

## PRESENTAZIONE

*Nel maggio del 1993 è stato costituito un Comitato di Coordinamento tra il gruppo di Studio per le Malattie Dismetaboliche e l'Aterosclerosi (presidente Prof. R. Paoletti) che raggruppa i Clinici ed i Ricercatori più accreditati in Italia per questi problemi, e le tre Società Italiane di Laboratorio.*

*Lo scopo del Comitato era quello di cercare linee omogenee di comportamento per la diagnostica di laboratorio delle dislipidemie.*

*Dopo numerosi incontri, è stato raggiunto un consenso sul profilo lipidico basale da utilizzare per l'accertamento di eventuali dislipidemie e per la valutazione dei fattori plasmatici di rischio, come pure sui valori di confronto da riportare sul referto.*

*Il documento che viene qui proposto è appunto il risultato del consenso raggiunto su questi temi e viene pubblicato congiuntamente sulle riviste delle diverse Società rappresentate all'interno del Comitato.*

*Il Gruppo di Studio "Lipidi e Lipoproteine", che ha attivamente partecipato alla stesura del documento, rimane a disposizione dei Soci SIBIoC per ogni eventuale altro chiarimento.*

*Maria Stella Graziani  
Coordinatore SIBIoC  
Commissione Lipidi e Lipoproteine*

# Linee Guida per la Diagnostica di Laboratorio delle Dislipidemie

Comitato editoriale: R. Motta, M.G. Silvestri, Z. Sangiorgi, M.C. Grippo

*Elaborate dalla Commissione Congiunta AIPAC, SIBIoC, SIMEL, CISMEL, ASFA e Gruppo di Studio delle Malattie Dismetaboliche e della Aterosclerosi costituita da: G. Sprovieri, U. Lippi, M.S. Graziani, A. Catapano, A. Gaddi, E. Manzato.*

Corrispondenza a: Prof. A. Gaddi "Centro per lo studio dell'arteriosclerosi e delle malattie dismetaboliche Giancarlo Descovich". Policlinico S. Orsola Malpighi. Via Massarenti, 9. 40138 Bologna.

## INTRODUZIONE

Il nuovo prontuario terapeutico ammette l'erogazione in classe A di alcuni farmaci ipolipemizzanti solo per i cittadini portatori delle "Ipercolesterolemie Familiari" e delle

"Iperlipemie Familiari" (voci 13 e 14 del Prontuario Terapeutico). Si pone pertanto il problema di quali accertamenti di laboratorio utilizzare ai fini diagnostici.

Per tale motivo le maggiori associazioni nazionali del settore, tra cui la Società Italiana Biochimica Clinica (SIBioC), la Associazione Italiana Patologi Clinici (AIPAC), la Società Italiana Medicina di Laboratorio (SIMEL-CISMEL), il Gruppo di Studio delle Malattie Dismetaboliche e della Aterosclerosi e l'associazione per lo studio dei farmaci antitrombotici (ASFA) hanno formato un Comitato Tecnico di esperti, con il compito di:

indicare gli accertamenti più idonei e con il miglior rapporto potere diagnostico/costo da effettuare nella diagnostica laboratoristica;

indicare quali metodi di laboratorio utilizzare al fine di ottenere risultati più attendibili;

indicare i valori "desiderabili" delle analisi ematochimiche stabilite da riportare sulla modulistica.

All'attendibilità di un risultato di laboratorio concorrono:

a)

fattori dipendenti dal metodo (specificità, accuratezza, sensibilità);

b)

fattori dipendenti dall'affidabilità del laboratorio (capacità dell'operatore, efficienza delle apparecchiature);

c)

la variabilità *preanalitica*, influenzata dallo stato basale del paziente, dalla modalità del prelievo e dalla conservazione del campione.

Tutti questi elementi sono stati considerati dagli esperti nello stilare le valutazioni sotto riportate.

## 1.0 COLESTEROLO TOTALE

**1.1 Valutazione del rischio:** un'ampia serie di dati sperimentali, clinici ed epidemiologici, documenta la stretta correlazione tra elevati livelli di colesterolo nel plasma e la prevalenza, la gravità e la progressione della patologia aterosclerotica (1,2). La determinazione dei livelli plasmatici di colesterolo ha inoltre un significato predittivo nella valutazione del rischio di infarto miocardico e delle vasculopatie cerebrali e periferiche.

**1.2 Variabilità preanalitica:** il colesterolo totale presenta una variabilità intraindividuale compresa in un range tra 6 e 7 % (3). Per una valutazione più corretta si consiglia quindi di eseguire la determinazione in almeno due diverse occasioni e di standardizzare accuratamente le fasi preanalitiche.

Le raccomandazioni del Gruppo di Studio per le Malattie Dismetaboliche e l'Aterosclerosi, nell'ambito della diagnostica delle ipercolesterolemie e delle iperlipemie familiari, prevedono il prelievo dopo che il soggetto ha rigorosamente attuato specifiche misure igienico-dietetiche (dieta a basso contenuto lipidico in particolare grassi saturi e colesterolo) per almeno tre mesi e dopo avere escluso le forme secondarie.

Il paziente deve inoltre sospendere, circa venti giorni prima del prelievo (ovviamente qualora sia possibile) farmaci che possano modificare la determinazione sia interferendo analiticamente sia alterando il metabolismo lipidico (diuretici, beta-bloccanti, estrogenici, anabolizzanti steroidei). La misura del colesterolo inoltre non deve essere eseguita in gravidanza o in caso di patologia flogistica non completamente superata o prima che siano trascorsi tre mesi da un infarto miocardico (4).

Il prelievo deve essere effettuato in posizione seduta poiché l'ortostatismo induce un aumento della concentrazione ematica del colesterolo totale di circa il 10% (5). La stasi venosa deve essere effettuata solo per il tempo strettamente necessario ed il laccio tolto non appena il sangue comincia a defluire (5). Il campione può essere siero o plasma; in quest'ultimo caso l'anticoagulante di elezione è l'EDTA che causa, rispetto agli altri anticoagulanti, un minor spostamento di acqua dagli eritrociti al plasma. Le differenze riscontrate tra siero e plasma sono infatti imputabili a variazioni della pressione osmotica indotte dall'anticoagulante con conseguente fuoriuscita di liquido dalle cellule (6). Le variazioni della concentrazione del colesterolo sono state stimate (per la quantità di EDTA contenuta nelle provette disponibili commercialmente) di poco inferiori al 5%.

**1.3 Metodi di misura:** il metodo comunemente adottato oggi nei laboratori è il metodo enzimatico (CHOD/POD/Trinder) (5). Il National Cholesterol Education Program (NCEP) statunitense raccomanda che i dati dei singoli laboratori non discostino dal metodo di riferimento per più del 3% e che abbiano coefficienti di imprecisione inferiori al 3%. Il laboratorio deve quindi monitorare la qualità analitica del dato sia in termini di precisione che in termini di accuratezza.

**1.4 Valori desiderabili:** il valore "desiderabile" della concentrazione di colesterolo, inteso come quello oltre al quale può essere previsto un intervento terapeutico dietetico o, per valori più elevati, anche farmacologico (valore decisionale), è stato stabilito per l'adulto <200 mg/dL (5.18 mmol/L) e per i soggetti con meno di 20 anni <180 mg/dL (4.66 mmol/L).

## 2.0 TRIGLICERIDI

**2.1 Valutazione del rischio:** i diversi studi tesi a verificare l'esistenza di una associazione tra livelli plasmatici di trigliceridi (TG) e sviluppo di malattia coronarica (CHD), siano essi prospettici o studi caso-controllo, hanno fornito risultati tra di loro in parte discordanti (7). Sebbene i livelli di TG siano associati positivamente con l'incidenza di CHD, non sempre risultano predittivi per i nuovi eventi cardiovascolari qualora si prendano in considerazione altri fattori di rischio maggiori, come l'ipertensione, il fumo, l'ipercolesterolemia, i bassi valori di colesterolo HDL, ecc.

D'altra parte studi su soggetti con cardiopatia ischemica hanno evidenziato livelli di TG più elevati rispetto ai controlli. Nel Framingham Study i TG sembrano costituire un fattore di rischio indipendente di CHD in soggetti con bassi livelli di colesterolo HDL (8, 9).

Resta comunque il ruolo chiave del dosaggio dei TG nella diagnosi delle iperlipemie familiari e nella diagnosi e nel monitoraggio della iperlipoproteinemia familiare combinata.

**2.2 Variabilità preanalitica:** i trigliceridi presentano una variabilità biologica intraindividuale molto elevata, maggiore di quella che è stata riscontrata per gli altri costituenti lipidici del plasma (3). Il ruolo giocato dalle variabili preanalitiche ed il controllo delle loro diverse cause assumono quindi un'importanza fondamentale nella standardizzazione delle procedure di dosaggio dei TG (10). Per il controllo della variabilità preanalitica valgono le stesse considerazioni del colesterolo totale. Raccomandazioni particolari riguardano l'astensione dal fumo e dall'esercizio fisico, nelle ore immediatamente precedenti il prelievo, in quanto questi fattori sono in grado di modificare significativamente e in breve tempo i livelli dei TG. L'assunzione di alcool può aumentare i livelli di TG: per questo motivo, quando si intende verificare la presenza di una ipertrigliceridemia primitiva, l'alcool andrebbe sospeso nei giorni precedenti il prelievo.

L'ora del prelievo riveste una particolare importanza in quanto la concentrazione dei TG varia in maniera considerevole durante il giorno anche indipendentemente dall'assunzione di cibo. Il prelievo dovrebbe pertanto essere effettuato nelle prime ore del mattino e dopo digiuno di 12 ore (11).

Riguardo ai farmaci, quelli che possono modificare significativamente la concentrazione dei trigliceridi sono i diuretici, i beta bloccanti, e gli estrogeni (che provocano un aumento) e l'eparina e gli eparinoidi che potrebbero invece determinarne una diminuzione.

**2.3 Metodi di misura:** i metodi comunemente usati, sono i metodi enzimatici che misurano il glicerolo liberatosi per idrolisi dei trigliceridi. La variabilità analitica dei trigliceridi è senz'altro più elevata di quella del colesterolo totale; comunque considerata l'elevata variabilità biologica dei TG, il contributo della variabilità analitica alla variabilità totale è minimo (12). Lo scostamento dal metodo di riferimento secondo il NCEP non dovrebbe superare il 5%.

**2.4 Valori desiderabili:** i valori "desiderabili" ottenuti con il metodo enzimatico, da riportare sulla modulistica, sono stati stabiliti inferiori a 200 mg/dL (2.25 mmol/L). Valori superiori a 250 mg/dL (2.86 mmol/L) possono essere espressivi di iperlipemie familiari.

### 3.0. COLESTEROLO HDL

**3.1 Valutazione del rischio:** recentemente diversi studi epidemiologici hanno messo in evidenza l'importanza del colesterolo-HDL quale fattore di rischio negativo (fattore protettivo) per CHD (13).

Nella maggior parte di questi studi epidemiologici è stato dimostrato che bassi valori plasmatici di colesterolo HDL rappresentano un fattore di rischio indipendente per CHD e consentono di aumentare la capacità predittiva degli altri fattori di rischio (14). In alcuni studi, tra cui l'Helsinki Heart Study, è stato evidenziato un incremento del colesterolo HDL in parallelo con un decremento del colesterolo LDL e/o trigliceridi e una correlazione inversa tra variazioni di colesterolo HDL e incidenza di CHD nei gruppi trattati (15).

**3.2 Variabilità preanalitica:** valgono le stesse considerazioni espresse per il colesterolo totale (paragrafo 1.2)

**3.3 Metodi di misura:** i metodi comunemente più usati prevedono la precipitazione delle lipoproteine contenenti apo B con destran-solfato, con acido fosfotungstico o con PEG 6000 e la determinazione enzimatica del colesterolo nel sovrantante.

E' opportuno osservare che la variabilità analitica per il colesterolo HDL non è soddisfacente e che le diverse fasi analitiche dovrebbero essere accuratamente standardizzate, il che non risulta sempre semplice quando le serie analitiche sono numerose (16). Attualmente il NCEP raccomanda uno scostamento non superiore al 6%.

**3.4 Valori desiderabili:** il valore decisionale è 35 mg/dL (0.9 mmol/L) per i maschi e 40 mg/dL (1.03 mmol/L) per le femmine.

### 4.0 COLESTEROLO LDL

**4.1 Valutazione del rischio:** numerosi studi hanno dimostrato che le lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins-LDL) occupano un ruolo fondamentale nel determinismo e nello sviluppo dell'ateroma; se presenti nel sangue in quantità elevata sono in grado di dare avvio alla lesione ateromastica e di condizionarne la progressione (17) (cfr paragrafo 1.1).

**4.2 Variabilità preanalitica:** valgono le stesse considerazioni espresse per il colesterolo totale e HDL (paragrafi 1.2 e 3.2).

**4.3 Metodi di misura:** la determinazione del colesterolo LDL viene comunemente eseguita determinando la quantità del colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità separate preventivamente con procedure di precipitazione con polianioni, o indirettamente, per calcolo, utilizzando la formula di Friedewald:  $LDL-C = CT - (TG/5 + HDL-C)$  (quando i valori vengono espressi in mg/dL).

Entrambi questi metodi forniscono valori di colesterolo LDL in accordo con valori ottenuti con il metodo di riferimento quando si esaminano sieri normo o solo moderatamente ipertrigliceridemicici, mentre danno risultati discordi e più elevati se la determinazione viene eseguita in sieri con livelli di trigliceridi molto alti; tale limitazione è dovuta alla possibile presenza di chilomicroni e remnants delle VLDL nel siero dei soggetti ipertrigliceridemicici (16).

In assenza di una migliore performance analitica, è consigliabile utilizzare la formula di Friedewald, riservando la misura diretta (con metodo immunologico o con ultracentrifuga) a casi selezionati da inviare a Centri specializzati.

**4.4 Valori desiderabili:** i valori "desiderabili" da riportare sulla modulistica sono stati stabiliti <130 mg/dL (3.37 mmol/L); valori superiori a 175 mg/dL (4.53 mmol/L) nell'adulto sono potenzialmente espressivi di malattia genetica del metabolismo lipidico.

### 5.0 APOPROTEINA AI e APOPROTEINA B.

**5.1 Valutazione del rischio:** l'apo AI è una proteina a struttura elicoidale, costituita da una singola catena di 245 amminoacidi, presente in massima parte nelle HDL ove svolge funzioni sia strutturali sia metaboliche.

L'apo B, la proteina strutturale dei chilomicroni, delle VLDL e delle LDL, riveste un ruolo importante nella struttura e nel catabolismo delle LDL ed e' correlata all'aterogenesi (18).

Alcuni studi epidemiologici sembrano confermare una possibile utilità diagnostica del dosaggio delle apo AI e delle apo B (19).

La valutazione di tali proteine può comunque trovare un impiego razionale in una strategia di prevenzione individuale ma non di prevenzione a livello di popolazione per ragioni dei costi elevati che comporta; l'impiego di questi dosaggi potrebbe essere giustificato per l'individuazione di soggetti ad alto rischio con una storia familiare di infarto miocardico.

**5.2 Metodi di dosaggio:** la mancanza di una standardizzazione adeguata ha impedito l'utilizzazione clinica dei dosaggi delle apoproteine AI e B. A causa di questi problemi infatti i valori ottenuti erano fortemente metodo-dipendenti. L'Expert Panel on Apolipoproteins della IFCC (Federazione Internazionale delle Società di Chimica Clinica) ha riconosciuto nella calibrazione di questi dosaggi la fonte primaria di variabilità. Una energica azione che ha coinvolto le organizzazioni commerciali del settore, ha consentito di ottenere uno standard comune in grado di armonizzare (entro certi limiti) i risultati ottenuti con metodi e/o kits commerciali diversi.

Si raccomanda pertanto ai singoli laboratori di utilizzare kits commerciali che abbiano i valori del calibratore assegnati sulla base della preparazione internazionale riconosciuta.

Utilizzando tale calibrazione, i valori di attenzione per le due apoproteine sono stati *provvisoriamente ed orientativamente* stabiliti come segue:

>130 mg/dL per Apo B

<110 mg/dL per Apo AI

## 6.0 LIPOPROTEINA (a) o Lp(a).

**6.1 Valutazione del rischio:** nello scorso decennio, numerosi studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato che elevate concentrazioni plasmatiche di Lp(a) rappresentano un possibile "fattore di rischio" (da alcuni Autori proposto addirittura come fattore di rischio indipendente) per lo sviluppo della patologia aterosclerotica (20).

La lipoproteina(a) risulta costituita da una molecola lipidica LDL-simile (ricca in colesterolo esterificato) in cui la apo B100 è legata, con uno o più ponti disolfuro alla apo (a).

Mentre l'apo B100 ha un peso molecolare costante (513 kDa), la apo (a) dimostra una notevole variabilità interindividuale dovuta alla presenza nella popolazione di numerose isoforme con peso molecolare variabile da 280 a 800 KDa che differiscono tra loro per struttura e differente grado di glicosilazione (21).

La variabilità del peso molecolare è determinata geneticamente; isoforme ad alto peso molecolare si associano a bassi livelli plasmatici di Lp(a) e viceversa. Circa il 90% della variabilità dei livelli plasmatici si può spiegare con le differenze genetiche del peso molecolare.

Oltre che da una elevata eterogeneità, l'apo(a) è caratterizzata da una struttura ad alto grado di omologia a quella del plasminogeno anche se comunque non svolge le stesse funzioni; si ipotizza pertanto che svolga, attraverso un meccanismo di antagonismo competitivo, un'inibizione della fibrinolisi e una promozione della trombosi (22).

Non sembra giustificato per ora ripetere a breve distanza di tempo questo dosaggio, dato che numerosi studi hanno dimostrato una bassa variabilità e che gli abituali provvedimenti terapeutici (dietetici o farmacologici) sono quasi del tutto inefficaci nel ridurre i livelli plasmatici di Lp(a).

**6.2 Metodi di dosaggio:** i metodi di dosaggio della Lp(a) attualmente disponibili sono tutti di tipo immunometrico e si basano sul legame dell'apo(a) con anticorpi monoclonali o policlonali di diversa origine. Il sistema rivelatore può essere di tipo fisico (agglutinazione al lattice, formazione di una banda di precipitazione, torbidità dell'immunocomplesso), oppure basato sulla radioattività o sulla attività enzimatica legata all'anticorpo.

Attualmente la determinazione della Lp(a) presenta ancora problemi irrisolti legati sia alla omologia strutturale della proteina con il plasminogeno (cross-reattività degli antisieri), sia alla sua elevata eterogeneità strutturale (preparazione degli standard). La mancanza di punti di riferimento precisi rende il problema più complesso soprattutto alla luce del fatto

che la concordanza fra metodi diversi si allontana in quegli ambiti di concentrazione (20-30 mg/dL) che sono da più parti considerati significativi per il rischio cardiovascolare.

In relazione ai problemi analitici appena esposti e alla incertezza sul significato fisiopatologico della Lp(a) viene suggerito di non impiegare la determinazione della proteina nello screening della popolazione e di valutare con estrema cautela i valori ottenuti.

## 7.0 FIBRINOGENO

**7.1** Valutazione del rischio: recenti studi sembrano indicare il fibrinogeno quale fattore di rischio indipendente per CHD (23, 24, 25).

Diversi studi prospettici (Framingham, Goteborg, Leigh, Munster e Northwick Park Heart Study) hanno inoltre dimostrato che un aumento del fibrinogeno ha un significato predittivo per la malattia coronarica ischemica (26). Alti livelli di fibrinogeno sono correlati frequentemente con la prevalenza di infarto miocardico (27).

**7.2** Metodi di dosaggio: numerosi sono i metodi in uso ed in particolare tra i metodi cinetici, il più affidabile sembra essere il metodo di Clauss basato sulla coagulazione del fibrinogeno con trombina.

Il metodo Clauss è ritenuto il più accurato a condizione che venga utilizzato come calibratore uno standard affidabile.

Al cospetto di valori alti di fibrinogeno, e in assenza di standard idonei, può essere suggerita la prediluizione dei campioni, anche se detta procedura può indurre una ulteriore fonte di errore analitico.

**7.3.** Valori di fibrinogeno ottenuti con il metodo Clauss, superiori a 300 mg/dL devono essere guardati con prudenza clinica.

## CONCLUSIONI

Il Comitato, in rappresentanza di più Società Scientifiche nazionali, sulla base di quanto riportato in letteratura, e considerando in modo realistico: (a) i costi, (b) l'operatività di laboratori non specializzati, e, (c) le necessità della Medicina di Base, è giunto a un consenso unitario sulla possibilità di proporre quale profilo lipidico "ottimale" il dosaggio di: **colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo HDL, colesterolo LDL** (calcolato con la formula di Friedewald).

Dette analisi andrebbero eseguite SEMPRE almeno la prima volta che il paziente viene esaminato. Dette analisi consentono: (a) la stima del rischio cardiovascolare (che comunque deve tenere conto anche dei fattori di rischio non lipidici) e, (b) un primo inquadramento clinico genetico del tipo di malattia metabolica presente. Il dosaggio del fibrinogeno, ove consentito dal rapporto beneficio/costo stabilito dai singoli Enti, potrebbe essere inserito nella valutazione del profilo di rischio di base.

In casi particolari può essere opportuno effettuare anche il dosaggio di apo A1, apo B e Lp(a) **considerandole comunque sempre indagini di secondo livello.**

Il dosaggio di tutti i parametri sopra elencati richiede il prelievo di un campione di sangue che: a) deve rispecchiare il reale stato del metabolismo lipoproteico del paziente; b) deve essere confrontabile con prelievi eseguiti in tempi diversi.

Per queste ragioni il comitato concorda sull'opportunità di standardizzare accuratamente sia i metodi di analisi sia tutte le possibili fonti di variabilità preanalitica. Più precisamente sarebbe opportuno:

eseguire il prelievo al mattino dopo un digiuno di 12 ore e dopo che per circa tre mesi il paziente ha attuato rigorosamente specifiche misure igienico-dietetiche (dieta a basso tenore lipidico).

sospendere almeno venti giorni prima del prelievo, l'assunzione di farmaci che possono interferire con il metabolismo lipidico;

effettuare il prelievo preferibilmente a livello ambulatoriale in quanto i livelli dei lipidi plasmatici tendono a modificarsi con la dieta ospedaliera.

Gli esperti sono anche d'accordo sull'opportunità di effettuare il dosaggio in due diverse occasioni con un intervallo di tempo di circa due mesi.

Il Comitato di esperti rimane a disposizione, attraverso le Società di afferenza, per qualsiasi ulteriore chiarimento. In particolare per la verifica dell'accuratezza dei risultati è possibile rivolgersi ad uno dei laboratori certificati dal NCEP (Ospedale S. Raffaele di Milano) e, per consulenza clinico-lipidologica, ai Centri afferenti al Gruppo di Studio delle Malattie Dismetaboliche e dell'Aterosclerosi.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
- 2) Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984; 251: 365-74.
- 3) Smith SJ, Cooper GR, Myers GL, Sampson EJ. Biological variability in concentrations of serum lipids: sources of variation among results from published studies and composite predicted values. *Clin Chem* 1993; 39: 1012-22.
- 4) Rosenson RS. Myocardial injury: The acute phase response and lipoprotein metabolism. *JACC* 1993; 22:933-40.
- 5) Graziani MS, Franzini C. Colesterolo. *Giorn It Chim Clin.* 1990; 15: 87-93.
- 6) Bachorick PS, Albers JJ, Ellefson RD, Kane JP, Wood PD, Cooper GR. Collection of blood samples for lipoprotein analysis. *Clin Chem* 1982; 28: 1375-8.
- 7) Wilson PF, Andersen KM, Castelli WP. The impact of triglycerides on coronary heart disease: The Framingham Study. *Atherosclerosis Rev* 1990; 22: 59-63.
- 8) Stalmer J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823-8.
- 9) Sheperd J, Packard LH. Metabolic heterogeneity in very low density lipoproteins. *Am Heart J* 1987; 113: 503-8.
- 10) Cooper GR, Mayers GL, Smith SJ. Standardization of lipid, lipoprotein, and apolipoprotein measurements. *Clin Chem* 1988; 34: B95-B105.
- 11) Wasenius A, Stugaard M, Otterstad JE. Diurnal and monthly intra individual variability of the concentration of lipids, lipoproteins and apoproteins. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 635-42.
- 12) Graziani MS, Catapano A, Frascatore S Trigliceridi. *Giorn It Chim Clin* 1993; 15: 1448-55.
- 13) Miller M, Kwiterovich PO. Isolated low HDL-cholesterol as important risk factor for coronary heart disease. *Eur Heart J* 1990; 11 (Suppl H): 9-14.
- 14) Gordon DJ. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79: 8-15.
- 15) Frick MH, Haapa K. Helsinki Heart Study: Primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. *N Engl J Med* 1987; 317: 1237-45.
- 16) Graziani MS. Il colesterolo delle frazioni lipoproteiche. *Giorn It Chim Clin* 1991; 16: 205-15.
- 17) Steinberg D. Lipoprotein and atherosclerosis. A look back and a look ahead. *Atherosclerosis* 1983; 3: 283.
- 18) Fredman DS, Srinivasan SR, Shear CL, Franklin SA, Webber LS, Bereson G. The relation of apoproteins AI and B in children to parental myocardial infarction. *N Engl J Med* 1986; 315: 721-7.
- 19) Guidali PL, Canziani R, Ghirinelli S, Filippini G, Crovetto G, De Filippo C, et al. Valutazione dei livelli di apolipoproteine plasmatiche in pazienti affetti da infarto miocardico acuto. *Trombosi e Aterosclerosi* 1992; 2: 107-11.
- 20) Franceschini G, Michelagnoli S. Lipoproteina (a): un ponte tra arteriosclerosi e trombosi. *Giornale della arteriosclerosi* 1990; 15: 3-16.
- 21) Scanu AM. Update on lipoproteina (a). *Curr Opin Lipidol* 1991; 2: 253-8.
- 22) Seed M, Hoppichler F, Reaveley D, McCarthy S, Thompson GR, Boerwinkle E, et al.: Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1990; 1494-9.
- 23) Stone MC, Thorpe JM. Plasma fibrinogen-a major coronary risk factor. *J R Coll Gen Pract* 1985; 35:565-9.
- 24) Handa K, Kono S, Saku K, Sasaki J, Kawano T, Sasaki Y, et al.: Plasma fibrinogen levels as an independent indicator of severity of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989;

- 77: 209-13.
- 25) Wilhelms L, Svardsudd K, Korsan K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as risk for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med.*1984; 311:501-5.
  - 26) Rodeghiero F, Castaman G. Nuovi fattori di rischio per la trombosi arteriosa. *Trombosi e Aterosclerosi* 1990; 3:115-9.
  - 27) Di Minno G, Mancino M. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. *Arteriosclerosis* 1990; 1:1-7.