

Hemoglobin A1c Ölçümünde Hemoglobin Varyantlarının İnterferansı

[Interference of Hemoglobin Variants in the Measurement of Hemoglobin A1c]

Yasemin Gülcan Kurt¹,

Tuncer Çaycı¹,

E. Özgür Akgül¹,

İbrahim Aydın¹,

Fevzi N. Aydın¹,

Mehmet Ağıllı¹,

Halil Yaman¹,

Erdoğan Çakır¹,

Mehmet Yaşar²,

Cumhur Bilgi¹,

M. Kemal Erbil¹

¹ GATA Tıbbi Biyokimya AD. Bşk.İği, 06018, Etlik,

Ankara, Türkiye

²GATA Acil Tıp AD. Bşk.İği, 06018, Etlik, Ankara, Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Yrd. Doç. Dr. Yasemin Gülcan Kurt

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biyokimya AD. Bşk.İği, 06018, Etlik, Ankara, Türkiye
Tel : 0-312-3043323
Fax : 0-312-3043300
E-mail : ygkurt@gmail.com

Kayıt Tarihi : 27 Mayıs 2010 ; Kabul Tarihi : 21 Temmuz 2010

[Registered : 27 May 2010 ; Accepted : 21 July 2010]

ÖZET

Amaç: Hemoglobin A1c testi, Diabetes Mellitus hastalarının tedavi takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, hastaların hemoglobin A1c değerlerini, hemoglobin elektroforezi sonuçları ile birlikte değerlendirilerek varyant hemoglobinlerinin hemoglobin A1c ölçümü üzerine etkisini incelemek amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Hem hemoglobin A1c hem de hemoglobin elektroforezi çalışılmış 60 hastanın sonuçları geriye dönük olarak incelendi. Hemoglobin A1c ölçümleri, UV-Vis dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemi ile ve iki farklı programla (standart ve düzeltilmiş) yapıldı.

Bulgular: 60 hastanın standart programla ölçülen hemoglobin A1c değerleri ortalaması % 6.5 ± 2.3 (Ortalama ± Standart sapma) idi. Hastaların 22'sinde (% 45) hemoglobin A1c sonuçları % 6.5'in üzerindeydi. Düzeltilmiş program ile ölçülen hemoglobin A1c değerleri ortalaması ise % 5.5 ± 1.5 idi (p<0.001). Düzeltilmiş programla, hemoglobin A1c sonucu % 6.5'un üzerinde olan hasta sayısı 12 (% 20) idi. 33 hastada (% 55) hemoglobin elektroforezi sonuçları patolojikti.

Sonuçlar: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ile hemoglobin A1c ölçümlerinde, yanlış yüksek sonuçlara bağlı olarak hastalara gereksiz ve yanlış tedaviler verilebilecektir. Bu nedenle yanlış ölçümlerden kaynaklanacak morbidite ve mortaliteyi en aza indirmek için, hemoglobin A1c ölçümleri sırasında varyant hemoglobine bağlı bu interferans durumunun göz önünde bulundurulması, laboratuvarlar açısından önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: hemoglobin A1c ölçümü, hemoglobin varyantları, interferans

ABSTRACT

Purpose: The hemoglobin A1c test is widely used in monitoring the treatment of diabetes mellitus patients. In this study, it is aimed to investigate the effect of variant hemoglobins on hemoglobin A1c measurements by evaluating hemoglobin A1c values of patients with the results of hemoglobin electrophoresis.

Materials and Methods: The results of 60 patients which had been studied both hemoglobin A1c and hemoglobin electrophoresis was analyzed retrospectively. Hemoglobin A1c measurements were performed with high pressure liquid chromatography system with UV-Vis detector by using two different programs (standard and corrected).

Results: Average hemoglobin A1c level of 60 patients measured by standart program was 6.5% ± 2.3 (mean ± standard deviation). Hemoglobin A1c results of 22 patients (45%) were above 6.5%. The mean hemoglobin A1c level measured by the corrected program was 5.5% ± 1.5 (p<0.001). With the corrected program, the number of patients that had hemoglobin A1c results over 6.5% was 12 (20%). In 33 of 60 patients (55%), hemoglobin electrophoresis results were pathologic.

Conclusion: Unnecessary and wrong treatments could be given to patients depending on the wrong high hemoglobin A1c results, measured by high pressure liquid chromatography. Therefore to minimize morbidity and mortality due to incorrect hemoglobin A1c measurements, to consider the interference due to hemoglobin variant is of great importance in terms of laboratories.

Key Words: hemoglobin A1c measurement, hemoglobin variants, interference

Giriş

Diabetes Mellitus (DM), pankreastan insülin salınımının veya insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan; karbohidrat, protein ve yağ metabolizması bozuklukları ile karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır. DM, yüksek morbidite ve mortalite hızı, ciddi tedavi harcamaları ve iş gücü kaybına sebep olmasıyla, hastaya ve topluma büyük yük getiren önemli bir halk sağlığı sorunudur [1-3]. DM hastalığındaki yüksek morbidite ve mortalite oranlarından, çoğunlukla uzun dönemdeki mikro ve makrovasküler komplikasyonlar sorumludur [4-6]. Yapılan kapsamlı çalışmalarda (Diabetes control and complications trial-DCCT, United Kingdom prospective diabetes study-UKPDS), Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalarda mikrovasküler komplikasyonların (retinopati, nefropati, vb.) gelişme riskinin, glisemik kontrol derecesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, glisemik kontrolün takibinde hemoglobin A1c (HbA1c) kullanılmıştır [1,2,7-9]. Bu durum HbA1c'nin, rutin biyokimyasal testlerden sonra en çok istenen test haline gelmesini sağlamıştır.

HbA1c kandaki ana glikozile hemoglobin (Hb)'dir ve HbA1'in ~ % 80'ni oluşturur. Glikozile Hb, glukozun Hb'in yapısındaki aminoasitlere enzimatik olmayan bir reaksiyon sonucu bağlanmasıyla oluşur. HbA1'in β-zincirinin N-terminal (valinil) amino grubuna glukoz bağlanması ile oluşan dayanıklı yapı Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) tarafından HbA1c olarak tanımlanmıştır. HbA1c'nin % 50'sinin örnek alınmasından önceki ilk ayda, % 25'inin ondan önceki ayda, kalan % 25'inin ise daha önceki 2-4 ay içinde oluştuğu pek çok çalışmada gösterilmiştir [9-15].

Günümüzde, HbA1c ölçümünde spektrofotometrik yöntemler, iyon değiştirici kromatografi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), elektroforez, izoelektrik odaklama ve afinite kromatografisi gibi 30'dan fazla değişik metod kullanılmaktadır.

HbA1c ölçümünde standardizasyon henüz tam olarak sağlanamamıştır. HbA1c ölçümünde Amerikan Diyabet Cemiyeti (American Diabetes Association, ADA)'nin belirlediği en önemli problem, laboratuvarlar arası farklı test sonuçlarıdır. Bunun sebebi, hem metotların farklı olması, hem de bu ölçümleri interfere eden durumların fazlalığıdır. Örneğin demir eksikliği anemisinde, HbA1c gerçek değerinden yüksek çıkmakta [16], vitamin C ve E, hemoglobinin glikozillenmesini engelleyerek yanlış düşük sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca, hemolitik anemi ve akut kanamalarda da yanlış düşük sonuçlar elde edilmektedir [17,18]. Bununla birlikte, HbF, HbS, HbC, HbH gibi hemoglobin varyantları ve subtipleri ile yine renal yetmezlikli diyabetlilerde ürenin hemoglobine bağlanmasıyla oluşan karbamilenmiş hemoglobin, aspirin kullanan hastalarda oluşan asetillenmiş hemoglobin, HbA1c ölçümünü interfere ederek yanlış yüksek sonuçlara neden olmaktadır [16-18].

ADA, HbA1c ölçümünde altın standart yöntem olarak

HPLC önermiştir [17]. HPLC yöntemi, ilaç etkileşimleri, hemoglobinopatiler ve talasemilerden en az oranda etkilenmekte olup; HbA1c ölçümünde en doğru sonucu vermektedir [10,17]. HPLC, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP) tarafından sertifikalandırılmış bir yöntemdir [10,17].

Bu çalışmada, HbA1c ile birlikte hemoglobin elektroforezi istenmiş hastaların hemoglobin A1c değerlerini, hemoglobin elektroforezi sonuçları ile birlikte değerlendirerek; varyant hemoglobinlerin hemoglobin A1c sonuçları üzerine etkisini incelemek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

HbA1c kromatogramlarında, HbF, HbA2 veya varyant hemoglobin varlığı şüphesi nedeniyle iki ayrı HPLC programı (standart ve düzeltilmiş) ile HbA1c ölçümü yapılan ve birlikte hemoglobin elektroforezi istenmiş 60 hastaya ait sonuçlar geriye dönük olarak incelendi. Sonrasında HbA1c sonuçları aynı hastalara ait hemoglobin elektroforez sonuçları ile birlikte değerlendirildi.

Standart HbA1c Ölçümü: HbA1c ölçümleri, UV-1000 visible dedektörlü HPLC (Thermo Electron, Thermo finnigan (TSP) San Jose, CA, USA) cihazı ve Recipe HbA1c kiti (Recipe Chemicals – Instruments GmbH, Munich, Germany) kullanılarak yapıldı. Kısaca, 5 µL EDTA'lı kan örneği 1.25 mL Hemolysis Reagent H ile karıştırıldıktan sonra oda ısısında 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu örnekten 20 µL HPLC sistemine enjekte edildi. Üçlü gradiyent programı (Tablo 1) ile 415 nm'de dedeksiyon yapıldı. Kromatogramda 1.45 dakikada elde edilen pikin alanı (HbA1c) ile tüm piklerin alanları (total Hb) hesaplandı ve $(\{HbA1c/total\} \times 100)$ formülü ile HbA1c değeri otomatik olarak hesaplandı.

Düzeltilmiş HbA1c Ölçümü: Bu ölçüm sırasında da aynı cihaz, donanım ve kitler kullanıldı. Ancak farklı bir akım hızı ve gradient programı ile çalışıldı. Bu program (Tablo 2) ile elde edilen kromatogramlarda HbA1c için retansiyon zamanı 3.20 dakikaydı. Bu şekilde HbA1c pikinin diğer varyant Hb piklerinden ayrımı sağlanmış oldu.

Hemoglobin Elektroforez Ölçümü: Hemoglobin elektroforezi, Sebia Hydrasys (Sebia, Parc Technologique Léonard de Vinci CP 8010 Lisses Evry Cedex, France) cihazı ile Hydragel Hemoglobin(E) kiti kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı. EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Daha sonra eritrosit paketi, serum fizyolojik ile 2 kez yıkandı. Yıkama sonrası eritrosit paketinden 10 µL alınarak, 130 µL hemolizat sıvısı ile karıştırıldı ve bu karışım 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. Hazırlanan bu hemolizattan 10 µL örnek, jele applike edildi. Çalışma sonrası dansitometre ile değerlendirmeler yapıldı.

İstatistik Analiz

Veriler, *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, version 15.0, Chicago, IL, USA) programı

kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma, ortanca (en küçük - en büyük) ve frekans (yüzde) olarak verildi. Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. İkişerli karşılaştırmalar Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Vakalara ait her iki HPLC yöntemiyle ölçülen HbA1c sonuçları ve elektroforez verileri Tablo 3'de sunulmuştur. Varyant hemoglobin şüphesi olan 60 hastanın standart HbA1c ölçüm yöntemi ile ortalama HbA1c değerleri $\% 6.5 \pm 2.3$ olarak hesaplandı. Düzeltilmiş program ile ölçülen ortalama HbA1c değerleri $\% 5.5 \pm 1.5$

Tablo 1. Standart HbA1c ölçümü için HPLC programı.

Süre (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Mobil Faz C (%)	Akış hızı (mL/dk)
0.0	100			1.9
0.2		100		1.9
0.8		100		1.9
0.9			100	1.9
1.2			100	1.9
1.3	100			1.9
1.4	100			1.9
1.5	100			1.9

Tablo 2. Düzeltilmiş HbA1c ölçümü için HPLC programı.

Süre (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Mobil Faz C (%)	Akış hızı (mL/dk)
0.0	100			1.0
1.8		100		0.8
3.1		100		0.8
3.4			100	0.8
4.4			100	1.0
4.5	100			1.0

Tablo 3. Vakalara ait her iki HPLC yöntemiyle ölçülen HbA1c sonuçları.

	Standart HbA1c Ölçümü Yöntemi	Düzeltilmiş HbA1c Ölçümü Yöntemi	Ortalama Değişim (%)	P*
HbA1c düzeyleri (%) n=60 (%100)	6.5 \pm 2.3 5.9 (3.3 – 17.2)	5.5 \pm 1.5 5.3 (3.2 – 10.2)	11	<0.001
Elektroforez				
Patolojik n=33 (% 55)	7.1 \pm 2.9 6.3 (3.3 – 17.2)	5.8 \pm 1.8 5.4 (3.2 – 10.2)	14	<0.001
Normal n=27 (% 45)	5.7 \pm 0.8 5.6 (3.5 – 7.2)	5.2 \pm 0.8 5.2 (3.3 – 6.8)	8	<0.001
HbA1c > % 6.5 n=22 (%100)	8.6 \pm 2.6 7.3 (6.5 – 17.2)	6.9 \pm 1.6 6.6 (4.8 – 10.2)	25	<0.001
Patolojik elektroforez n=16 (%73)	9.3 \pm 2.8 9.1 (6.6 – 17.2)	7.2 \pm 1.7 6.7 (4.8 – 10.2)	30	<0.001
Normal elektroforez n=6 (%27)	6.8 \pm 0.2 6.8 (6.5 – 7.2)	6.1 \pm 0.7 6.4 (5.1 – 6.8)	9	0.027

Tüm veriler ortalama \pm standart sapma, ortanca (en küçük - en büyük), yüzde olarak verildi.

*Wilcoxon işaretli sıralar testi sonucudur.

idi. Düzeltilmiş program ile tüm hastaların HbA1c sonuçlarında ortalama % 11 oranında düşüklük tespit edildi ($p < 0.001$). Hastaların birine ait standart HbA1c ölçümü ile elde edilen HbA1c kromatogramı şekil 1'de verilmiştir. Aynı hastaya ait düzeltilmiş program elde edilen HbA1c kromatogramı ise şekil 2'de sunulmuştur. Vakaların 22'sinde (% 45) standart HbA1c ölçümü ile HbA1c sonuçları % 6.5'un üzerindeydi. Düzeltilmiş program ile HbA1c sonucu % 6.5'un üzerinde olan hasta sayısı 22'den (% 45) 12'ye (% 20) indi.

60 hastanın 33'ünde (% 55) hemoglobin elektroforezi sonuçlarının patolojik olduğu görüldü. Bu hastaların 22'sinde (% 36.7) HbF, 5'inde (% 8.3) HbA2 ve 6'sında (% 10) HbF ve HbA2 birlikte yüksekliği tespit edildi. Kalan 27 hasta (% 45) normal hemoglobin elektroforezi bulgularına sahipti. Yukarıdaki hastaya ait hemoglobin elektroforezini şekil 3'teki gibidir.

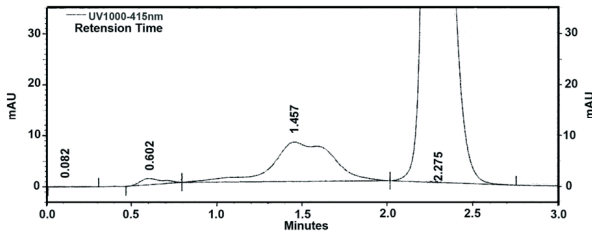
Hemoglobin elektroforezi patolojik olan 33 hastanın standart HbA1c ölçümü ile ortalama HbA1c değerleri % 7.1 ± 2.9 olarak bulundu. Bu değerler düzeltilmiş programla % 5.8 ± 1.8 idi ($p < 0.001$). Hemoglobin elektroforezi normal olan hastaların standart HbA1c ölçümü ile ortalama HbA1c değerleri % 5.7 ± 0.8 iken, düzeltilmiş programla % 5.2 ± 0.8 olarak bulundu ($p < 0.001$). Hemoglobin elektroforezi sonuçlarına göre patolojik ve normal olan gruplarda düzeltilmiş program, ortalama HbA1c değerlerinde, sırasıyla % 14 ve % 8 oranlarında düşüş meydana getirmiştir.

Standart HbA1c ölçümü ile HbA1c değerleri % 6.5'un üzerinde olan 22 hastanın ortalama HbA1c sonuçları % 8.6 ± 2.6 'dan, düzeltilmiş program ile % 6.9 ± 1.6 'ya düştü ($p < 0.001$). Bu hastaların 16'sında patolojik hemoglobin elektroforezi sonuçları varken, 6'sında normal hemoglobin elektroforezi bulguları vardı. 16 hastanın ortalama HbA1c sonuçları % 9.3 ± 2.8 'den, düzeltilmiş program ile % 7.2 ± 1.7 'ye düştü ($p < 0.001$). Diğer 6

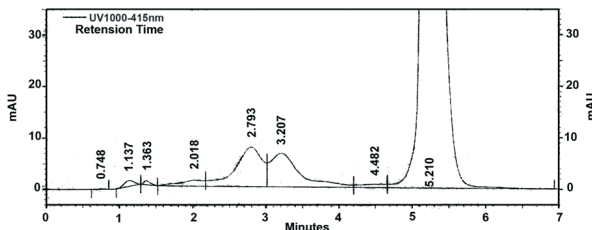
hastanın ortalama HbA1c sonuçları % 6.8 ± 0.2 'den, düzeltilmiş program ile % 6.1 ± 0.7 'ye düştü ($p = 0.027$). Kullandığımız düzeltilmiş program ile patolojik hemoglobin elektroforezi sonuçlarına sahip 16 hastanın 6'sında (% 37) HbA1c değerleri, % 6.5'in altında ölçüldü. Aynı şekilde hemoglobin elektroforezi sonuçları normal bulunan 6 hastanın 4'ünde (% 67) HbA1c değerleri düzeltilmiş programla % 6.5'in altında bulundu.

Tartışma

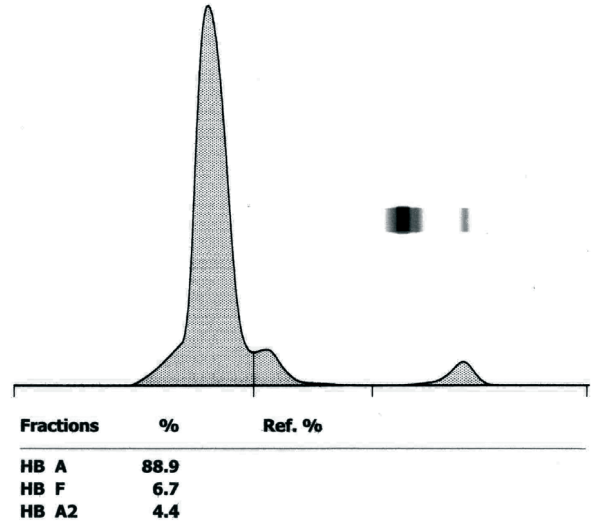
Günümüzde DM hastaları için son derece önemli olan HbA1c ölçümünü interfere eden birçok etkenin varlığı bilinmektedir. Cinsiyet, etnik köken ve mevsimin HbA1c ölçümüne önemli bir etkisi yoktur. Yaş hususunda henüz bir fikir birliği sağlanmamıştır. Fakat bazı araştırmacılar, 30'lu yaştan sonraki her dekatta, HbA1c değerlerinde yaklaşık % 0.1'lik artış meydana geldiğini saptamışlardır [19-21]. Vitamin C ve vitamin E'nin hemoglobin glikasyonunu baskılayarak yanlış düşük sonuçlara neden olduğunu ortaya koyan çalışmalar vardır [22,23]. Tarım ve ark.'ları demir eksikliği anemisinin, HbA1c ölçümünde yanlış yüksek sonuçlara neden olduğunu ileri sürmüşlerdir [24]. Test sonuçları üzerine gıda alımının önemli bir etkisi henüz gösterilmemiş olup; hipertrigliseridemi, hiperbilirubinemi, üremi, kronik alkaloz, kronik salisilat kullanımı gibi durumların yanlış yüksek sonuçlara neden olduğu belirlenmiştir [15,25,26]. HbA1c sonuçları yüksek olan hastalardan elde edilen elektroforez grafiklerine göre vakaların %55'inde patolojik sonuçlar elde edilmiştir. Bunların %36.7'sinde HbF, %8.3'ünde HbA2 ve %10'unda ise HbF ve HbA2 yükseklikleri saptanmıştır. Bu vakaların düzeltilmiş programla elde edilen ortalama HbA1c değerleri anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Weykamp ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada üremiye bağlı oluşan karbamile hemoglobinin iyon-değiştirici bazlı



Şekil 1. Standart HbA1c ölçüm yöntemi ile yapılan ve sonucu %10 olan hastaya ait kromatogram.



Şekil 2. HbA1c sonucu %10 olan hastanın düzeltilmiş programla yapılan HbA1c ölçümüne (%5.5) ait kromatogram.



Şekil 3. HbA1c sonucu %10 olan hastaya ait hemoglobin elektroforezini.

tüm HPLC metotlarında HbA1c ölçümünde yanlış yüksek neticelere sebep olduğu gösterilmiştir [27]. Bizim vakalarımız arasında varyant hemoglobinin olarak karbamile hemoglobin bulunmamaktaydı.

Orak hücre hastalığı, homozigot HbC hastalığı ve β -talasemi'ye sıklıkla HbA2 ve HbF gibi hemoglobininin artışı eşlik eder. Bu durumun yine yanlış yüksek HbA1c sonuçlarına sebep olduğu Bry ve ark. tarafından ileri sürülmüştür [28]. Çalışmamızın sonuçları da yüksek HbA2 ve HbF değerlerine bağlı olarak HbA1c sonuçlarında yanlış yükseklikler olduğunu göstermiştir. Schnedl ve ark. yüksek HbF değerleri olan hastalarda yaptıkları HbA1c ölçümlerinde benzer interferasyonu göstermişlerdir [29]. Bizim sonuçlarımız da varyant hemoglobine sahip olan hastalarda yanlış olarak yüksek HbA1c değerlerini gösterdi ve diğer çalışmalardaki verilerle uyumluydu.

Ayrıca Weycamp ve ark. yüksek HbA1 değerlerinin, HPLC yöntemi ile yapılan HbA1c ölçümlerinde yanlış yüksek sonuçlara neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir [27].

Yaklaşık 3 aylık bir dönemdeki ortalama kan şekeri değerini gösteren HbA1c testi sadece tedavi takibinde kullanılırken; açlık kan şekeri ve oral glukoz tolerans testinden farklı olarak gece açlığı gerektirmemesi, bu testin tarama testi olarak kullanımını uygunlaştırmaktadır. ADA tarafından yayınlanan "2010 Klinik Pratik Tavsiyeleri için Revizyonların Özeti"nde "Diyabet Tanısı" başlıklı bölüme HbA1c seviyesi için % 6.5'lik cutoff değeri eklenmiştir. Aynı şekilde "Diyabet için Artmış Risk Kategorileri" kısmında % 5.7 ile % 6.4 aralığındaki HbA1c seviyelerine gelecekteki diyabet için artmış risk kategorisinde yer verilmiştir [30]. HbA1c kullanım alanındaki bu genişleme bu testin doğru ölçülmesinin önemini de artırmaktadır.

Sonuç

Çalışmamızın sonucunda; vakaların % 55'inde hemoglobin varyantlarına bağlı olarak yanlış olarak daha yüksek HbA1c sonuçları tespit edilmiştir. Uyguladığımız düzeltilmiş program ile bu vakaların ortalama HbA1c değerleri % 14 oranında bir düşüş göstermiştir. HPLC yöntemleri ile HbA1c ölçümlerinde, yanlış yüksek sonuçlara bağlı olarak hastalara gereksiz ve yanlış tedaviler verilebilecektir. Bu gibi durumlarda hastaların morbidite ve mortaliteleri de etkilenecektir. Bu nedenle yanlış ölçümlerden kaynaklanacak morbidite ve mortaliteyi en aza indirmek için, HbA1c ölçümleri sırasında varyant hemoglobine bağlı bu interferans durumunun göz önünde bulundurulması, laboratuvarlar açısından önem arz etmektedir.

Kaynaklar

[1] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) 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.* 329(14):977-986.

[2] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998) 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.* 352(9131):837-853.

[3] American Diabetes Association. (2003) Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 26(Suppl1):S106-S108.

[4] Marshall SM, Barth JH. (2000) Standardization of HbA1c measurements: a consensus statement. *Ann Clin Biochem.* 37(Pt 1):45-46.

[5] Lundberg GD. (1999) How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical world. *Clin Chim Acta.* 280(1-2):3-11.

[6] Plebani M. (1999) The clinical importance of laboratory reasoning. *Clin Chim Acta.* 280(1-2):35-45.

[7] Service FJ, Molnar GD, Taylor WF. (1972) Urine glucose analyses during continuous. *JAMA.* 222(3):294-298.

[8] American Diabetes Association. (1987) Self-monitoring of blood glucose. *Diabetes Care.* 10:95-99.

[9] Miedema K. (2003) Laboratory tests in diagnosis and management of diabetes mellitus. Practical considerations. *Clin Chem Lab Med.* 41(9):1259-1265.

[10] Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). (2002) Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med.* 40(1):78-89.

[11] Bunn HF. (1981) Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. *Am J Med.* 70(2):325-330.

[12] Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. (2002) Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem.* 48(3):436-472.

[13] Roth M. (1983) "Glycated hemoglobin," not "glycosylated" or "glucosylated". *Clin Chem.* 29(11):1991.

[14] Tahara Y, Shima K. (1995) Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care.* 18(4):440-447.

[15] Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. (1986) Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem.* 32(10 Suppl):B64-B70.

[16] Akarsu S, Kurt A, Çakıcı O, Kurt ANÇ, Şengül İ, Şen Y. (2008) Demir eksikliği anemisinin hemoglobin alt tipleri üzerine etkisi: Tedavi öncesi ve sonrası HbA1c, HbA2 ve HbF. *Türk Ped Arş.* 43:9-13.

[17] Thevarajah M, Nadzimah MN, Chew YY. (2009) Interference of hemoglobinA1c (HbA1c) detection using ion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) method by clinically silent hemoglobin variant in University Malaya Medical Centre (UMMC)--a case report. *Clin Biochem.* 42(4-5):430-434.

[18] Lahousen T, Roller RE, Lipp RW, Schnedl WJ. (2002) Silent haemoglobin variants and determination of HbA(1c) with the HPLC Bio-Rad Variant II. *J Clin Pathol.* 55(9):699-703.

[19] Wiener K, Roberts NB. (1999) Age does not influence levels of HbA1c in normal subject. *QJM.* 92(3):169-173.

[20] Kilpatrick ES, Dominiczak MH, Small M. (1996) The effects of ageing on glycation and the interpretation of glycaemic control in Type 2 diabetes. *QJM.* 89(4):307-312.

[21] Nuttall FQ. (1999) Effect of age on the percentage of hemoglobin A1c and the percentage of total glycohemoglobin in non-diabetic persons. *J Lab Clin Med.* 134(5):451-453.

[22] Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. (1992) Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes.* 41(2):167-173.

- [23] Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. (1991) Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care*. 14(1):68-72.
- [24] Tarım O, Küçükerdoğan A, Günay U, Eralp O, Ercan I. (1999) Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int*. 41(4):357-362.
- [25] Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. (1983) Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem*. 29(3):466-469.
- [26] Ceriello A, Giugliano D, Dello Russo P, Sgambato S, D'Onofrio F. (1982) Increased glycosylated haemoglobin A1 in opiate addicts: evidence for a hyperglycaemic effect of morphine. *Diabetologia*. 22(5):379.
- [27] Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. (1993) Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem*. 39(8):1717-1723.
- [28] Bry L, Chen PC, Sacks DB. (2001) Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem*. 47(2):153-163.
- [29] Schnedl WJ, Krause R, Halwachs-Baumann G, Trinker M, Lipp RW, Krejs GJ. (2000) Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care*. 23(3):339-344.
- [30] Summary of Revisions for the 2010 Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care* January 2010 Volume:33 Suppl.1 S3