

Riscontro di emoglobine anomale utilizzando un test dedicato per Hb A1c

M. Mercadanti, A. Caleffi, E. Bonilauri, C. Monica

U.O. Diagnostica Ematochimica, Dipartimento Patologia e Medicina di Laboratorio,
Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma

Riassunto

Premesse. Il diabete mellito è una patologia gravata da severe complicanze: l'obiettivo fondamentale per prevenirle è costituito dal raggiungimento di un buon controllo glicemico. Il dosaggio dell'emoglobina glicata (Hb A1c) è un parametro essenziale per monitorare il controllo glicemico, poichè ne è stata rilevata la correlazione con le complicanze del diabete.

Le emoglobinopatie hanno un'elevata incidenza nei paesi mediterranei. Lo scopo del lavoro è quello di verificare l'incidenza di varianti emoglobiniche riscontrate durante il dosaggio della A1c, nei pazienti afferenti al laboratorio, provenienti da reparti di degenza e ambulatori esterni e di valutare l'interferenza delle varianti strutturali sul dosaggio della A1c, eseguito in HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione).

Metodi. Dal 2004 al 2007 sono stati selezionati i campioni dei pazienti, avviati per il dosaggio della A1c, eseguito in HPLC, (metodo A1c, Variant II HbA2/HbA1c Dual Program, Bio-Rad, Milano, Italia), i cui cromatogrammi presentavano picchi anomali e/o anomalie morfologiche suggestivi per emoglobinopatie. Gli stessi campioni sono stati processati con il metodo β -Thal (Variant II HbA2/HbA1c Dual Program, Bio-Rad, Milano), che fornisce anche il dosaggio della A1c. Degli stessi pazienti venivano recuperati i dati dell'emocromo.

Risultati. Sono stati riscontrati 219 casi con varianti strutturali e/o HPFH/ $\delta\beta$ talassemia così distribuiti: 19 nel 2004, 37 nel 2005, 51 nel 2006 e

112 nel 2007, che corrispondevano a 115 pazienti, 56 maschi e 59 femmine con età media di 55 anni per i maschi e 46 per le femmine. Esclusi i casi con controlli plurimi o già noti, i pazienti portatori di varianti misconosciute erano 16 nel 2004, 21 nel 2005, 29 nel 2006, 45 nel 2007; 45 soggetti erano in follow-up. I valori della A1c, comparati in 139 casi, erano sovrapponibili nei due metodi: valore medio 7.09 % (+/- 2.03 SD) per il metodo A1c; 7.02 % (+/- 1.95 SD) per il metodo β -Thal. I valori medi di A1c, suddivisi per tipo di variante, erano perfettamente sovrapponibili nei due metodi per le Hb S (54 casi), le Hb C (12 casi), le varianti della catena δ (31 casi) e le HPFH/ $\delta\beta$ (11 casi), erano leggermente diversi in 17 casi di varianti non identificate strutturalmente; in presenza di Hb Toulon e G-Copenaghen era più accurato il valore ottenuto con il metodo β -Thal. Nel 2006, su un totale di 16.145 richieste, corrispondenti a 11.486 pazienti i casi con varianti costituivano lo 0.44% dei pazienti.

Conclusioni. Il sistema HPLC rileva la presenza di varianti strutturali, anche quando presenti in minima percentuale, come le varianti della catena δ (0.5-1.4%). La presenza delle varianti S, C, della catena δ e l'aumento consistente della Hb F non interferiscono con il dosaggio della A1c in HPLC. Solo per alcune varianti meno comuni, è stato necessario ricorrere al metodo β -Thal, che, operando una netta separazione delle frazioni emoglobiniche, fornisce un valore accurato di A1c, anche in presenza di queste varianti emoglobiniche.

Summary

Detection of abnormal haemoglobins using a dedicated HbA1c test

Background. Diabetes mellitus is a pathology associated with severe complications: the fundamental objective of preventing them is constituted by the achievement of good glycaemic control. The level of glycosylated haemoglobin (Hb A1c) is an essential parameter for monitoring glycaemic control as it has been found to be correlated to the complications of diabetes.

Haemoglobin-related diseases have a high incidence in Mediterranean countries. The purpose of the study is to verify the incidence of haemoglobin variants observed during A1c testing in samples from external outpatient clinics and inpatient wards, and to assess the impact of structural variants on A1c levels, using the HPLC (high-pressure liquid chromatography) technique.

Methods. Between 2004 and 2007, we selected all samples submitted for A1c testing by HPLC (A1c, Variant II HbA2/HbA1c Dual Program, Bio-Rad, Milan, Italy), whose chromatograms showed abnormal peaks or patterns suggesting the presence of haemoglobin disorders. The same samples were tested using the β -Thal method (Variant II HbA2/HbA1c Dual Program, Bio-Rad), which also gives the A1c value. A complete blood count was obtained from every patients.

Results. 219 cases with structural variants and/or HPFH/ $\delta\beta$ thalassaemia were observed, distributed as follows: 19 in 2004, 37 in 2005, 51 in 2006 and 112 in 2007, for a total of 115 patients, 56 male and 59 female, with an average age of 55 for males and 46 for females. Ha-

ving excluded multiple tested and known cases, the number of patients with incorrectly diagnosed variants was 16 in 2004, 21 in 2005, 29 in 2006, 45 in 2007; 45 subjects were in follow-up. The A1c values, which were compared in 139 cases, were similar with the two methods: average value 7.09 % (+/- 2.03 SD) for the A1c method; 7.02 % (+/- 1.95 SD) for the β -Thal Method. The average values of A1c, broken down by type of variant, were perfectly correlated in the two methods for HbS (54 cases), and HbC (12 cases), δ chain variants (31 cases) and HPFH/ $\delta\beta$ (11 cases), and were only slightly different in 17 cases of non-structurally identified variants. In the presence of Hb Toulon and G-Copenhagen the value obtained using the β -Thal method was the most accurate. In 2006, of a total of 16,145 test requests, corresponding to 11,486 patients, cases with variants constituted 0.44% of patients.

Conclusions. The HPLC system detects the presence of structural variants, even when present in minimal percentages, as δ chain variants (0.5-1.4%). The presence of S, C and δ variants and the consistent elevation of HbF do not interfere with the A1c value in HPLC. Only the less common variants required use of the β -Thal method, that, by performing a clear separation of the haemoglobin fractions, provides an accurate A1c value, even in the presence of this kind of haemoglobin variants.

Key-words: glycosylated haemoglobins, Hb A1c, HPLC, abnormal haemoglobins, diabetes, structural variants.

Introduzione

Il diabete mellito è una malattia presente in tutto il mondo, seppure con notevoli differenze di incidenza e prevalenza fra le varie nazioni ed etnie. E' una patologia in continuo aumento, gravata da severe complicanze a livello renale, retinico, cardio-vascolare e neurologico, che costituisce uno dei maggiori problemi sanitari nei paesi economicamente evoluti.

L'obiettivo fondamentale per prevenire le gravi complicanze è costituito dal raggiungimento di un buon controllo glicemico^{1,2}.

La determinazione dell'emoglobina glicata (Hb A1c) è ritenuta un parametro essenziale per valutare e monitorare il controllo glicemico³.

Il valore dell'emoglobina glicata è strettamente correlato con il livello medio di glicemia negli ultimi 2-3 mesi ed è il miglior indice disponibile per seguire nel tempo il controllo metabolico della malattia⁴. L'insorgenza di complicanze croniche è tanto più frequente quanto maggiore è l'incremento della Hb A1c sopra la soglia di normalità.

L'incidenza di varianti strutturali nella popolazione

affidente al nostro laboratorio mostra un costante progressivo aumento negli anni che riguarda soprattutto pazienti extracomunitari⁵.

Lo scopo del lavoro è quello di verificare l'incidenza di emoglobinopatie rilevate durante il dosaggio della A1c, nei pazienti afferenti al nostro laboratorio, provenienti dai reparti di degenza e da ambulatori esterni, e di valutare l'interferenza delle varianti strutturali sul dosaggio della A1c.

Materiali e Metodi

Dal 2004 al 2007 abbiamo selezionato i campioni dei pazienti avviati per il dosaggio della A1c, i cui cromatogrammi presentavano picchi anomali e/o anomalie morfologiche suggestivi per emoglobinopatie. Gli stessi campioni venivano avviati, quando possibile, per lo screening delle emoglobinopatie; inoltre venivano recuperati i dati dell'emocromo.

Il dosaggio della A1c e lo screening per emoglobinopatie sono stati eseguiti in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con il sistema Variant II (Bio-Rad Laboratories, Milano)⁶, utilizzando rispettivamente

Tabella I. Numero totale delle varianti emoglobiniche riscontrate, numero di casi per tipo di variante negli anni 2004, 2005, 2006, 2007, numero di accessi per dosaggio della A1c negli stessi anni.

Le altre varianti comprendono emoglobine la cui caratterizzazione strutturale necessita di analisi molecolare dei geni globinici.

Anno	2007	2006	2005	2004
Totale varianti	112	51	37	19
Hb S	46	19	18	5
Hb S/HbX	5			
Hb C	13	3	3	1
Hb delta	19	10	8	5
HPFH/ $\delta\beta$	13	7	2	7
Hb D		1	1	
Hb J	5	1	2	
Hb G-Copenaghen	1	2		1
Hb Toulon		1		
Hb Malmo	1			
Hb E	2			
Altre varianti	7	7	3	
Numero accessi per dosaggio A1c	24.181	16.145	9.098	5.738

Tabella II. Valori medi di Hb A1c ottenuti con i metodi A1c e β -Thal differenziati per tipo di variante. Le altre varianti comprendono emoglobine la cui caratterizzazione strutturale necessita di analisi molecolare dei geni globinici.

Tipo variante	Numero casi per variante	Valore medio A1c Metodo A1c	Valore medio A1c Metodo β -Thal
Hb S	54	7.0 %	7.0 %
Hb C	12	7.3 %	7.4 %
Hb delta	31	7.3 %	7.2%
HPFH/ $\delta\beta$	11	7.2 %	7.2 %
Hb J	5	6.0 %	6.1 %
Hb S/HbX	5	7.2 %	7.0 %
Hb G-Copenaghen	2	8.7 %	7.5%
Hb Toulon	1	4.8%	6.1 %
Hb Malmo	1	4.5 %	4.2 %
Altre varianti	17	7.1%	6.8 %

te il metodo A1c ed il metodo β -Thal del programma HbA2/HbA1c Dual, su sangue intero con EDTA. Il sistema cromatografico utilizza lo stesso kit reagenti per i due metodi, mentre differiscono i calibratori, i controlli ed il programma analitico: il metodo A1c, dedicato al dosaggio della A1c, fornisce il risultato in 3 minuti, mentre il metodo β -Thal, dedicato allo screening per le emoglobinopatie, con un tempo di analisi di 6 minuti, fornisce anche il valore della A1c calibrato.

Per la conferma delle varianti Hb S ed Hb C sono stati utilizzati i seguenti tests: migrazione elettroforetica a pH alcalino ed acido, test di falcizzazione.

La presenza delle varianti della catena delta è stata confermata mediante migrazione elettroforetica a pH alcalino e riprocessando il campione con il metodo dedicato per emoglobinopatie, dopo lavaggio delle emazie, per escludere l'eventualità di artefatti o interferenze intrinseche al campione. Nel metodo dedicato per A1c, la presenza di varianti della catena δ si manifesta con una alterazione della branca discendente del picco della Hb A, caratterizzata dalla comparsa di un picco aggiuntivo in prossimità della base, come appare in Fig 6; nel metodo dedicato per emoglobinopatie

si manifesta con la presenza di un piccolo picco che eluisce dopo la A_2 a distanza variabile, più o meno vicino alla A_2 , a seconda dei casi. La presenza delle altre varianti riscontrate è stata confermata mediante migrazione elettroforetica a pH alcalino e acido. Le Hb Toulon e Malmö sono state tipizzate presso il Laboratorio di Genetica Umana / Microcitemia Ospedali Galliera, Genova.

Risultati

Nel corso del dosaggio dell'emoglobina glicata sono stati riscontrati, durante i quattro anni dello studio, 219 casi con presenza di varianti strutturali e HPFH/ $\delta\beta$: la distribuzione per anno ed il tipo di variante sono riportati nella Tabella I, che riporta anche il numero di accessi per il dosaggio della A1c negli anni considerati.

In 139 casi sono stati comparati i valori di A1c ottenuti con il metodo A1c e con il metodo β -Thal: il valore medio delle A1c risultava rispettivamente: 7.09 % (+/- 2.03 SD) e 7.02 % (+/- 1.95 SD). L'età media dei pazienti era 52.4 anni. La Tabella II riporta i valori medi delle A1c ottenute con i due metodi suddivisi per tipo di variante. In tre gruppi, varianti più frequenti

Tabella III. Età media dei pazienti, numero casi, distribuzione per sesso suddivisi per tipo di variante. Le altre Hb comprendono emoglobine la cui caratterizzazione strutturale necessita di analisi molecolare dei geni globinici.

Tipo variante	Età media pazienti (range anni)	Numero casi	Maschi	Femmine	Origine I (%)	S (%)
Hb S	42.65 (21-93)	46	19	27	17.4	82.6
Hb C	42.75 (20-66)	12	9	3	16.7	83.3
HPFH/ $\delta\beta$	46.15 (1-69)	19	9	10	73.7	26.3
Hb delta	66.6 (37-92)	20	11	9	85.0	15.0
Altre Hb	62.5 (8-80)	18	8	10	72.2	27.8

I = italiani, S = stranieri

(Hb S e Hb C) e gruppo con maggiore numerosità (varianti della catena δ), è stata condotta una analisi statistica secondo Bland-Altman⁷. La media delle differenze è risultata in tutti i gruppi inferiore allo 0.1% (-0.051%, 0.075% e -0.055% per Hb S, Hb C e varianti della catena δ rispettivamente), valore che corrisponde all'errore intrinseco dello strumento. Il calcolo dello scarto quadratico medio è risultato nei tre gruppi inferiore allo 0.2%. Le distribuzioni delle differenze, riportate nei grafici di Bland-Altman (Fig. 1, 2, 3) evidenziano che tali differenze sono ben distribuite all'interno delle due deviazioni standard rispetto alla media. Solo la Hb S tende ad avere qualche valore fuori limite soprattutto per valori elevati di A1c.

Le Figure 4, 5, 6, 7 riportano esempi di cromatogrammi relativi ad alcuni tipi di varianti ottenuti con i due metodi. I 219 casi con varianti corrispondevano a 115 pazienti, 56 maschi e 59 femmine con età media di 55.03 anni per il sesso maschile (range 20-87 anni) e di 46.12 anni per quello femminile (range 1-93 anni); 54 pazienti erano di nazionalità italiana, 61 erano di diversa nazionalità, per lo più extracomunitari; 37 soggetti provenivano dai reparti di degenza mentre 78 erano ambulatoriali.

I soggetti portatori di Hb S e Hb C erano in maggioranza stranieri (Tab. III), mentre le varianti della catena δ , le HPFH/ $\delta\beta$ e le altre varianti strutturalmente non identificate, si riscontravano prevalentemente in soggetti italiani.

La Tabella III riporta l'età media, il numero di soggetti, la distribuzione fra i sessi e l'origine dei pazienti suddivise per cinque gruppi di varianti (Hb S, Hb C, HPFH/ $\delta\beta$, varianti della catena δ , altre varianti emoglobiniche strutturalmente non identificate).

L'analisi dei parametri emocromocitometrici presenti in 81 pazienti documentava il rilievo di 8 anemie normocitiche, 10 anemie microcitiche, 10 microcitosi senza anemia e 53 casi nei limiti della normalità.

Per ogni anno sono stati estrapolati i pazienti che presentavano ripetuti controlli nell'anno o negli anni precedenti o già noti come portatori di emoglobinopatie, per valutare l'incidenza di nuovi casi di portatori misconosciuti che sono risultati 16 nel 2004, 21 nel 2005, 29 nel 2006, 45 nel 2007. I pazienti in follow-up erano 45.

Nell'anno 2006 il laboratorio ha eseguito 16.145 de-

terminazioni per Hb A1c, corrispondenti a 11.486 pazienti: i casi con varianti costituivano lo 0.44% dei pazienti esaminati.

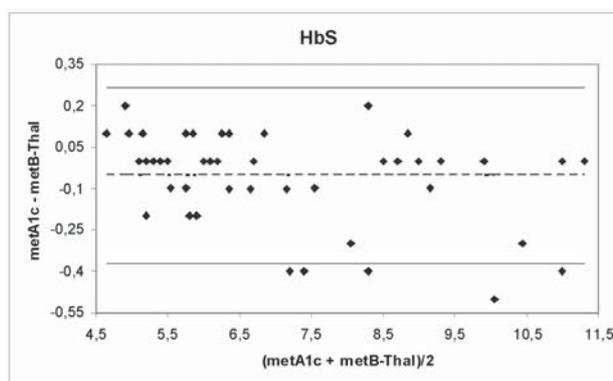


Figura 1. Grafico di Bland-Altman relativo alle Hb S.

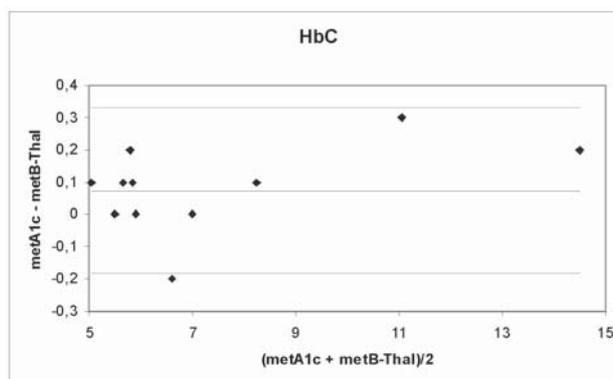


Figura 2. Grafico di Bland-Altman relativo alle Hb C.

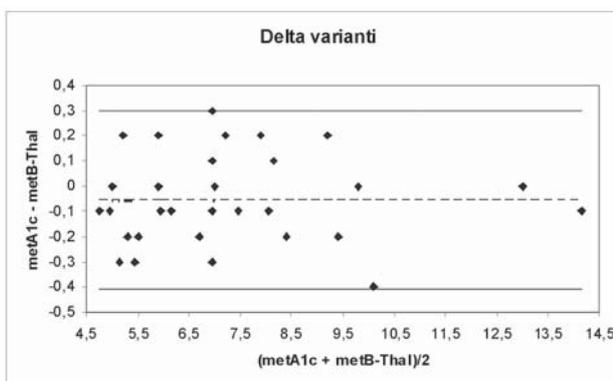


Figura 3. Grafico di Bland-Altman relativo alle varianti delle catene δ .

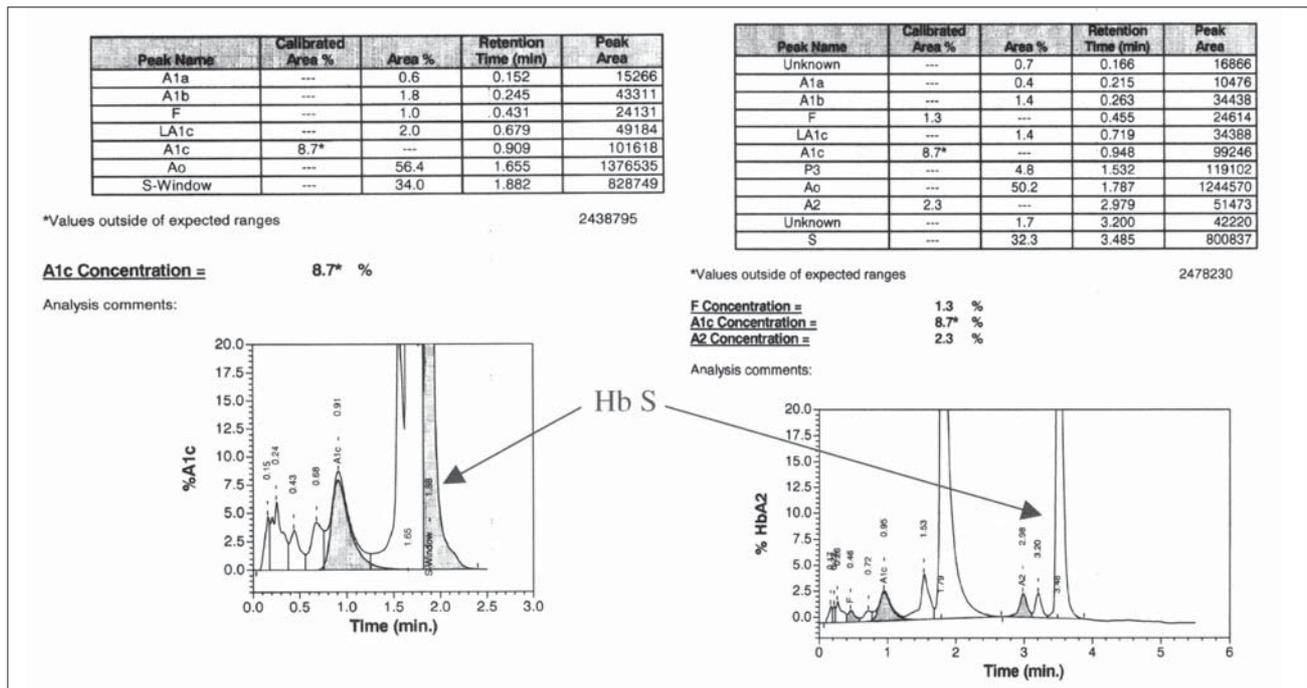


Figura 4. Cromatogrammi di eterozigosi Hb S ottenuti con il programma HbA2/HbA1c Dual metodo A1c (lato sinistro) e metodo β -Thal (lato destro).

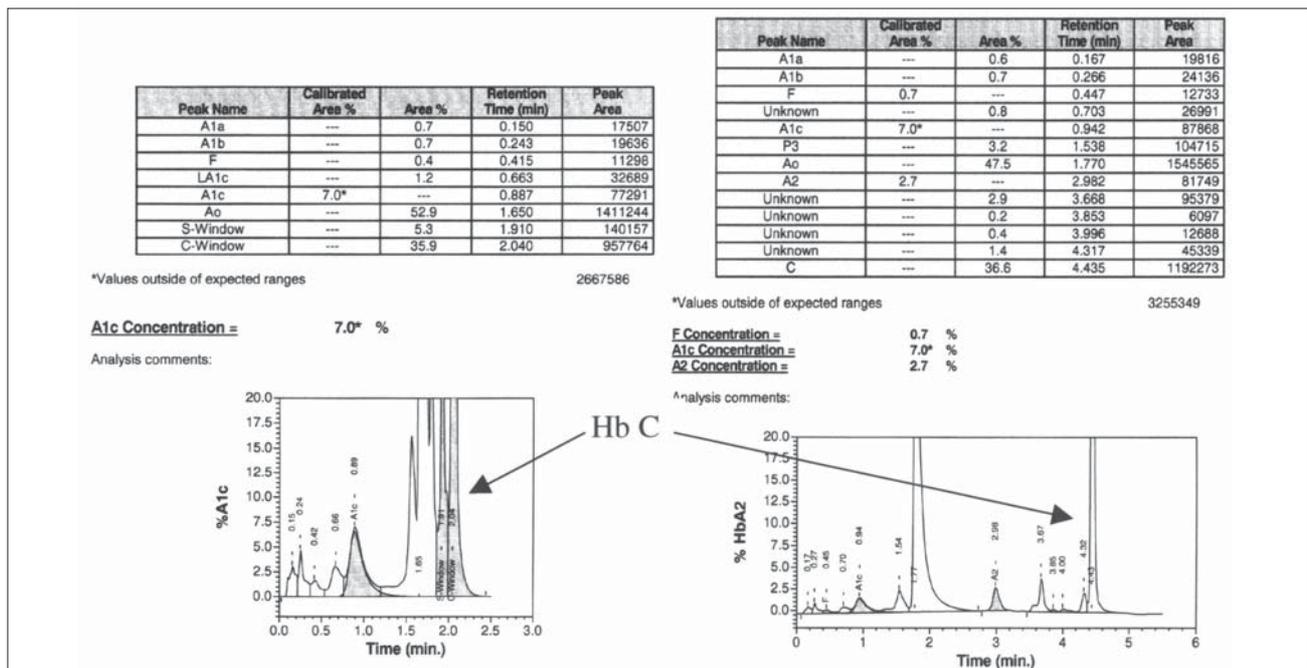


Figura 5. Cromatogrammi di eterozigosi Hb C ottenuti con il programma HbA2/HbA1c Dual metodo A1c (lato sinistro) e metodo β -Thal (lato destro).

Discussione

Il nostro lavoro è stato condotto per rispondere a due quesiti che si pongono nella pratica quotidiana: a) se il rilievo casuale di una frazione emoglobinica anomala nel cromatogramma relativo al dosaggio dell'emoglobina glicata, eseguito con il metodo A1c, necessiti di conferma con il metodo β -Thal, prima di segnalare la presenza nel referto; b) se nei pazienti portatori di emoglobinopatie il valore di A1c ottenuto con

il metodo dedicato sia corretto e/o in quali casi sia necessario ricorrere al metodo specifico per le emoglobinopatie.

I nostri dati dimostrano che i valori di A1c sono sovrapponibili nei due metodi per la maggior parte dei casi con varianti, comprese le Hb S e le Hb C, che costituiscono le forme più diffuse e clinicamente più importanti per la gravità della condizione omozigote e delle associazioni con altri difetti strutturali e/o talasse-

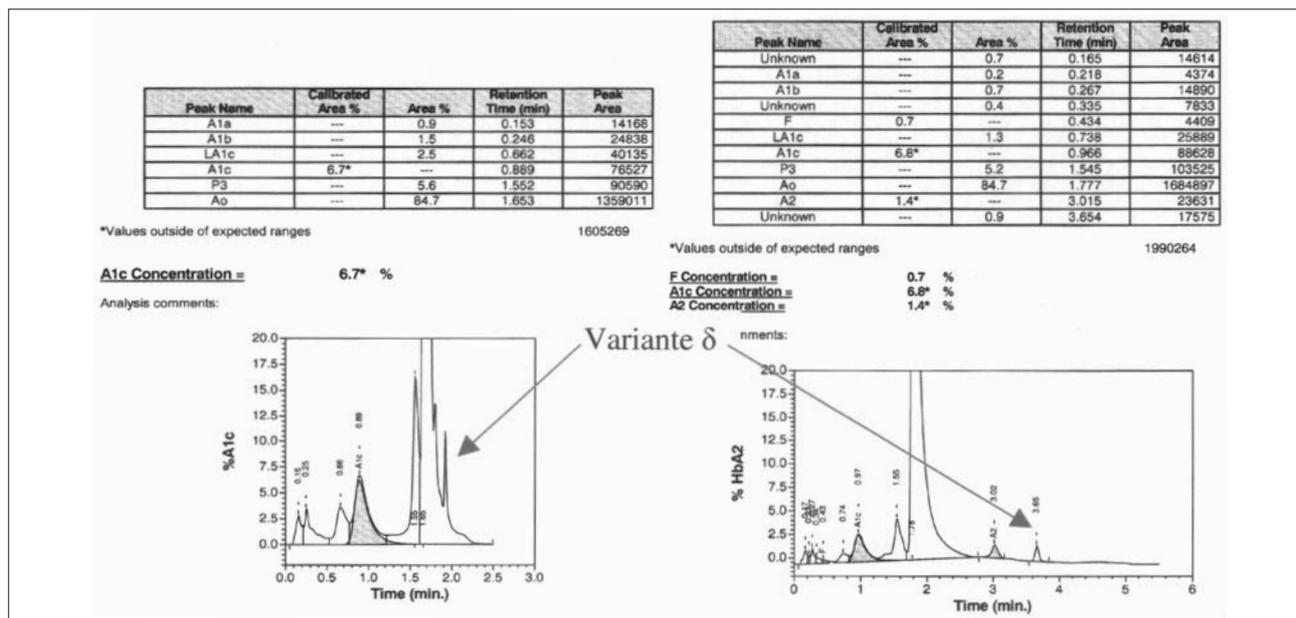


Figura 6. Cromatogrammi di eterozigosi Hb δ ottenuti con il programma HbA2/HbA1c Dual metodo A1c (lato sinistro) e metodo β -Thal (lato destro).

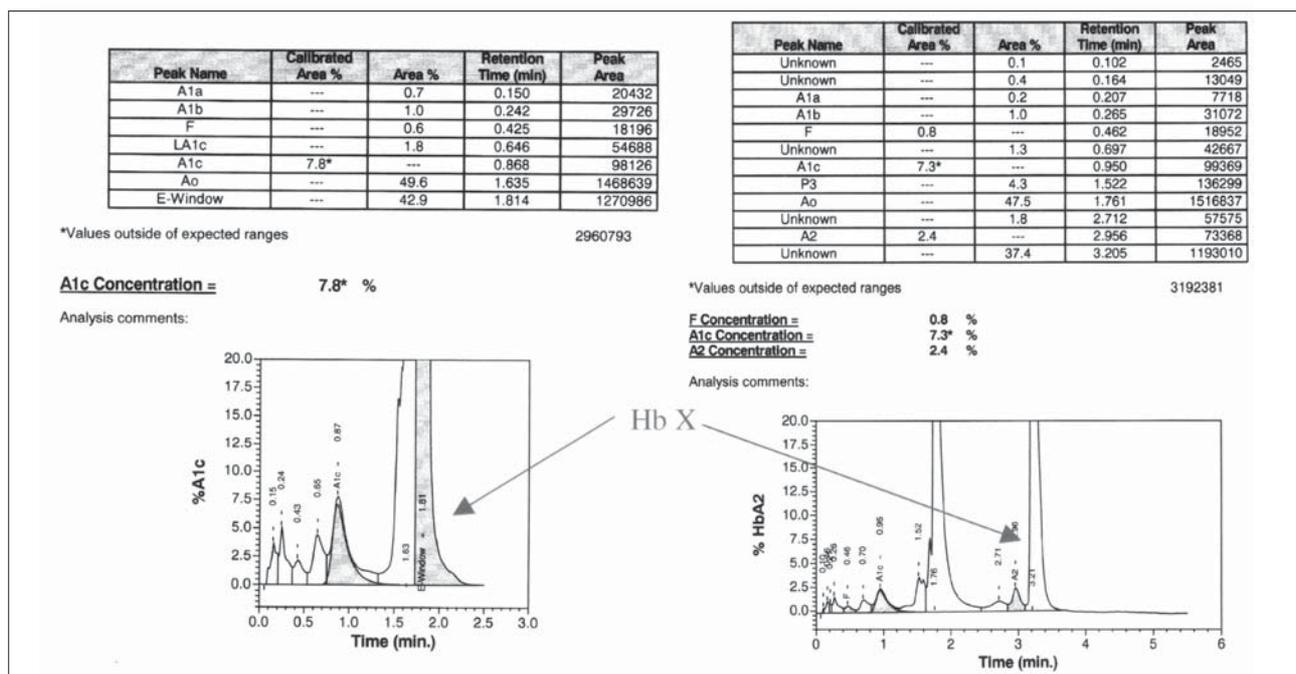


Figura 7. Cromatogrammi di una variante emoglobinica non identificata strutturalmente (Hb X) ottenuti con il programma HbA2/HbA1c Dual metodo A1c (lato sinistro) e metodo β -Thal (lato destro).

mici. Si evince quindi dai nostri risultati che la presenza delle varianti Hb S, C, della catena δ ed il consistente aumento della Hb F non interferiscono con il dosaggio della A1c eseguito in HPLC con il metodo A1c del programma Hb A2/Hb A1c Dual.

Solo per poche varianti, meno comuni, quali la G-Copenaghen, la Toulon (Fig. 8) e la Malmö (Fig. 9), è necessario ricorrere al metodo β -Thal che, migliorando la separazione fra l'emoglobina A e le emoglobine anomale, fornisce un dosaggio accurato di Hb A1c,

anche in presenza di queste varianti.

Il metodo consente inoltre il rilievo, ad una attenta ispezione del cromatogramma, di varianti presenti in minima percentuale come le varianti della catena δ (0.5-1.4%).

Poichè esistono in commercio vari sistemi analitici per la determinazione della A1c, che possono essere suddivisi in due gruppi maggiori, sistemi cromatografici basati sulla differenza di carica elettrica della Hb A1c rispetto alla Hb A e sistemi immunochimici, esiste

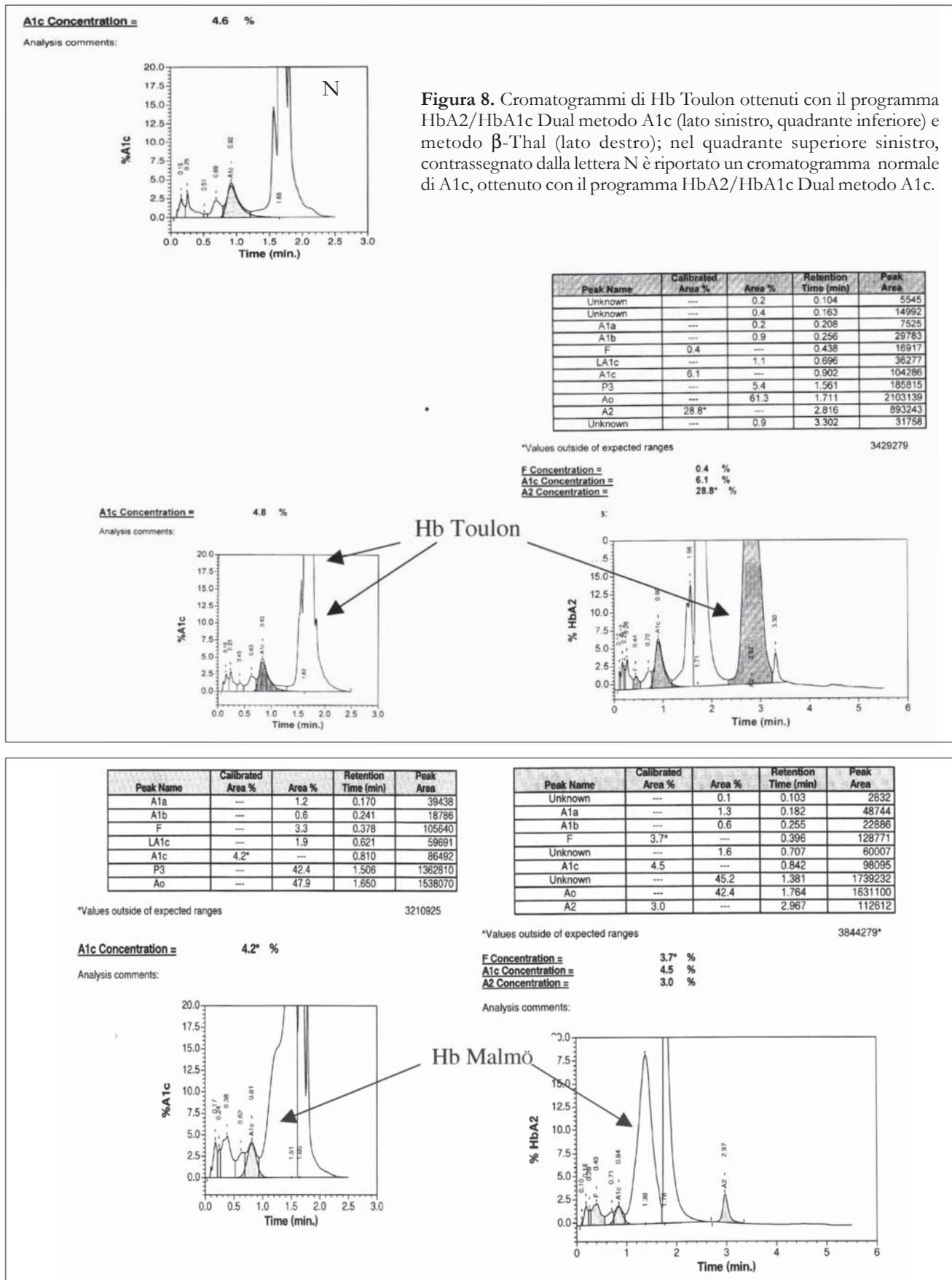


Figure 9. Cromatogrammi di Hb Malmö ottenuti con il programma HbA2/HbA1c Dual metodo A1c (lato sinistro) e metodo β -Thal (lato destro).

in letteratura un dibattito sulle peculiarità analitiche dei vari metodi in rapporto alla copresenza di varianti emoglobiniche^{8,9}.

I nostri dati sono concordanti con i risultati dello studio di Lafferty¹⁰ il quale, nell'ambito della valutazione del Dual Hemoglobin A₂/A_{1c} Kit, afferma che la presenza di Hb S, C, E, allo stato eterozigote, viene correttamente rilevata con il metodo A1c e non ha effetto sui valori di A1c. Lo stesso Autore confrontando il metodo β -Thal del Dual Program con il metodo β -Thalassemia Short ha evidenziato il mancato riscontro di due varianti della catena δ con il Dual Program rispetto al metodo β -Thalassemia Short.

Il nostro lavoro documenta il rilievo di varianti della catena δ , anche in caso di minime percentuali, con il metodo A1c confermate con il metodo β -Thal. Indubbiamente la presenza di varianti della catena δ si manifesta con un'anomalia morfologica del cromatogramma che è meno evidente (Fig. 6) rispetto alle varianti delle catene α e β presenti in percentuali molto più consistenti, che presentano aspetti morfologici facilmente riconoscibili e codificati per le forme più frequenti quali S e C (Fig. 4 e 5). Nel lavoro condotto da Higgins e Ridley¹¹, nel tentativo di identificare le varianti riscontrate con il metodo A1c Dual, sulla base del tempo di ritenzione e delle caratteristiche dei picchi cromatografici, gli Autori riportano un tempo di ritenzione altamente stabile nel tempo e con diversi lotti di reagenti e colonne analitiche per le varianti S, E, D. Gli stessi autori sottolineano altresì che il crescente utilizzo dei sistemi in HPLC per la quantificazione della A1c ha portato un incremento del riscontro fortuito di varianti strutturali clinicamente silenti ed esprimono la necessità di segnalare la presenza al curante. In un successivo lavoro, gli stessi Autori propongono l'utilizzo del metodo A1c per lo screening dell'eterozigosi S nei donatori di sangue, in sostituzione dei tests di solubilità della Hb S¹².

Anche il nostro studio documenta un costante aumento nel tempo di pazienti affetti da diabete o da intolleranza glucidica, portatori di emoglobinopatie misconosciute che sono state riscontrate nel corso della determinazione della A1c. Questo rilievo non è inatteso considerando che il diabete mellito e le emoglobinopatie costituiscono due patologie in costante crescita anche nella nostra regione: ne consegue la necessità per il laboratorio di disporre di sistemi analitici in grado di rilevare la presenza di varianti strutturali nel corso del dosaggio della A1c e di fornire dosaggi accurati di questa frazione anche in presenza di altre componenti emoglobiniche.

Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo stilato un protocollo interno che prevede di fornire il valore di A1c ottenuto con il metodo A1c nei casi di eterozigosi S, C, δ , HPFH/ $\delta\beta$ thal, mentre nel caso di altre varianti

i campioni vengono processati con il metodo β -Thal e viene fornito il valore di A1c ottenuto con questo metodo. In ogni caso viene segnalato nel referto il rilievo di una componente anomala con l'indicazione di richiedere la determinazione dell'assetto emoglobinico.

Abbiamo inoltre deciso di segnalare la presenza di varianti della catena δ , che hanno significato clinico solo quando il valore complessivo delle frazioni A₂ supera la soglia di normalità (3.2%), valutando caso per caso, in rapporto all'età del paziente ed agli indici emocromocitometrici.

Sottolineiamo quindi l'importanza di un sistema analitico che evidenzii, nel corso del dosaggio della A1c, la presenza delle più comuni varianti emoglobiniche, poiché non è infrequente il riscontro di eterozigosi Hb S e C durante il dosaggio della A1c, vista l'incidenza tanto di soggetti diabetici quanto di portatori di varianti emoglobiniche⁵ nella nostra popolazione. Trattandosi di forme clinicamente asintomatiche, con parametri ematochimici per lo più nella norma, spesso il riscontro casuale costituisce la prima segnalazione del difetto genetico ed assume un notevole rilievo dal punto di vista eugenetico, soprattutto nel caso di soggetti in età fertile.

Auspichiamo infine che i nostri risultati e il conseguente protocollo adottato possano essere confermati o confrontati con le esperienze di altri laboratori, anche in merito alla opportunità di segnalare la presenza delle varianti della catena delta.

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; 352:837-53.
3. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott ML. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48:436-72.
4. Manley S. Haemoglobin A1c- A marker for complications of type 2 diabetes. The experience from the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1182-90.
5. Mercadanti M, Caleffi A, Monica C. Incidenza di emoglobinopatie in una zona "non endemica". *RIMeL/IJLaM* 2007; 3:256-61.
6. Moridani MY, Verjee Z, Allen LC. Analytical evaluation of hemoglobin A1c dual kit assay on Bio-Rad Variant II: an automated HPLC hemoglobin analyzer for the management of diabetic patients. *Clin Biochem* 2003; 36: 317-20.
7. Bland JM, Altman DG. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement.

- Lancet 1986; 1:307-10.
8. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 4:153-63.
 9. Roberts WL, Barun KD, Brown D, Hanbury CM, Hoyer JD, John WG, et al. Hemoglobin C and S Trait on Eight glycated hemoglobin Methods. *Clin Chem* 2002; 48: 383-5.
 10. Lafferty JD, McFarlane AG, Chui DHK. Evaluation of a dual hemoglobin A₂/A_{1c} quantitation Kit on the Bio-Rad Variant II automated hemoglobin analyzer. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:1494-500.
 11. Higgins TN, Ridley B. Tentative identification of hemoglobin variants in the Bio-Rad Variant II Hb A1c method. *Clin Biochem* 2005; 38:272-7.
 12. Higgins TN, Ridley B, Clarke G. Novel method for screening for the presence of hemoglobin S in blood. *Transf Med* 2005; 15:493-7.