated hemoglobin Methods. *Clin Chem* 2000; 46: 864-867.
27. Roberts WL, Barun KD, Brown D, Hanbury CM, Hoyer JD, John WG, Lambert TL, Lundell RB, Rohlfing C, Little RR. Hemoglobin C and S trait on eight glycated hemoglobin methods. *Clin Chem* 2002; 48: 383-385.
28. Weykamp CW, Martina WV, van der Dijs F, Penders TJ, van der Slik W, Muskiet F. Hemoglobins S and C: Reference values for glycated hemoglobin in heterozygous, double-heterozygotes and homozygous subjects, as established by 13 methods. *Clin Chim Acta* 1994; 231: 161-171.
29. Blakney G, Higgins TN, Holmes DJ. Comparison of hemoglobin A1c results by two different methods on patients with structural hemoglobin variants. *Clin Biochem* 1998; 31: 619-626.
30. Roberts WL, Frank EL, Moulton L, Papadea C, Noffsinger J, Ou C. Effects of nine hemoglobin variants on five glycated hemoglobin methods. *Clin Chem* 2000; 46: 569-572.
31. Musalmah M, Normah J, Mohamad WBW, Salwah ON, Fatah HA, Zahari NAN. Effect of hemoglobin E on glycosylated hemoglobin determinations using different commercial kits. *Med J Malaysia* 2000; 55: 352-356.
32. Higgins TN, Blakney GB, Dayton J. Analytical evaluation of the Bio-Rad Variant II automated HbA1c analyzer. *Clin Biochem* 2001; 34: 361-365.
33. Little R, Mathew AS, Tennill AL, Rohlfing CL, Goldstein DG. Measurement of glycated hemoglobin (GHB) in patients with chronic renal failure (CRF): Are ion-exchange HPLC results really invalid? (abstract). *Clin Chem* 1997; 43 (suppl 1): S136.
34. Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doleman C. Carbamylated hemoglobin interference in glycated hemoglobin assays. *Clin Chem* 1999; 45: 438-440.
35. Little RR, Tennill AL, Rohlfing C, Wiedmeyer H, Khanna R, Goel S, Aggrawal A, Madsen R, Goldstein DE. Can glycohemoglobin (GHB) be used to assess glycemic control in patients with chronic renal failure? *Clin Chem*, 2002; 48:784-786.
36. Chevenne D, Fonfrede M, Ducrocq R, Chauffert M, Trivin F. Uremia and HbA1c measured by high-performance liquid chromatography. *Diab Care* 1998; 21: 463-464.
37. Hansen KW, Wrlandsen E, Helleberg K, Danielsen H. Uremia and HbA1c. *Diabetes Care* 1997; 20: 1341-1342.
38. Chachou A, Randoux, Millart H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA1c measurements by various methods. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 321-326.
39. Thoma J, Stirn F, Kutter D. Influence of Urea on HbA1c-determinations by Menarini HA 8140 and on the difference between immunoturbidimetric and HPLC HbA1c results. *Clin Lab* 2000; 46: 261-268.
40. Holbrook I. Measurement of HbA1c by high-performance liquid chromatography in patients with renal failure. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 238-239.
41. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effects of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes* 1992; 41: 167-173.
42. Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care* 1991; 14: 68-72.
43. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 1999; 41: 357-362.
44. Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 466-469.
45. Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM. Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J Clin Invest* 1981; 67: 361-369.
46. Ceriello A, Giugliano D, Dello Russo P, Sgambato S, D'Onofrio F. Increased glycosylated haemoglobin A1 opiate addicts: Evidence for a hyperglycaemic effect of morphine. *Diabetologia* 1982; 22: 379.