

Estado actual de la medida de hemoglobina A_{1c} y objetivos para su mejora: del caos al orden para mejorar la atención de la diabetes

Status of Hemoglobin A_{1c} measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care

► Randie R. Little^{1,*}, Curt L. Rohlfing¹, David B. Sacks^{2,3,*}

Comité Directivo del Programa Nacional de Estandarización de Hemoglobina Glicosilada (NGSP)

¹ Departments of Pathology and Anatomical Sciences and Child Health, University of Missouri-Columbia School of Medicine, Columbia, MO

² Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA

³ Afiliación actual: Department of Medicine Laboratory, NIH, Bethesda, MD

* Correspondencia a: R.R.L. Diabetes Diagnostic Laboratory M767, Department of Pathology and Anatomical Sciences, University of Missouri-Columbia School of Medicine, One Hospital Drive, Columbia, MO 65212. Fax 573-884-8823; e-mail littler@health.missouri.edu. D.B.S. at Department of Laboratory Medicine, 10 Center Drive, Building 10, Room 2C427, Bethesda, MD 20892-1508.

Traducción: Prof Dra Laura Schreier

Este artículo ha sido traducido con el permiso de la AACC. La AACC no es responsable de la exactitud de la traducción. Las opiniones expresadas son las de los autores y no necesariamente de la AACC o de la Revista. Tomado de Clin Chem 2011, 57 (2):205-214, con el permiso del editor. Derechos de autor original © Asociación Americana de Química Clínica, Inc, 2011. Al citar este artículo, por favor recurra a la fuente original de publicación en la revista *Clinical Chemistry*.

This article has been translated with the permission of AACC. AACC is not responsible for the accuracy of the translation. The views presented are those of the authors and not necessarily those of the AACC or the Journal. Reprinted from Clin Chem, 2011 57(2): 205-214, by permission of the publisher. Original copyright © 2011 American Association for Clinical Chemistry, Inc. When citing this article, please refer to the original publication source in the journal, Clinical Chemistry.

Summary

BACKGROUND: The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) established the importance of hemoglobin A_{1c} (Hb A_{1c}) as a predictor of outcome in patients with diabetes mellitus. In 1994, the American Diabetes Association began recommending specific Hb A_{1c} targets, but lack of comparability among assays limited the ability of clinicians to use these targets. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) was implemented in 1996 to standardize Hb A_{1c} results to those of the DCCT/UKPDS.

CONTENT: The NGSP certifies manufacturers of Hb A_{1c} methods as traceable to the DCCT. The certification criteria have been tightened over time and the NGSP has worked with the College of American Pathologists in tightening proficiency-testing requirements. As a result, variability of Hb A_{1c} results among clinical laboratories has been considerably reduced. The IFCC has developed a reference system for Hb A_{1c} that facilitates metrological traceability

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

to a higher order. The NGSP maintains traceability to the IFCC network via ongoing sample comparisons. There has been controversy over whether to report Hb A_{1c} results in IFCC or NGSP units, or as estimated average glucose. Individual countries are making this decision.

SUMMARY: Variability among Hb A_{1c} results has been greatly reduced. Not all countries will report Hb A_{1c} in the same units, but there are established equations that enable conversion between different units. Hb A_{1c} is now recommended for diagnosing diabetes, further accentuating the need for optimal assay performance. The NGSP will continue efforts to improve Hb A_{1c} testing to ensure that clinical needs are met.

Resumen

El Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT) y el Estudio Prospectivo de Diabetes en el Reino Unido (UKPDS) establecieron la importancia de la hemoglobina A_{1c} (Hb A_{1c}) como un predictor de consecuencias en pacientes con diabetes *mellitus*. En 1994, la Asociación Americana de Diabetes comenzó a recomendar metas específicas para Hb A_{1c}, pero la falta de comparación entre los ensayos limitó la capacidad de los médicos para usar estos objetivos. El Programa de Estandarización Nacional de Hemoglobina Glicosilada (NGSP) fue implementado en 1996 para estandarizar los resultados de la Hb A_{1c} según los estudios DCCT / UKPDS. El NGSP certifica a los fabricantes de métodos de Hb A_{1c} como trazables al DCCT. Los criterios de certificación se han reforzado con el tiempo y el NGSP ha trabajado con el Colegio Americano de Patólogos en establecer requisitos estrictos para la aptitud de los ensayos. Como resultado, la variabilidad de los valores de la Hb A_{1c} entre los laboratorios clínicos se ha reducido considerablemente. La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha desarrollado un sistema de referencia para la Hb A_{1c}, que facilita la trazabilidad de la metrología a un orden superior. El NGSP mantiene la trazabilidad a la red de la IFCC a través de continuas comparaciones de muestras. Ha habido controversias en relación a si el informe de los resultados de Hb A_{1c} debe ser en unidades IFCC o NGSP, o una estimación promedio de glucosa. Los diferentes países se encuentran tomando esta decisión. La variabilidad entre los resultados de Hb A_{1c} se ha reducido considerablemente. No todos los países informarán Hb A_{1c} en las mismas unidades, pero se han establecido ecuaciones que permiten la conversión entre diferentes unidades. Ahora se recomienda Hb A_{1c} para el diagnóstico de la diabetes, acentuando aún más la necesidad de un ensayo de óptimo rendimiento. El NGSP proseguirá sus esfuerzos para mejorar los tests de Hb A_{1c} asegurando que se cumplan las necesidades clínicas.

La importancia de la hemoglobina glicosilada (GHb) o hemoglobina A_{1c} (Hb A_{1c}) como marcador del control glucémico en la diabetes *mellitus* cobró énfasis con los resultados del Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT) y su continuación -Epidemiología de la Intervención y Complicaciones de la Diabetes- (EDIC) (1) (2), así como el Estudio Prospectivo de Diabetes en el Reino Unido (UKPDS) (3). Los resultados de estos dos estudios prospectivos, aleatorios, a largo plazo, demostraron de manera concluyente que el control intensivo de la glucemia reduce significativamente el riesgo de complicaciones microvasculares a largo plazo, tanto en la diabetes de tipo 1 como tipo 2 y permitieron establecer metas tratamiento específico basado en la Hb A_{1c}. Sobre la base de los resultados de Hb A_{1c} de estos ensayos, la mayoría de las organizaciones de diabetes clínica en todo el mundo, recomiendan ya sea 6,5% o 7% de Hb A_{1c} como un objetivo para el control de la glucemia en la mayoría de los pacientes diabéticos (4) (5).

Cuando en 1993 finalizó el DCCT había considerables diferencias en la manera de expresar los resultados de GHb. La encuesta de aptitud del Colegio Americano de Patólogos (CAP) de 1993, reveló que sólo el 50% de los

laboratorios participantes informaban los resultados como Hb A_{1c}, mientras que 21% los informaban como Hb A₁ y el 29% restante como GHb total (6). También hubo gran variabilidad dentro de cada categoría de informe. Esta variabilidad entre los valores de GHb ha hecho muy difícil para los médicos el uso de objetivos específicos para Hb A_{1c} en la práctica clínica, ya que los resultados que obtenían, en muchos casos, no estaban directamente relacionados con los de los ensayos clínicos de los cuales derivan los objetivos a aplicar. En el DCCT se evitó el problema de la variabilidad entre los resultados, ya que todos los análisis se realizaron en un solo laboratorio que informó la Hb A_{1c}.

En 1993, la Asociación Americana de Química Clínica (AACC) desarrolló un subcomité para la estandarización de la medida de Hb A_{1c}, y en 1996 se inició el Programa Nacional de Estandarización de Hemoglobina Glicosilada (NGSP) para aplicar el protocolo de la AACC (7). El objetivo del programa fue estandarizar los resultados de las pruebas de Hb A_{1c} para que los resultados de los laboratorios clínicos sean comparables a los reportados por el DCCT y el UKPDS, donde se habían establecido las relaciones con el riesgo de complicaciones

microvasculares. Del mismo modo, a mediados de 1990 se iniciaron programas de estandarización de la Hb A_{1c} en Suecia y en Japón (8) (9). En esta revisión se discuten las mejoras en la medida de Hb A_{1c} que son el resultado de las actividades del NGSP. También se describe el estado actual de las pruebas de Hb A_{1c} y la dirección de los futuros planes de mejoramiento en el que se asegurará que la calidad de la prueba de Hb A_{1c} responda a las necesidades clínicas.

La Red del Programa de Normalización Nacional de hemoglobina glicosilada (NGSP)

La red NGSP y los procesos se muestran esquemáticamente en la Figura 1 y también se describen en detalle en el sitio Web NGSP (<http://www.ngsp.org>). La red NGSP consiste en un Laboratorio Central de Referencia Primario (CPRL), tres laboratorios de referencia primarios (PRLs), y 7 laboratorios de referencia secundarios (SRLs). PRLs y SRLs se encuentran tanto en Europa como en los EE.UU. El método de referencia del CPRL es el DCCT / EDIC Bio-Rex 70 HPLC. Los PRLs utilizan el mismo método que el CPRL y funcionan como laboratorios de *back-up*. Los SRLs utilizan métodos comerciales de elevada precisión basados en HPLC de intercambio iónico, inmunoensayo, HPLC de afinidad con boronato o electroforesis capilar. Los laboratorios de la red NGSP son mo-

nitoreados mensualmente con un *pool* de 10 muestras congeladas de sangre que abarca el rango de 4% a 10% (4% a 12% antes de enero de 2010) de Hb A_{1c}, y todos los laboratorios de la red se comparan con la CPRL. Además, dos veces al año se realizan comparaciones con la red de la IFCC. Para aprobar el seguimiento de NGSP, la estimación de la desviación estándar de la diferencia entre la muestra replicada (cada muestra se analiza en 2 días distintos) no debe exceder 0.229% de Hb A_{1c}. Además, la media de las diferencias entre un laboratorio individual de la red y el CPRL no debe exceder el 0,35% de Hb A_{1c}. Los resultados de SRL también deben estar dentro de una elipse de aceptación definida, en base a la pendiente y la intersección de las diferencias entre los resultados de los SRL individuales y las medianas de todos los SRLs. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de un informe SRL mensual que incluye un gráfico de precisión, un gráfico de sesgo, y una elipse de aceptación. Por otra parte, los resultados de muestras individuales, para las cuales las repeticiones dentro de los SRL difieren en más de 0,4% de Hb A_{1c} o el resultado de la media difiere de la mediana de la SRL en más de 0,5% de Hb A_{1c}, se excluyen de los cálculos de la media final de SRL. Todos los resultados monitoreados son compartidos entre los laboratorios de la red. Si un SRL falla en un ejercicio de control, se le prohíbe participar en la certificación hasta que los problemas se aborden y el método apruebe el próximo ejercicio de monitoreo. La Figura 3 muestra la media de los coeficientes de variación (CV) de los laboratorios de la red

COMITÉ DIRECTIVO DEL NGSP

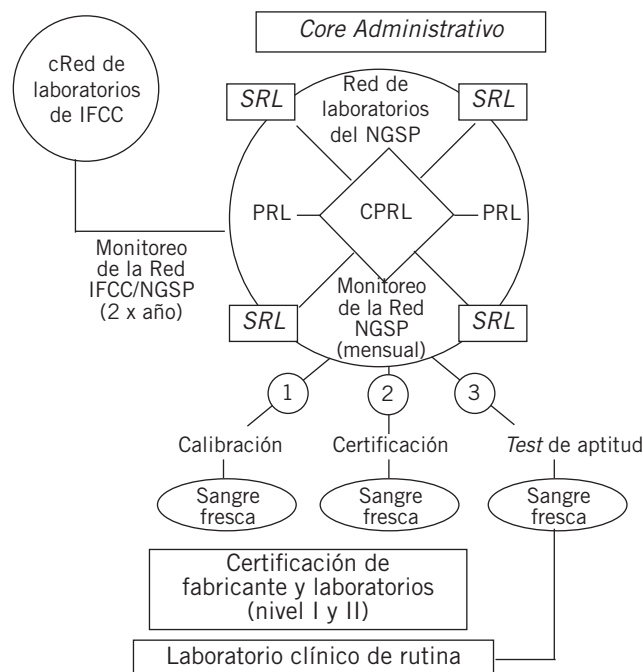


Fig. 1. Procedimiento de la red del NGSP.

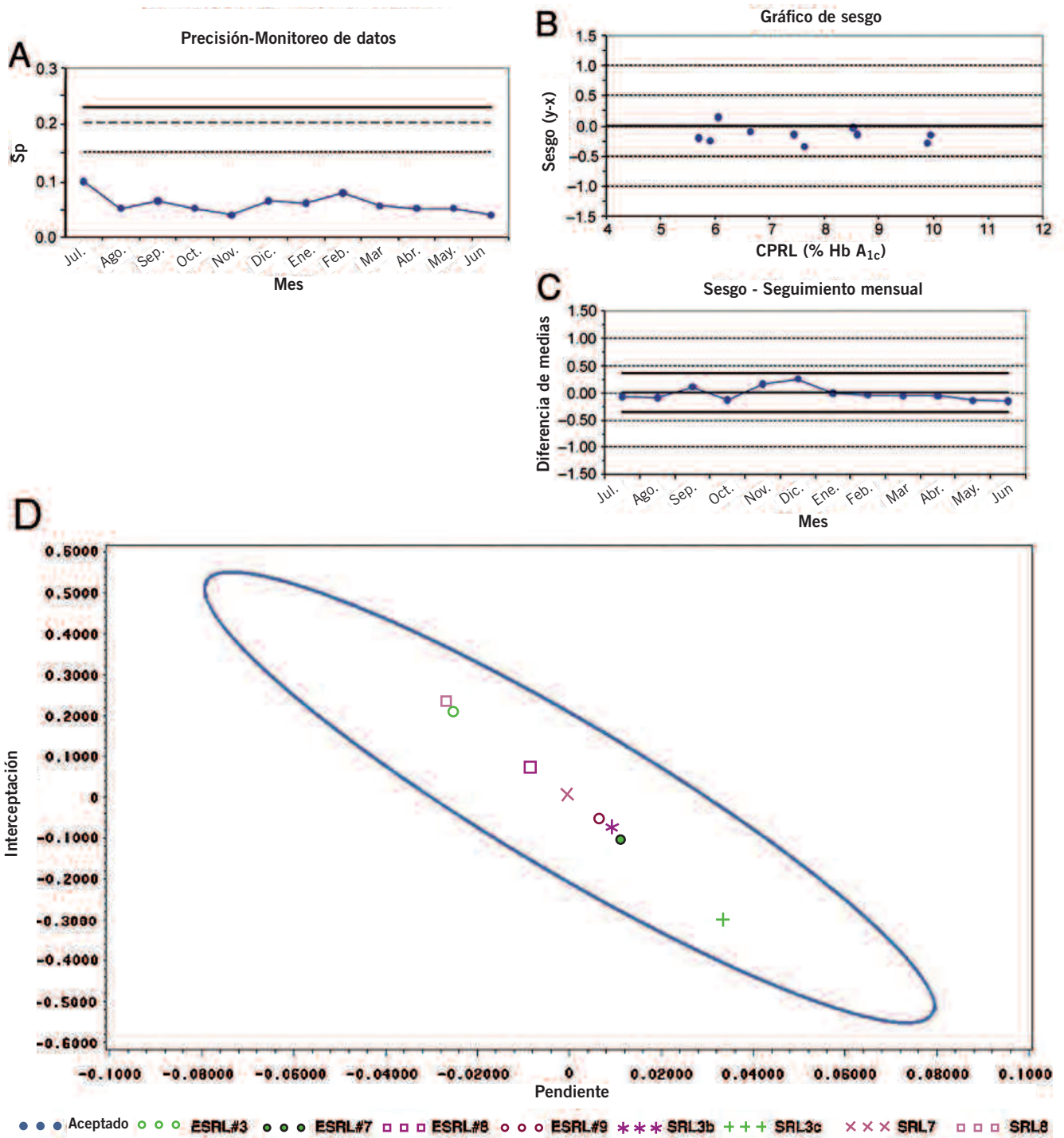


Fig. 2. Informe de la red NGSP del monitoreo mensual de un SRL típico. (A) Gráfico de precisión que muestra el objetivo para el desvío estándar (. . .), el límite de advertencia (— — —) y el límite para la aprobación (———). (B) Gráfico de sesgo que muestra el monitoreo de muestras individuales comparadas con el CPRL (Laboratorio Central de Referencia Primaria). (C) Gráfico del monitoreo de sesgo que muestra la media del sesgo de los últimos 12 meses con el límite de $\pm 0.35\%$ Hb A_{1c} (———). (D) La elipse del desempeño del SRL con cada punto que representa un SRL diferente. ESRL, SRL europeos.

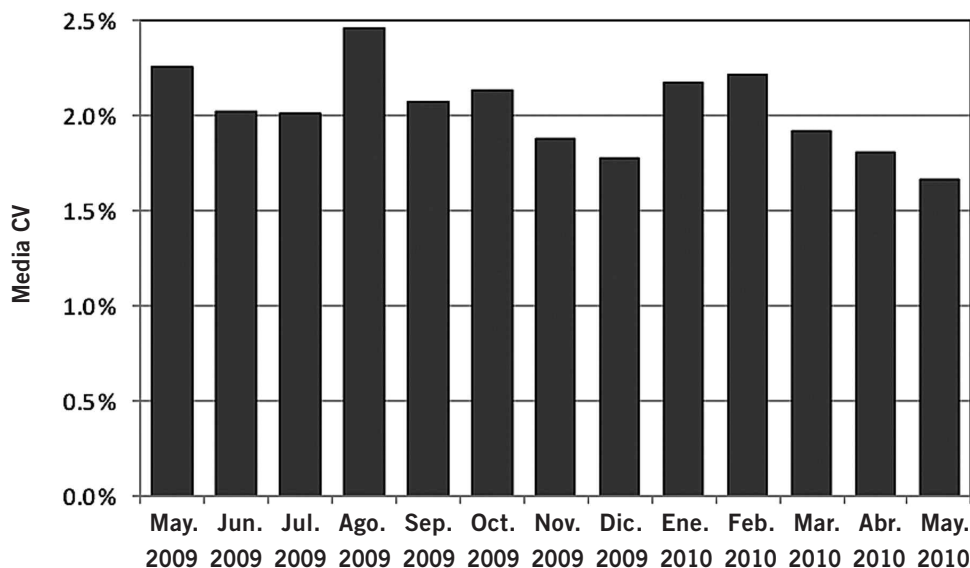


Fig. 3. Media de los CVs de todos los laboratorios de la red del NGSP (PRLs y SRLs) entre mayo de 2009 y mayo de 2010.

NGSP, por cada mes entre agosto de 2009 y julio de 2010. Todos los CV mensuales de la red estuvieron por debajo del 2,5%. Los valores de la red NGSP también son trazables a los de la red de laboratorios IFCC que realiza un procedimiento de primer orden para la medida de referencia de Hb A_{1c} (véase más adelante).

El procedimiento del NGSP

En la Figura 1 se muestran los 3 principales procedimientos de la NGSP. Los laboratorios de la red NGSP ayudan a los fabricantes con la calibración de sus métodos. Una vez calibrados, estos métodos pueden ser certificados. El proceso de certificación consiste en un intercambio de 40 muestras de sangre, fresca o congelada, entre un fabricante y un SRL NGSP. Los fabricantes pueden elegir el SRL con quien se quieran comparar cuando certifican sus métodos. La elección puede basarse en la ubicación geográfica o en el tipo de método. En algunas situaciones, la variabilidad entre los resultados individuales es menor cuando se comparan con métodos similares, por ejemplo, cuando ambos, el fabricante y el SRL usan el método HPLC de intercambio iónico.

Al fabricante se le otorga un certificado de trazabilidad si el intervalo de confianza (IC) del 95% de las diferencias entre su método y el SRL, cae dentro de $\pm 0,75\%$ de Hb A_{1c} (Tabla I). El certificado es efectivo por 1 año a partir de la fecha de certificación. Para mantener la certificación continua, el proceso debe repetirse cada año (7) (10).

Los laboratorios individuales, si así lo desean, también pueden ser certificados. Los laboratorios que participan en los ensayos clínicos tienen mayor probabilidad de ser certificados a petición del sponsor del ensayo clínico. Otros laboratorios, con un volumen elevado de muestras para Hb A_{1c}, también podrían estar interesados en la certificación. Una fracción relativamente pequeña (alrededor del 1% -3%) de los laboratorios acreditados en los EE.UU. son certificados por NGSP. El proceso de certificación para los laboratorios es el mismo que para los fabricantes, pero para los laboratorios hay dos niveles de certificación. En el nivel II, los criterios de certificación son los mismos que los de los fabricantes. El nivel I de certificación es más estricto, el IC del 95% de las diferencias entre los métodos (del laboratorio en comparación con SRL) debe estar dentro de $\pm 0,70\%$ de Hb A_{1c} (Tabla I). Los laboratorios de nivel I, a diferencia de nivel II, son monitorea-

Tabla I. Resumen de las categorías de certificación de NGSP

Tipo de certificación	N° de muestras comparadas	Criterios de sesgo	Monitoreo (sí/no)	Protocolo del monitoreo
Fabricante	40	IC 95% de las diferencias dentro de $\pm 0,75\%$ Hb A _{1c}	No	—
Lab. Nivel I	40	IC 95% de las diferencias dentro de $\pm 0,70\%$ Hb A _{1c}	Sí	10 muestras trimestrales
Lab. Nivel II	40	IC 95% de las diferencias dentro de $\pm 0,75\%$ Hb A _{1c}	No	—

dos trimestralmente por el mismo procedimiento y criterios utilizados para laboratorios de la red NGSP.

El tercer componente del proceso del NGSP es la vigilancia de la aptitud de los datos de Hb A_{1c} del Colegio Americano de Patólogos (CAP). Este proceso es fundamental para el seguimiento del éxito del NGSP (véase “del caos al orden” a continuación). La encuesta GH2 de la CAP se realiza dos veces al año. Se utilizan muestras frescas de sangre y la clasificación está basada en la precisión, con los valores “blanco” asignados por el NGSP. El ajuste gradual de los criterios de la CAP ha impulsado a los laboratorios y fabricantes a mejorar la calidad de la prueba de Hb A_{1c}.

Desde que el NGSP se inició en 1996 se ha producido un aumento constante del número de métodos y laboratorios que han sido certificados. A mediados de 2010 hubo alrededor de 100 métodos y 100 laboratorios certificados. De los laboratorios certificados, aproximadamente el 85% fueron de nivel I y el 75% se encuentra fuera de los EE.UU. Este aumento progresivo en la certificación demuestra la disposición de los fabricantes para mejorar continuamente sus métodos. El crecimiento de las certificaciones de ambos, del fabricante y del laboratorio, también refleja la continua demanda de métodos y laboratorios que puedan satisfacer las necesidades de los equipos médicos dedicados a la atención de la diabetes, la investigación clínica y los ensayos clínicos. La lista de métodos y laboratorios certificados por NGSP, actualizada mensualmente, está disponible en el sitio Web del NGSP (11).

La Red de la IFCC

El objetivo principal del grupo de trabajo de la IFCC sobre estandarización de la Hb A_{1c} iniciada en 1995, fue el desarrollo de un método de referencia de primer orden aceptado internacionalmente, y materiales de referencia para la medición de Hb A_{1c}. La razón para el desarrollo de este método era para satisfacer las preocupaciones de la trazabilidad a un “método de orden superior”, una necesidad que fue promulgada por la directiva de Diagnóstico *in vitro* de la Unión Europea en 1998 (12). A pesar de que el método Bio-Rex 70 utilizado en todo el DCCT demostró ser muy consistente (1993-2003) y continuando a través del EDIC (1993 a 2010) (13), este método se considera un “método designado para comparación” y no un método de orden superior, ya que no es completamente específico para la Hb A_{1c} y no utiliza patrones puros. El método de referencia de la IFCC para la Hb A_{1c} fue aprobado en 2001 (14). La IFCC ha establecido una red de laboratorios que comprende 11 laboratorios en el momento de esta publicación. Cada laboratorio ejecuta uno o ambos de los dos métodos aprobados por la IFCC, los cuales son HPLC- espectrometría de masa o HPLC- electroforesis capilar (15). Cada método otorga resultados esencialmente idénticos, porque utilizan los mismos materiales de referencia primarios para la calibración. Es im-

portante destacar que ni el método del CPRL-NGSP ni el método de la IFCC son adecuados para la medición rutinaria de la Hb A_{1c} en muestras de pacientes.

La IFCC ofrece a los fabricantes calibradores y controles en matrices apropiadas, con los valores asignados por la red IFCC para establecer y verificar su trazabilidad, así como un programa de control que facilita el seguimiento continuo de su trazabilidad cada dos meses (16). Sin embargo, no implica un programa de certificación. Comparaciones múltiples entre las redes revelan que los resultados obtenidos por el método IFCC correlacionan muy bien con los resultados del NGSP / DCCT, pero hay un sesgo. Este sesgo es trasladado a una “ecuación maestra” que describe la relación lineal entre los resultados de los laboratorios de las redes IFCC y NGSP: $NGSP = (0.915 \times IFCC) + 2.15$ (17). La ecuación maestra fue desarrollada por 4 integrantes de las redes IFCC / NGSP que realizaron un estudio de comparación a través de un seguimiento periódico durante 2 años para asegurar la consistencia de la relación, la cual hasta el momento ha demostrado una relación estable por más de 7 años (15). Sin embargo, la aplicación del Sistema de Referencia de IFCC creó un problema en cuanto a cómo deben reportarse los resultados de la Hb A_{1c}, ya que hay diferentes interpretaciones de “trazabilidad”. Una interpretación es que todos los resultados clínicos deben ser reportados en cifras y unidades del método IFCC. Por el contrario, otros creen que el cambio de la escala de números y unidades confunde a los profesionales de la salud y a los pacientes y no se debería implementar, en cambio, asegurarse que las cifras del NGSP puedan relacionarse con el método de orden primario, es suficiente para cumplir los requisitos de trazabilidad.

El NGSP y la IFCC: ¿qué cifras y unidades se debe informar?

En un esfuerzo por encontrar algún grado de compromiso, tres de las principales organizaciones de diabetes clínica -la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD), y la Federación Internacional de Diabetes- acordaron que los laboratorios deben reportar una media de glucosa estimada (eAG) (18). Después de un gran estudio prospectivo internacional para determinar la relación entre la Hb A_{1c} y la media de glucosa en sangre, se estableció una relación lineal entre ambos parámetros (19). A pesar de estos hallazgos, muchos expertos creen que hubo demasiada variabilidad en la relación entre Hb A_{1c} y la media de glucosa en sangre, por lo tanto la eAG no debe ser reportada.

En 2007 se publicó una declaración de consenso sobre la estandarización en todo el mundo de la Hb A_{1c}, que fue revisada en 2010 (20, 21). De acuerdo con la declaración de 2010, la Hb A_{1c} debe ser informada en las

dos unidades, según el DCCT y el NGSP, a saber, la Hb A_{1c}% y milimoles por mol. A pesar de este consenso oficial, los países están decidiendo cuál es la forma correcta de informar Hb A_{1c}. Por lo general, después de un período provisorio de informar tanto según IFCC como NGSP, varios países ya han decidido cambiar y reportar los datos según la IFCC; sin embargo, muchos otros países todavía no determinaron la manera de informar la Hb A_{1c}. EE.UU. ha decidido informar las cifras según el NGSP (es decir, % de Hb A_{1c}) y eAG, pero no como IFCC (mmol/mol). El uso de eAG no ha sido aceptado fuera de los EE.UU. A pesar de la falta de consenso mundial para la presentación de informes de Hb A_{1c}, ahora hay una forma clara de relacionar los diferentes resultados reportados. Por ejemplo, con el uso de la ecuación maestra, es fácil convertir unidades y cifras de IFCC a NGSP y viceversa. Muchos instrumentos que miden la Hb A_{1c} serán capaces de proporcionar resultados de Hb A_{1c} en unidades NGSP o IFCC o ambas unidades, y la mayoría de los laboratorios tienen la opción de reportar también la eAG (junto con Hb A_{1c}) a través de sus sistemas informáticos. Es importante destacar que la relación documentada (ecuación maestra) entre NGSP y IFCC sigue siendo controlada. El monitoreo continuo, intra e inter-redes, proporciona una seguridad adicional en el informe de resultados de Hb A_{1c}, independientemente de qué unidades se utilizan.

Mejora de la medición de la Hb A_{1c}

Los enfoques del NGSP y la IFCC para la estandarización de los resultados de Hb A_{1c} persiguen fines diferentes y complementarios. El principal objetivo de la estandarización para la IFCC es asegurar que los fabricantes produzcan ensayos de Hb A_{1c} trazables a un valor exacto. Cada fabricante debe documentar la trazabilidad con el método de orden superior de la IFCC, a través de una ininterrumpida cadena de trazabilidad, además la incertidumbre de cada paso debe ser documentada. Sin embargo, la red de IFCC no establece un límite en el grado de incertidumbre permitido entre el método de un fabricante y el valor de IFCC. El programa de estandarización del NGSP ha definido límites aceptables para la utilización del método que se basan en los requerimientos clínicos.

El proceso de certificación del NGSP comprende el análisis, por duplicado, de un panel de 40 muestras analizadas por el fabricante y por uno de los SRL-NGSP durante un período de al menos 5 días (por ejemplo, 8 muestras por día por duplicado en cada uno de los 5 días) en ambos sitios. Los criterios de certificación del NGSP se ajustaron en 1999, 2002 y 2007, y nuevamente en enero de 2010. Actualmente se requiere que las concentraciones de Hb A_{1c} de las 40 muestras se encuentren en el rango entre 4% y 10% de Hb A_{1c}, con un número

específico de muestras en un rango definido. El IC 95% de las diferencias entre el método que certifica y el SRL debe estar dentro del $\pm 0,75\%$ de Hb A_{1c}. En una evaluación de concordancia de métodos realizada por Bland-Altman (22) se efectúa una estimación del error total, para lo cual se toman en cuenta tanto el sesgo como la variabilidad del método. Los fabricantes deben demostrar que su método cumple con estos requisitos para que sea certificado por el NGSP, trazable al DCCT. Mediante el ajuste gradual y progresivo de límites de certificación (23) el NGSP ha producido una mejora en la exactitud y la precisión de las mediciones de Hb A_{1c}.

Adicionalmente, el NGSP ha trabajado con la CAP en la adopción y posterior ajuste de una graduación basada en la exactitud usando objetivos del NGSP en la encuesta de aptitud GH2 que realiza la CAP de la medida en sangre entera. La CAP ofrece la mayor encuesta en todo el mundo de aptitud para tests de Hb A_{1c}. Actualmente, (2010) la matrícula supera los 3.000 laboratorios, muchos de ellos ubicados fuera de los EE.UU. Desde su creación, el Comité Directivo del NGSP ha trabajado en estrecha colaboración con la CAP asegurando que los datos para la aptitud de la Hb A_{1c} sean óptimos para evaluar la situación actual de las pruebas de Hb A_{1c} y también para fomentar un mejor rendimiento del ensayo. En 1996, la CAP comenzó a utilizar *pooles* de muestras frescas de sangre entera para la encuesta GH2. Debido a que las muestras están libres de efectos de matriz que abrumaron las encuestas anteriores de Hb A_{1c}, los resultados podrían ser utilizados en forma fiable para evaluar el sesgo y la imprecisión, intra y entre los métodos. En 2005, la CAP comenzó a ofrecer un "grado doble" con propósitos educativos, lo que permitió a los laboratorios comparar sus resultados con los valores del NGSP. Dos años más tarde la graduación basada en la exactitud se adoptó como criterio exclusivo para las encuestas de Hb A_{1c} de la CAP. El límite inicial aceptable de exactitud se fijó en $\pm 15\%$. Este valor se redujo progresivamente en 2008, 2009 y 2010: $\pm 12\%$, $\pm 10\%$, y $\pm 8\%$, respectivamente. En 2011 el límite será de $\pm 7\%$.

Del caos al orden

El NGSP ha seguido el progreso de la estandarización de la Hb A_{1c} desde 1996 a través de los resultados de las encuestas de la CAP. En 1993, cuando terminó el DCCT y la ADA comenzó a recomendar metas específicas de Hb A_{1c} para los pacientes, se reportaron diferentes fracciones glicosiladas (Hb A_{1c}, Hb A₁, o GHb total) con una variabilidad considerable entre los resultados (figura 4, izquierda). En 1999, tres años después de que se estableciera el NGSP, el 80% de los laboratorios estaban reportando resultados de GHb como Hb A_{1c}. En 2004 casi todos los laboratorios ya estaban reportando los resultados como Hb A_{1c}, y había una variabilidad mucho menor,

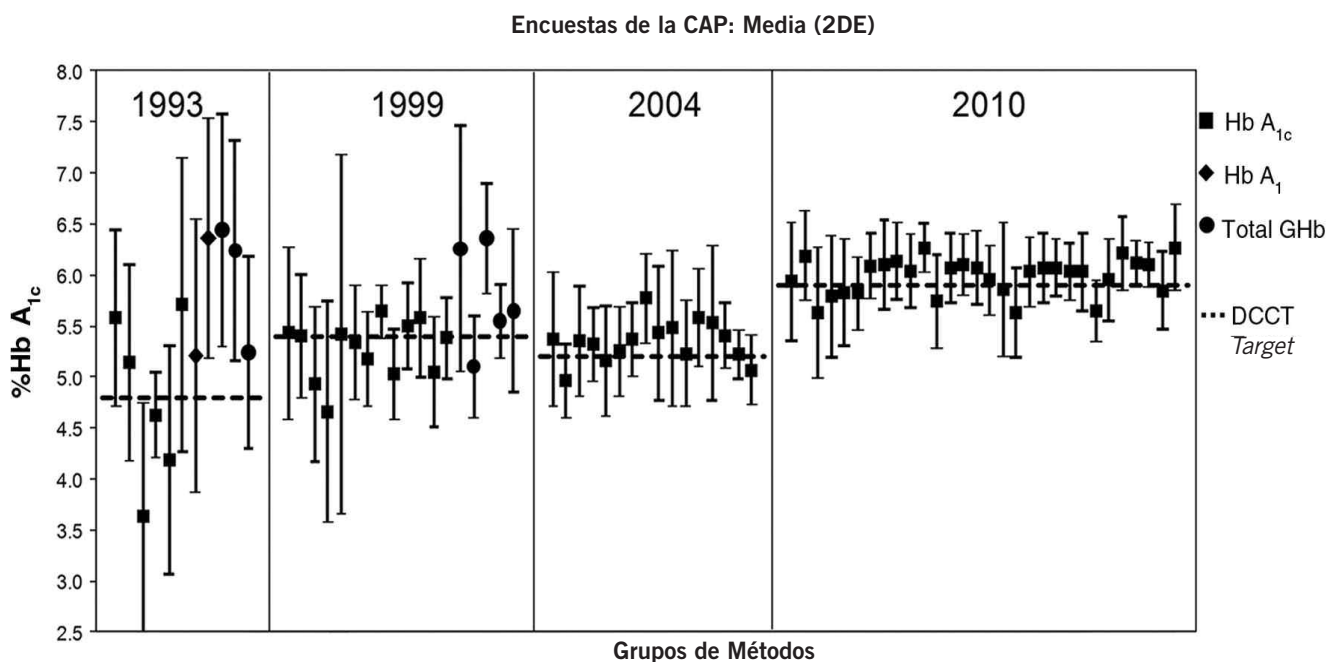


Fig. 4. Media de cada método comparado con el objetivo del NGSP/DCCT (línea punteada) en 1993, 1999, 2004 y 2010, extraído de la encuesta GH2 de la CAP. Los símbolos representan la media; las barras de error son $\pm 2DE$.

tanto intra- como entre los métodos (Fig. 4). A partir de 2009, sólo se aceptaron resultados de Hb A_{1c} en las encuestas de la CAP. Las mejoras en el funcionamiento del método entre 2000 y 2010 se muestran en la figura 5. En cada evaluación se calculan la media, DE y CV de todos los resultados combinados. El CV total se redujo de aproximadamente de 7% a 4,0%, entre 2000 y 2010 y en las muestras de rango bajo (no diabéticos) (4% -6% de Hb A_{1c}) (Fig. 5C). A través del tiempo la mejora ha sido más modesta para las muestras entre 6% -10% de Hb A_{1c}, con disminución del CV total de aproximadamente 5 -5,5% a 4% (Fig. 5, B y C). Muchos métodos tienen ahora un CV entre laboratorios del 3%, y unos pocos son del 2%. Los métodos de HPLC generalmente muestran una mejor precisión que los métodos de inmunoensayo pero hay una considerable superposición en los CV de los dos tipos de métodos. En la encuesta GH2 2010 A, el CV entre laboratorios de inmunoensayos varió de 1,7% a 6%, mientras que para los métodos de HPLC, el CV osciló entre 1,4% a 3,5%. En el momento de esta publicación, fueron certificados por el NGSP 11 equipos de *point-of-care*. Hay muy pocos datos disponibles de resultados de aptitud para los métodos de *point-of-care*, pero por lo menos, según el estudio de la CAP, un equipo *point-of-care* funciona tan bien como muchos de los métodos de laboratorios (24).

Cada participante de la encuesta se calificó de acuerdo a la asignación de valores del NGSP, con una aceptación establecida en $\pm 8\%$ en 2010. A cada participante se le dio también un "grado de educación", cuyo

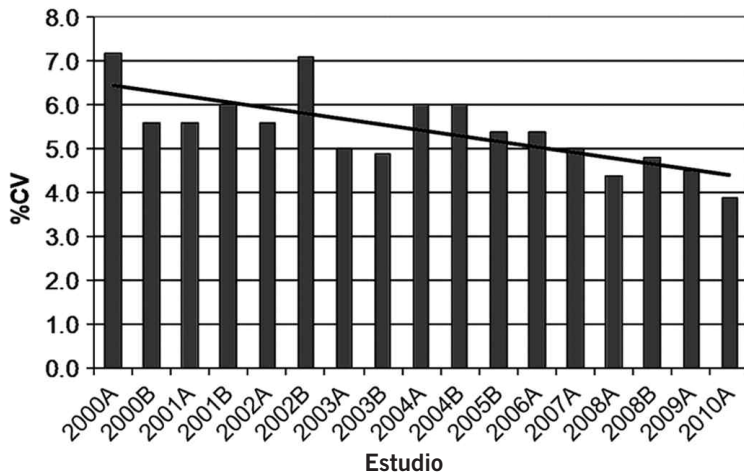
límite previsto fue de $\pm 6\%$. Con el actual límite de aceptación de $\pm 8\%$, el porcentaje de los laboratorios que aprobaron la evaluación GH2 2010^a, para cada muestra, fue más del 95% (24). Aunque la tasa de aprobación fue menor en el límite más estricto $\pm 6\%$, como se esperaba, la tasa global de aprobación para cada muestra es todavía cerca del 90% (91,0%, 88,6% y 91,6% para la baja, media y alta Hb A_{1c}, respectivamente).

Se debe tener en cuenta que los límites de la CAP, que se basan en un determinado porcentaje de la meta para cada muestra individual, no son fácilmente comparables con los del proceso de certificación del NGSP, que se basa en un IC del 95% para 80 resultados (40 muestras por duplicado). Es evidente que los límites del NGSP tendrán que ser ajustados para emparejar el límite de la CAP de 2011 de 7%. Sin embargo, los datos del NGSP más recientes muestran que en la certificación de los 15 métodos más utilizados en la evaluación 2010A de la CAP, el 90% de los resultados se encuentran dentro de $\pm 7\%$ de los SRL. Once de estos 15 métodos presentan $\geq 95\%$ de los resultados entre $\pm 7\%$.

Metas analíticas para la Hb A_{1c}

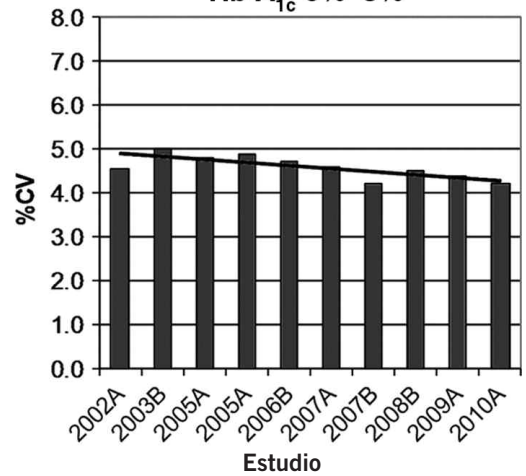
El DCCT demostró diferencias significativas en los riesgos resultantes de los grupos con tratamiento intensivo y estándar, entre los cuales la media de Hb A_{1c} difería aproximadamente 2% (7,2% vs. 9,1% de Hb A_{1c}, respectivamente) (1). Del mismo modo, a pesar de una

A Todos los métodos, CV_s a través del tiempo: Hb A_{1c} 4%–6%



Todos los métodos, CV_s a través del tiempo:

Hb A_{1c} 6%–8%



C Todos los métodos, CV_s a través del tiempo: Hb A_{1c} 8%–10%

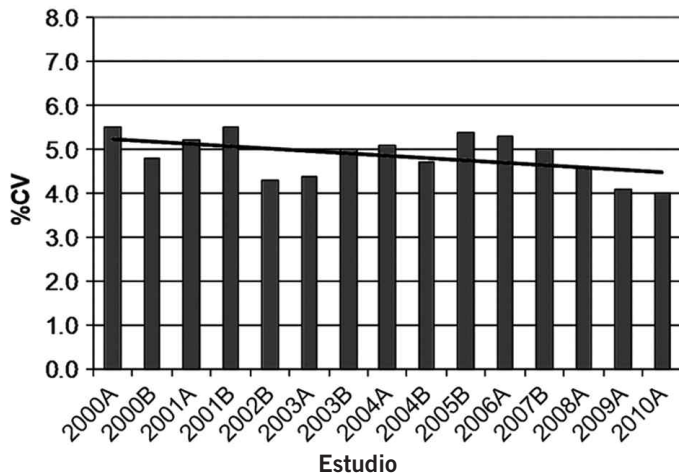


Fig. 5. Los CVs de todos los resultados de Hb A_{1c} de la encuesta GH2 de la CAP entre el 2000 y 2010, de muestras con valores de Hb A_{1c} (A) de 4%–6%, (B) 6%–8%, y (C) 8%–10%. La línea continua representa la línea de tendencia.

diferencia aún más baja en la media de valores de hemoglobina A_{1c} (7% frente a 7,9% para los grupos de tratamiento intensivo y convencional, respectivamente), el estudio UKPDS mostró una reducción significativa de las complicaciones microvasculares en los pacientes tratados intensivamente por diabetes tipo 2 (3). Por lo tanto, es esencial que la Hb A_{1c} se mida con precisión y exactitud para permitir a los médicos distinguir de forma fiable un control glucémico óptimo de uno subóptimo. La reciente recomendación de utilizar la Hb A_{1c} para el diagnóstico de la diabetes (4) (25) destaca además la necesidad de un funcionamiento óptimo de la prueba. La ADA recomienda, ahora, que la Hb A_{1c} puede ser utilizada para el diagnóstico de la diabetes con un umbral del 6,5% (4).

Muchos creen que las metas para el rendimiento de las pruebas de Hb A_{1c} deben basarse en las necesidades clínicas. Hay dos cuestiones importantes para que un mé-

dico considere cuándo utilizar la medida de Hb A_{1c} para evaluar el estado glucémico de un paciente. Una de ellas es si el control glucémico del paciente es estable, mejora o se deteriora, y el otro es cómo el resultado de Hb A_{1c} del paciente se compara con la meta individual de Hb A_{1c} (la actual recomendación de la ADA es de 7%, con la salvedad de que menos es mejor, si es posible). En respuesta al primer cuestionamiento, muchos médicos han sugerido que 0,5% de Hb A_{1c} es un “cambio clínicamente significativo”. Es importante destacar que las pautas de tratamiento y los algoritmos de la ADA / EASD (26) y del Instituto Nacional para la Excelencia Clínica del Reino Unido (27) recomiendan la evaluación de los nuevos regímenes de tratamiento en términos de si la Hb A_{1c} se redujo en 0,5 puntos porcentuales o más. Por lo tanto, es importante asegurarse de que un cambio de esta magnitud es estadísticamente significativo y no debido a la variación analítica.

Considerando una diferencia estadísticamente significativa de 0,5% de Hb A_{1c} para una concentración de Hb A_{1c} de 7%, como es la meta para la Hb A_{1c}, se puede utilizar el valor de cambio de referencia (RCV), también llamado diferencia crítica, para el cálculo de una meta apropiada en términos de CV (28). Para diferencias significativas de resultados secuenciales, las cifras deben diferir en más de la variación combinada inherente a los 2 resultados determinados: $RCV (\%) = 2^{(1/2)} \times 1,96 \times [(CVA)^2 + (CVI)^2]^{(1/2)}$, donde CVA es el CV analítico (CV intra-laboratorios) y el CVI es la variación biológica en un mismo sujeto. Para la Hb A_{1c} el CVI es bajo, menos del 1% (29), cuando se estima en individuos sin diabetes. Si el CV analítico del método es 2% (factible para muchos sistemas comerciales de HPLC) el RCV (95% de probabilidad) es <0,5% Hb A_{1c} (0,43%) (véase el cuadro 1 en el Suplemento de Datos que acompaña la versión *online* de este artículo en <http://www.clinchem.org/content/vol57/issue2>). Aproximadamente el 80% de los laboratorios participantes en la encuesta GH2 de CAP 2010 estaban usando métodos que demostraban un CV intra-laboratorios $\leq 2\%$. Podemos concluir que, al menos cuando la Hb A_{1c} se mide en un laboratorio acreditado, los médicos pueden, razonablemente (95%) asegurar que una diferencia de 0,5% de Hb A_{1c} o mayor en valores sucesivos de muestras de pacientes, representa un cambio estadísticamente significativo en el control glucémico. Si el laboratorio utiliza un método que ha demostrado un CV intra-laboratorio más de 2%, como es todavía el caso de algunos ensayos, la confianza en que una diferencia de 0,5% Hb A_{1c} sea significativo, es menor (en línea de consulta Cuadro 1).

Cuando un médico quiera observar la diferencia entre el resultado de Hb A_{1c} del paciente y la meta del 7%, deberán tenerse en cuenta tanto el sesgo como la variabilidad (CV%), en otras palabras, el error total del método. Por ejemplo, si un método tiene 0 sesgo, se requiere un CV de 3,5% para tener el 95% de confianza que el valor de Hb A_{1c} de un paciente con un resultado "verdadero" de 7% se lea entre 6,5 y 7,5% ($\pm 7\%$). Si existe un sesgo de 0,2%, el requisito de CV se ajusta al 2,3% (consultar *online* Cuadro 2). Si se requiere un rango más estrecho para este grado de certeza (por ejemplo, 95% de confianza que el valor se encuentra dentro de 6,7% -7,3% de Hb A_{1c}), el CV analítico necesario es aún más bajo. Con respecto a la graduación de la CAP, el límite actual de $\pm 8\%$ corresponde a un límite de $\pm 0,56\%$ Hb A_{1c} para la meta del 7% de Hb A_{1c}; el límite de $\pm 7\%$ que será implementado en el año 2011 corresponde a $\pm 0,49\%$ Hb A_{1c}. Para que todos los laboratorios puedan obtener resultados dentro de $\pm 0,5\%$ Hb A_{1c}, a nivel de la meta de ADA del 7% de Hb A_{1c} o en el umbral de diagnóstico de 6,5% de Hb A_{1c} (4), sería adecuado un punto de corte de la CAP de $\pm 7\%$. Más del 90% de los laboratorios participantes en la reciente encuesta de la CAP podrían ser aceptados con

el punto de corte $\pm 7\%$. En los valores de Hb A_{1c} por encima del 7%, el corte de la CAP tendría que ser más estricto para estar dentro de $\pm 0,5\%$ de Hb A_{1c}.

Interferencias con las Pruebas de Hb A_{1c}

Para la gran mayoría de los pacientes con diabetes, la Hb A_{1c} proporciona una excelente medida de control de la glucemia. Sin embargo, hay situaciones en las que los resultados de Hb A_{1c} pueden ser poco fiables. Estas incluyen las circunstancias que implican factores que interfieren con la medición real de la Hb A_{1c}, tales como ciertas variantes de la hemoglobina o aductos (30-34), así como factores que afectan a la interpretación de los resultados de la Hb A_{1c}. Esto último incluye la anemia severa por deficiencia de hierro o cualquier otra condición que altera la vida de los eritrocitos (por ejemplo, anemia hemolítica, insuficiencia renal) (35-39). Otros factores, como la raza y la edad, también influirían en la Hb A_{1c}. Los datos revelan que la Hb A_{1c} aumenta aproximadamente 0,1% cada 10 años de edad (40, 41). Sin embargo, este pequeño incremento es poco probable que requiera un cambio en las metas de tratamiento para diferentes grupos de edad. La Hb A_{1c} ha demostrado ser mayor en ciertos grupos étnicos, pero las influencias étnicas sobre la relación entre la Hb A_{1c} y la media de glucosa en la sangre sigue siendo un tema controvertido (42-47).

En general, individuos heterocigotos para las variantes de la hemoglobina o con mayores concentraciones de Hb F, no tienen acortamiento de la supervivencia eritrocitaria, y si se utiliza un método adecuado, la Hb A_{1c} se puede medir con precisión. En varias publicaciones se ha incluido el análisis de los efectos de estas hemoglobinas sobre los resultados de Hb A_{1c} (31-34). Los resultados se resumen en el sitio Web NGSP (48). Estas interferencias son generalmente método-específicas. En general, la Hb AS y Hb AC (dos de las variantes más comunes en el mundo) pueden interferir con algunos inmunoensayos, aunque los inmunoensayos más utilizados están ahora libres de esa interferencia. Las Hb AE y Hb AD interfieren con algunos métodos de HPLC, pero no afectan a los inmunoensayos, muy probablemente debido a la distancia entre el lugar de la modificación de Hb A_{1c} N-terminal y el sitio de E-D y la modificación de la variante de la cadena β de hemoglobina. Si se utiliza un método HPLC de intercambio iónico, la inspección cuidadosa de los cromatogramas suele mostrar picos aberrantes producidos por la mayoría de las variantes, permitiendo la detección de resultados inaceptables. Al igual que con cualquier *test*, se deben investigar más los resultados que son incompatibles con la clínica. La Hb F <10% no afecta a la mayoría de los métodos. Sin embargo, las muestras con Hb F > 10% deben ser analizadas por los métodos que estén libres de interferencias de Hb F para obtener resultados precisos.

Resumen de conclusiones

Desde la aplicación del NGSP en 1996 se han alcanzado considerables logros en la estandarización de los resultados de GHb. Prácticamente todos los laboratorios en los EE.UU., y en muchos otros países, ahora reportan resultados como Hb A_{1c} (en comparación con alrededor del 50% de los participantes de la CAP en 1993) y la variabilidad total se ha reducido considerablemente.

La IFCC ha establecido un método y materiales de referencia que posibilitan la documentación de la trazabilidad a una referencia de primer orden. Aunque las cifras para informar Hb A_{1c} (IFCC, NGSP, eAG, o alguna combinación) están siendo decididas en cada país, el establecimiento de ecuaciones permiten la conversión entre cifras y unidades. Las redes del NGSP y la IFCC tienen funciones complementarias y mantienen una estrecha interacción.

A pesar de los avances que se han hecho, sigue siendo necesaria la reducción del error total para algunos métodos, dada la importancia de la Hb A_{1c} para el monitoreo del tratamiento y la reciente recomendación de utilizar la Hb A_{1c} para el diagnóstico de la diabetes (4). Es probable que en el futuro se requieran nuevas reducciones en los límites aceptables del NGSP y la CAP, y continuará el seguimiento permanente del impacto de estas medidas sobre la calidad de los resultados de Hb A_{1c} en las muestras de pacientes, con el objetivo de garantizar que la calidad de la prueba de Hb A_{1c} sea suficiente para satisfacer las necesidades clínicas.

Abreviaturas no estándar: GHb: hemoglobina glicosilada; Hb A_{1c}: hemoglobina A_{1c}; DCCT: Estudio del Control y Complicaciones de la Diabetes; EDIC: Epidemiología de la Intervención y Complicaciones de la Diabetes; UKPDS: Estudio Prospectivo de Diabetes en Reino Unido; CAP: Colegio Americano de Patólogos; NGSP: Programa Nacional de Estandarización de la Hemoglobina Glicosilada; CPRL: Laboratorio Central de referencia primaria; PRL: Laboratorio de referencia primaria; SRL: laboratorios de referencia secundarios; ADA: Asociación Americana de Diabetes; eAG: media estimada de glucosa; CV: coeficiente de variación.

Contribuciones de los Autores: *Todos los autores confirmaron que han contribuido al contenido intelectual de este trabajo y han cumplido con los siguientes tres requisitos: (a) contribuciones significativas a la concepción y el diseño, adquisición de datos, o análisis e interpretación de datos, (b) redacción o revisión del artículo de contenido intelectual, y (c) la aprobación final del artículo publicado.*

Revelaciones de los autores o de posibles conflictos de interés: *A la presentación de manuscritos, todos los autores han completado la divulgación de los potenciales conflictos de interés. Los posibles conflictos de interés:*

Empleo o de Liderazgo: D.B. Sacks, *Química Clínica*, AACC.

Consultor o Asesor: Ninguno declarado.

Propiedad: Ninguno declarado.

Honorarios: Ninguno declarado.

Financiación de la Investigación: NGSP, contrato de financiación del CDC no. 200-2004-09985.

Testimonio de Expertos: Ninguno declarado.

Papel del Esponsor: Las organizaciones que han financiado no desempeñaron ningún papel en el diseño del estudio, en la elección de los pacientes incluidos, en la revisión e interpretación de datos, o en la preparación o aprobación del manuscrito.

Recibido para su publicación el 24 de agosto 2010. Aceptado para su publicación el 22 de octubre 2010

Referencias bibliográficas

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. White NH, Sun W, Cleary PA, Danis RP, Davis MD, Hainsworth DP, et al. Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes *mellitus*: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial. *Arch Ophthalmol* 2008; 126: 1707–15.
3. U.K. 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). *UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet* 1998; 352: 837–53.
4. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2010. *Diabetes Care*; 33: S11–S61.
5. International Diabetes Federation. Global Guideline for Type 2 Diabetes. <http://www.idf.org/webdata/docs/GGT2D%2006%20Glucose%20control%20levels.pdf> (Accessed August 2010).
6. College of American Pathologists. Electrophoresis/chromatography survey 1993, set EC-C. Northfield (IL): College of American Pathologists; 1993.
7. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE. The National Glycohemoglobin Standardization Program: a five-year progress report. *Clin Chem* 2001; 47: 1985–92.
8. Eckerbom S, Bergqvist Y, Jeppsson JO. Improved method for analysis of glycated haemoglobin by ion exchange chromatography. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 355–60.
9. Shima K, Endo J, Oimomi M, Oshima I, Omori Y, Katayama YJ. Inter-laboratory difference in Hb A_{1c} measurement in Japan: a report of the Committee on an Interlaboratory Standardization of Hb A_{1c} Determination, the Japan Diabetes Society. *Diabetes Soc* 1994; 37: 855–64.
10. National Glycohemoglobin Standardization Program. NGSP protocol. <http://www.ngsp.org/docs/Protocol.pdf> (Accessed August 2010).
11. National Glycohemoglobin Standardization Program. Certified methods and laboratories. <http://www.ngsp.org/certified.asp> (Accessed August 2010).

12. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *OJ L* 1998; 331: 1–37.
13. Steffes M, Cleary P, Goldstein D, Little R, Wiedmeyer HM, Rohlfing C, et al. Hemoglobin A_{1c} measurements over nearly two decades: sustaining comparable values throughout the Diabetes Control and Complications Trial and the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. *Clin Chem* 2005; 51: 753–8.
14. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 78–89.
15. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson J, et al. The IFCC reference measurement system for HbA_{1c}: a 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54: 240–8.
16. IFCC. Working group HbA_{1c}. <http://www.ifcchba1c.net/> (Accessed August 2010).
17. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A_{1c} 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.
18. Sacks DB, ADA EASD IDF Working Group of the HbA_{1c} Assay. Global harmonization of hemoglobin A_{1c}. *Clin Chem* 2005; 51: 681–3.[Free Full Text]
19. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ; A_{1c}-Derived Average Glucose Study Group. Translating the hemoglobin A_{1c} assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008; 31: 1473–8.
20. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A_{1c} measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. *Diabetes Care* 2007; 30: 2399–400.[Free Full Text]
21. Hanas R, John G. Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A_{1c} Measurement. *Clin Chem* 2010; 56: 1362–4.[Free Full Text]
22. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307–10.
23. Little RR, Rohlfing CL. HbA_{1c} standardization: background, progress and current issues. *Lab Med* 2009; 40: 368–73.
24. CAP. GH2-A glycohemoglobin participant summary. 2010.
25. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A_{1c} assay in the diagnosis of diabetes [See comment]. *Diabetes Care* 2009; 32: 1327–34.[Free Full Text]
26. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 193–203.
27. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Type 2 diabetes: newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes. <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/12165/44318/44318.pdf> (Accessed September 2010).
28. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 409–37.
29. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, Grotz VL, Tennill A, England J, et al. Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002; 48: 1116–8.[Free Full Text]
30. Little RR, Tennill AL, Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Khanna R, Goel S, et al. Can glycohemoglobin be used to assess glycemic control in patients with chronic renal failure? *Clin Chem* 2002; 48: 784–6.[Free Full Text]
31. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin [Review]. *Clin Chem* 2001; 47: 153–63.
32. Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Connolly S, Higgins T, Weykamp CW, et al. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb (Hb A_{1c}) by 23 methods. *Clin Chem* 2008; 54: 1277–82.
33. Mongia SK, Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Roberts RF, Owen WE, et al. Effects of hemoglobin C and S traits on the results of 14 commercial glycated hemoglobin assays. *Am J Clin Path* 2008; 130: 136–40.
34. Rohlfing CL, Connolly SM, England JD, Hanson SE, Moellering CM, Bachelder JR, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A_{1c} results: five common hemoglobin A_{1c} methods compared with the IFCC reference method. *Am J Clin Path* 2008; 129: 811–4.
35. Nagayama H, Inaba M, Okabe R, Emoto M, Ishimura E, Okazaki S, et al. Glycated albumin as an improved indicator of glycemic control in hemodialysis patients with type 2 diabetes based on fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 236–40.
36. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A_{1c} in type 1 diabetes *mellitus*. *Pediatr Int* 1999; 41: 357–62.
37. Cohen RM, Franco RS, Khera PK, Smith EP, Lindsell CJ, Ciralo PJ, et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA_{1c}. *Blood* 2008; 112: 4284–91.
38. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Regidor DL, Jing J, Shinnaberger CS, Aronovitz J, et al. A_{1c} and survival in maintenance hemodialysis patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1049–55.
39. Peacock TP, Shihabi ZK, Bleyer AJ, Dolbare EL, Byers JR, Knovich MA, et al. Comparison of glycated albumin and hemoglobin A(1c) levels in diabetic subjects on hemodialysis. *Kidney Int* 2008; 73: 1062–8.
40. Pani LN, Korenda L, Meigs JB, Driver C, Chamany S, Fox CS, et al. Effect of aging on A_{1c} levels in individuals without diabetes: evidence from the Framingham Offspring

- Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2004. *Diabetes Care* 2008; 31: 1991–6.
41. Saaddine JB, Fagot-Campagna A, Rolka D, Narayan KM, Geiss L, Eberhardt M, Flegal KM. Distribution of HbA_{1c} levels for children and young adults in the U.S.: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2002; 25: 1326–30.
 42. Davidson MB, Schriger DL. Effect of age and race/ethnicity on HbA_{1c} levels in people without known diabetes *mellitus*: implications for the diagnosis of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*; 87: 415–21.
 43. Herman WH, Dungan KM, Wolffenbuttel BH, Buse JB, Fahrback JL, Jiang H, et al. Racial and ethnic differences in mean plasma glucose, hemoglobin A_{1c}, and 1,5-anhydroglucitol in over 2000 patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocr Metab* 2009; 94: 1689–94.
 44. Herman WH. Do race and ethnicity impact hemoglobin A_{1c} independent of glycemia? *J Diab Sci Technol* 2009; 3: 656–60.
 45. Kirk JK, Passmore LV, Bell RA, Narayan KM, D'Agostino RB, Jr, Arcury TA, Quandt SA. Disparities in A_{1c} levels between Hispanic and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2008; 31: 240–6.
 46. Herman WH, Ma Y, Uwaifo G, Haffner S, Kahn SE, Horton ES, et al. Differences in A_{1c} by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 2007; 30: 2453–7.
 47. Eberhardt MS, Lackland DT, Wheeler FC, German RR, Teutsch SM. Is race related to glycemic control? An assessment of glycosylated hemoglobin in two South Carolina communities. *J Clin Epidemiol* 1994; 47: 1181–9.
 48. National Glycohemoglobin Standardization Program. NGSP: HbA_{1c} assay interferences. <http://www.ngsp.org/interf.asp> (Accessed August 2010).