

# LDL-Colesterolo

**Determinazione**

**indiretta o...**



**...determinazione diretta?**

**Lavoro di Diploma**  
Scuola Superiore Medico Tecnica  
Redatto da: Monica Capoferri  
2004

# Indice:

## ABSTRACT

## INTRODUZIONE

Scoperta delle lipoproteine Pag. 4

### Le lipoproteine

Figura 1: Classificazione e composizione delle classi lipoproteiche Pag. 5

Tabella 1: Classi di apoproteine Pag. 6

### LDL

Figura 2: Struttura LDL Pag. 7

Figura 3: Metabolismo delle LDL: endocitosi tramite recettori

### Patologie

Tabella 2: Classificazione secondo Fredrickson Pag. 8

### Evoluzione dei metodi di determinazione

Perché introdurre il nuovo metodo di determinazione diretta Pag. 9

## MATERIALE E METODI

Materiale Pag. 10

Metodi Pag. 11

Procedimento Pag. 11-12

## RISULTATI

Tabella 3: Misure a “fresco in semplice” Pag. 13

Tabella 4: Misure a “fresco in doppio” Pag. 14

Tabella 5: Misure “fresco-congelato” Pag. 15

### 1. Parametri base

Tabella 6: Riassunto delle caratteristiche dei campioni utilizzati nel presente studio

Grafico 1: Colesterolo (mmol/L) Pag. 16

Grafico 2: Trigliceridi (mmol/L)

Grafico 3: HDL (mmol/L)

Grafico 4: LDL-C (mmol/L) Pag. 17

### 2. Relazione tra il colesterolo calcolato e il colesterolo misurato

Grafico 5: LDL Friedewald (mmol/L) vs LDL-C plus (mmol/L) – Deming Pag. 18

Grafico 6: LDL Friedewald (mmol/L) vs LDL-C plus (mmol/L) – Passing & Bablok

### 3. Ripetibilità delle misure “dirette”

Grafico 7: LDL-C plus. Analisi della ripetibilità del metodo Pag. 19

Tabella 7: LDL-C plus (mmol/L): Misura 1, Misura 2 Pag. 20

Grafico 8: Bias plot; LDL-C (mmol/L): Misura 1 vs Misura 2 Pag. 20

4. Effetto della congelazione dei campioni a -30 °C	
Grafico 9: Bias plot; LDL-C (mmol/L): Fresco vs Congelato	
5. Commento al grafico delle differenze	
Grafico 10: Delta LDL-C – LDL Fried. (differenza assoluta)	
Tabella 8: Situazione trovata sperimentalmente	Pag. 21
Grafico 11: LDL-Colesterolo calcolato(Friedewald) vs. misurato (Roche)	Pag. 22
	Pag. 23
6. Valutazione dell'errore	
	Pag. 24
DISCUSSIONE	
	Pag. 25-26
ALLEGATI	
Allegato 1: I lipidi	
Allegato 2: Il colesterolo	Pag. 2
Allegato 3: Lipoproteine	Pag. 4
Allegato 4: I trigliceridi	Pag. 6
Allegato 5: I chilomicroni	
Allegato 6: VLDL	
Allegato 7: HDL	Pag. 7
Allegato 8: Le lipoproteinemie: iperproteinemie, aterosclerosi, ipobetalipoproteinemia	Pag. 8
Allegato 9: Metodica LDL: <i>LDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation (Colesterolo LDL, senza pretrattamento), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.</i>	Pag. 9-11
	Pag. 11
Allegato 10: Programmazione del metodo LDL-C plus 2 <sup>nd</sup> generation su Hitachi 912	
Allegato 11: Grafici complementari ai grafici presentati nel lavoro	Pag. 12
Grafico 1:	
Grafico 2:	Pag. 15
Grafico 3:	Pag. 16
Grafico 4:	Pag. 17
Grafico 5:	Pag. 18
Grafico 6	Pag. 19
Grafico 8:	Pag. 20
Grafico 9:	Pag. 21
Grafico 10	Pag. 22
	Pag. 23
BIBLIOGRAFIA	
ABBREVIAZIONI	
Ringraziamenti	

# LDL – colesterolo

## determinazione indiretta o... determinazione diretta?

1 giugno 2004

**Monica Capoferri**

Ospedale Civico Lugano

Dr. Marco Balerna, Marcello Niosi

### ABSTRACT

**Background:** Nei laboratori dell’Ente Ospedaliero del Canton Ticino è stato deciso di introdurre il nuovo metodo di determinazione diretta del colesterolo LDL a scapito della formula di Friedewald. Sono state effettuate misurazioni su 69 campioni con lo scopo di valutare l’attendibilità del metodo diretto proposto dalla Roche.

**Metodi:** I campioni sono stati analizzati con i due metodi, *LDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation* (su Hitachi) e formula di Friedewald, nel laboratorio dell’Ospedale Civico di Lugano.

**Risultati:** La retta di regressione secondo Deming indica una buona relazione tra i due metodi pur evidenziando un “bias proporzionale”.

La determinazione “indiretta” del LDL-C (formula di Friedewald) ottiene generalmente dei valori inferiori rispetto al metodo diretto (Roche).

**Conclusioni:** Il metodo diretto della Roche è attendibile e quindi introducibile nella routine dei laboratori dell’Ente Ospedaliero del Cantone Ticino.

=====

### INTRODUZIONE

#### Scoperta delle lipoproteine

La prima traccia storica dell’esistenza di un sistema di trasporto dei lipidi nel sangue animale è stata lasciata da Boyle nel 1665 mentre nel 1924 Gage e Fish scoprirono i chilomicroni nel sangue umano.<sup>[Allegato 1]</sup>

Il colesterolo nel sangue umano fu invece scoperto nel 1833 da Boudet.<sup>[Allegato 2]</sup>

L’HDL fu scoperto nel 1929 e l’LDL nel 1950. Da allora molti laboratori hanno identificato altre lipoproteine, misurato la loro concentrazione nel plasma e studiato il loro turnover metabolico.

Sulla base di tali studi venne individuato il trasporto lipidico di trigliceridi e acidi grassi liberi; comunque, solo nel 1974, quando Brown e Golstein scoprirono il recettore per l’LDL, si capì che il trasporto dei grassi dipende da una serie di eventi mediati da recettori.

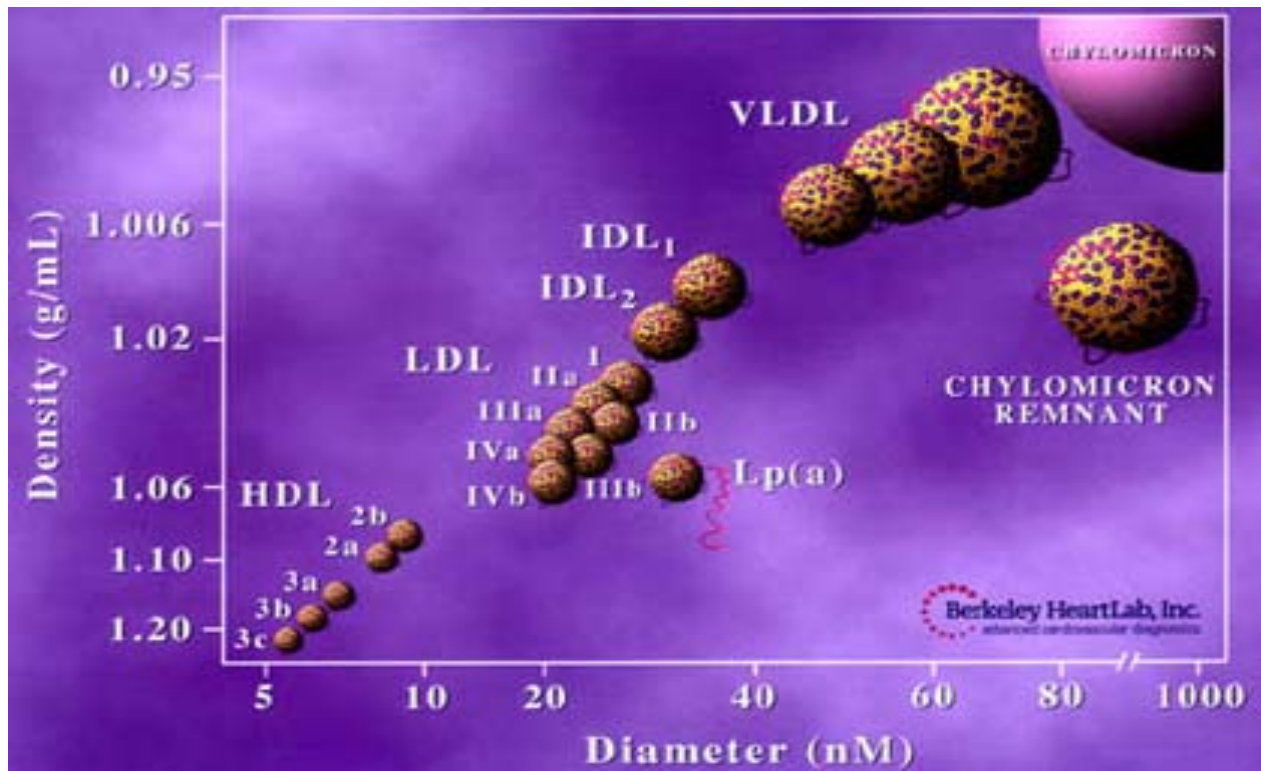
Sono poi state scoperte una serie di iperlipidemie causate da cambiamenti genetici delle lipoproteine, dei loro recettori e degli enzimi che intervengono nella loro sintesi.<sup>2</sup>

## Le lipoproteine

Sono composti lipido-proteici, eterogenei per dimensioni e composizione ma simili per struttura. Esse assicurano il trasporto nel sangue di lipidi insolubili, come il colesterolo e i trigliceridi. Tutte le lipoproteine hanno una parte esterna la cui idrofilicità è dovuta al colesterolo libero, fosfolipidi e apolipoproteine nonché un nucleo idrofobo per la presenza di trigliceridi ed esteri di colesterolo.

Le lipoproteine vengono distinte in classi in base alla densità, che è determinata dalla quantità di trigliceridi (meno dense) e di apoproteine (più dense): chilomicroni, VLDL (very low-density lipoprotein), IDL (intermediate-density lipoprotein), LDL (low-density lipoprotein) e HDL (high-density lipoprotein) [Fig.1].

**Figura 1: Classificazione e composizione delle classi lipoproteiche**



[http://images.google.ch/e.ch/images?hl=it&lr=&ie=UTF\\_8&oe=UTF-8&q=lipidplanets](http://images.google.ch/e.ch/images?hl=it&lr=&ie=UTF_8&oe=UTF-8&q=lipidplanets)

Ogni classe ha un ruolo ben definito nel nostro organismo ma nell'insieme contribuiscono a:

- Trasportare i lipidi esogeni dall'intestino al fegato (chilomicroni)
- Distribuire i lipidi endogeni dal fegato a tutti gli organi attraverso il sistema vascolare (VLDL-IDL-LDL)
- riportare dalle cellule periferiche al fegato i lipidi non più necessari per una redistribuzione o l'eliminazione attraverso le vie biliari (HDL).<sup>3</sup>

[Allegato 3; 4; 5; 6; 7]

I chilomicroni vengono sintetizzati nell'intestino e trasportati attraverso il dotto toracico nella circolazione.

Il fegato sintetizza le VLDL che trasportano i TG e il colesterolo sintetizzati dal fegato. Le VLDL vengono catabolizzate in LDL che provvedono al fabbisogno cellulare di colesterolo.

Le HDL vengono sintetizzate nel fegato e nell'intestino e partecipano al trasferimento inverso del colesterolo, ossia al trasferimento di colesterolo dai tessuti al fegato.<sup>4</sup>

La parte proteica delle lipoproteine sono apoproteine e variano a dipendenza della classe di lipoproteine.

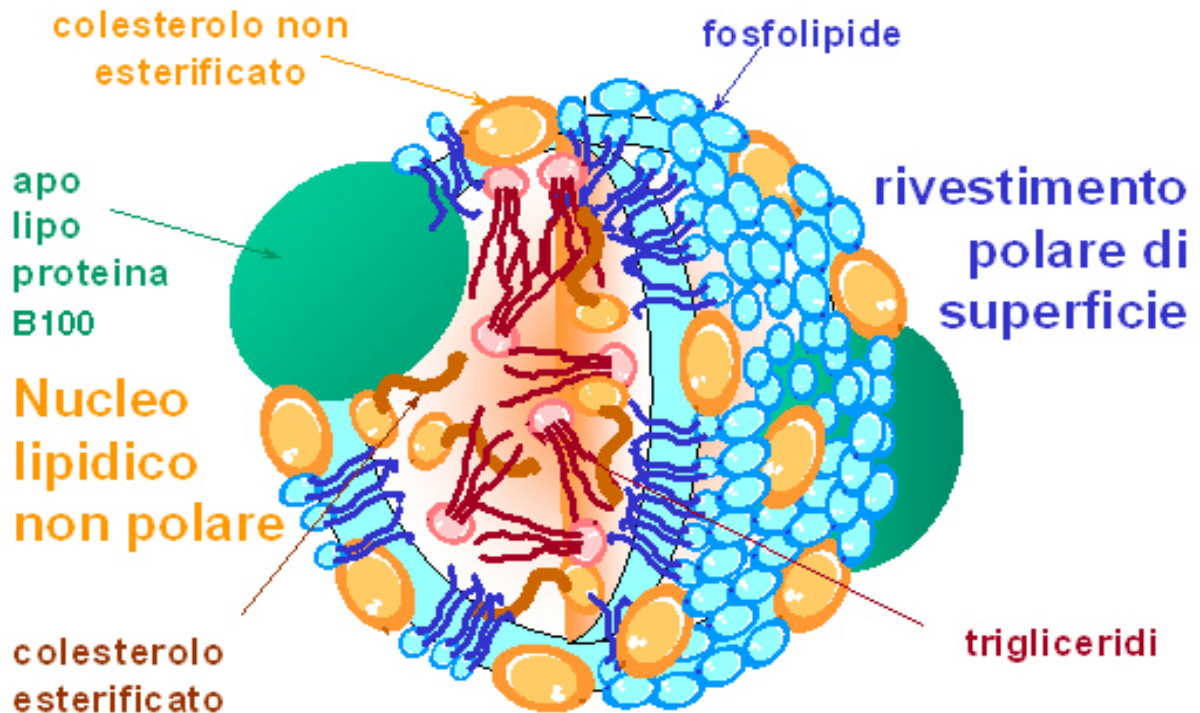
**Tabella 1: Classi di apoproteine**<sup>5</sup>

<b>Apoproteina</b>	<b>Funzione</b>
Apo-B48	Sintesi intestinale; proteina strutturale dei chilomicroni
Apo-B100	Prevalente sintesi epatica; proteina strutturale delle VLDL, IDL, LDL e di legame con i recettori delle LDL.
Apo-E	Sintesi epatica, proteina di legame per i recettori LDL; si trova nei chilomicroni, nelle VLDL e HDL
Apo-A-I	Sintesi intestinale (chilomicroni) ed epatica; proteina strutturale delle HDL; attiva LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase)
Apo-A-II	Sintesi intestinale (chilomicroni) ed epatica; presente in alcune HDL
Apo-A-IV	Sintesi intestinale (chilomicroni) ed epatica; facilita il trasferimento di altre apoproteine tra HDL e chilomicroni
Apo-C-I	Sintesi epatica; presente in tutte le lipoproteine tranne le LDL, inibisce la captazione di chilomicroni e VLDL.
Apo-C-II	Sintesi epatica; presente in tutte le lipoproteine tranne le LDL, attiva la lipasi lipoproteica
Apo-C-III	Sintesi epatica; presente in tutte le lipoproteine tranne le LDL, inibisce la lipasi lipoproteica
Apo(a)	Sintesi epatica, presente su una sub-popolazione di LDL legata mediante un ponte di solfuro all'Apo-B100. Struttura simile al plasminogeno. Si pensa inibisca la fibrinolisi, è pertanto un fattore di rischio cardiovascolare.

## LDL

Sono lipoproteine a bassa densità, costituite da una superficie idrofila composta di fosfolipidi e colesterolo libero e un cuore idrofobo composto da trigliceridi ed esteri di colesterolo. La parte proteica è costituita dall'apoproteina B100.<sup>[Fig.2]</sup>

**Figura 2: Struttura LDL**



Il loro ruolo è quello di cedere alle cellule il colesterolo necessario per la sintesi di membrane cellulari e di ormoni steroidei.

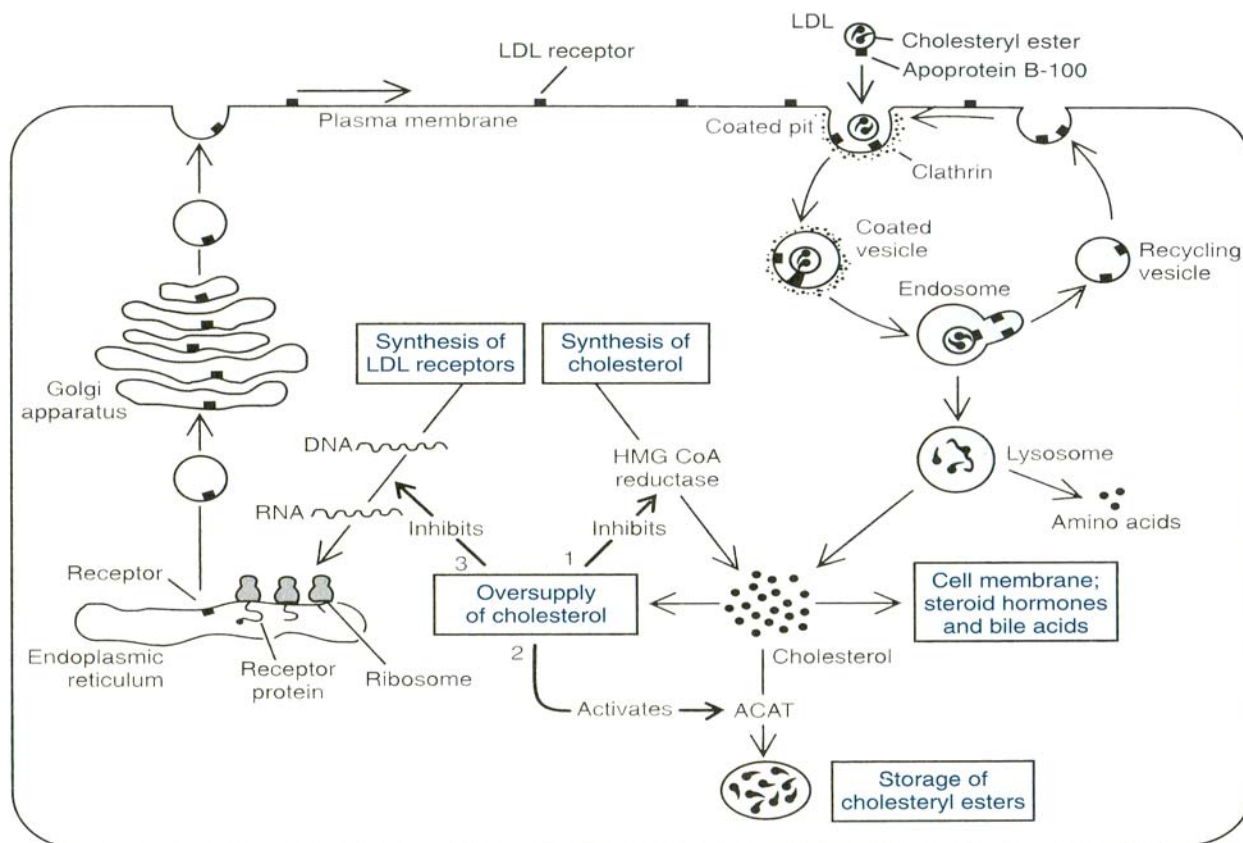
Il catabolismo delle LDL avviene nel fegato e nei tessuti periferici tramite recettori specifici presenti sulle membrane cellulari che riconoscono e legano l'apo-B100 delle LDL.

Quando l'LDL si lega al recettore, viene internalizzata tramite endocitosi; l'ambiente acido dell'endosoma provoca la dissociazione dell'LDL dal recettore che torna ad esprimersi sulla superficie della membrana, mentre l'LDL migra in un lisosoma dove l'apo-B100 viene degradata in peptidi e aminoacidi. Gli esteri di colesterolo vengono idrolizzati in colesterolo libero usato per i bisogni cellulari.

Il livello di colesterolo cellulare è autoregolato:

l'eccesso di colesterolo libero porta ad una diminuzione della sintesi di colesterolo tramite l'inibizione del HMG-CoA reduttasi (3-Idrossi-3-metilglutaril-CoA), l'aumento delle riserve di esteri di colesterolo grazie all'attivazione dell'ACAT (acil-CoA colesterolo aciltransferasi) e l'inibizione della sintesi di nuovi recettori con la soppressione della trascrizione.<sup>6</sup> <sup>[Fig.3]</sup>

### Figura 3: Metabolismo delle LDL: endocitosi tramite recettori



Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Fifth Edition, Edited by C. A. Burtis & E. R. Ashwood

### Patologie

I valori di LDL elevati portano ad un grave rischio di malattia cardiaca aterosclerotica poiché le LDL in eccesso si depositano sulle pareti delle arterie formando delle placche ateromatose. Le iperlipoproteinemie sono state classificate, in base ad una fenotipizzazione, in 6 classi che permettono di caratterizzare il tipo di lipoproteina in eccesso (classificazione secondo Fredrickson).<sup>5</sup>

Tabella 2: Classificazione secondo Fredrickson <sup>5</sup>

Fenotipo	Lipidi	Lipoproteine
I	Trigliceridi	Chilomicroni
IIa	Colesterolo	LDL
IIb	Colesterolo e trigliceridi (rapp.>1)	VLDL e LDL
III	Colesterolo e trigliceridi (rapp. 0,3-1)	Chilomicroni e IDL
IV	Colesterolo e trigliceridi (rapp.0,2-1)	VLDL
V	Trigliceridi	Chilomicroni e VLDL

Un aumento delle LDL può anche essere dovuto a medicinali come l'aspirina, contraccettivi orali, corticosteroidi e sulfamidici.

Valori diminuiti di LDL-C possono essere causati da malassorbimento o malnutrizione.<sup>6</sup>  
 [Approfondimento sulle patologie in allegato 8]



## **Evoluzione dei metodi di determinazione**

Il primo metodo di determinazione delle lipoproteine fu l'ultracentrifugazione, basata sulla loro differenza di densità.

L'ultracentrifugazione è un metodo molto lungo e complesso e ci sono anche diversi fattori d'interferenza. Le frazioni ottenute non contengono inoltre un solo tipo di lipoproteina ma sono spesso eterogenee.

Seguirono l'elettroforesi (HDL: alfa-lipoproteine, VLDL: prebeta-lipoproteine; LDL: beta-lipoproteine), e l'attuale formula di Friedewald (1972) per calcolare l'LDL-C.

Il principio della formula si basa sul fatto che le VLDL portano la maggior parte dei trigliceridi circolanti, per cui il colesterolo VLDL può essere stimato dalla misurazione dei trigliceridi totali (TG/5 per mg/L o TG/2,2 per mmol/L).

Questo metodo però ha dei limiti: il paziente dovrebbe essere a digiuno, i TG non devono essere inferiori a 4,5 mmol/L e non devono essere maggiori della quantità di colesterolo.

Oggi ci sono i nuovi metodi di determinazione diretta del LDL-C, quelli di prima generazione (con precipitazione chimica) e quelli di seconda generazione (test enzimatici in fase omogenea).<sup>7</sup>

### **Perché introdurre il nuovo metodo di determinazione diretta?**

I Laboratori dell'Ente Ospedaliero Cantonale vorrebbero introdurre il nuovo metodo di determinazione diretta del LDL-C poiché ritenuto più valido e di applicazione più generale della formula di Friedewald. È infatti diventato molto importante avere una determinazione precisa e non solo approssimativa del livello di LDL per la diagnosi di patologie aterosclerotiche. Soprattutto in vista dei nuovi valori critici recentemente introdotti a livello internazionale.

Il dosaggio diretto del LDL-C supera l'utilità clinica dell'applicazione dell'equazione di Friedewald in quanto quest'ultima si basa su una determinazione del colesterolo totale, dei trigliceridi e del HDL-C.

Si parte dal presupposto che esista un rapporto fisso tra il colesterolo VLDL e i TG nei campioni di sangue prelevati a digiuno. Anche in presenza di piccole quantità di chilomicroni o lipoproteine patologiche, da questa formula risultano valori di colesterolo LDL falsamente bassi. Di conseguenza, il paziente dev'essere a digiuno, i TG < 4,5 mmol/L e maggiori al valore di colesterolo, mentre il metodo di determinazione diretta non possiede tali limiti.

Si vuole perciò, con questo lavoro, effettuare una valutazione delle prestazioni analitiche del metodo diretto.

Si dovrà anche valutare una stima del rapporto costo/beneficio.

---

---

## MATERIALE E METODI

### **Materiale:**

Per la misura diretta delle LDL si è fatto uso dello strumento e dei reagenti seguenti:

- Hitachi 912 (Roche, Rotkreuz, CH)
- Kit LDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation (Colesterolo LDL, senza pretrattamento), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.
  - Calibratori: **S1** NaCl (0,9%); **S2** C.f.a.s (Calibrator for automated system) HDL/LDL-C plus, Art. n.1972235.
  - Controllo di qualità: Precinorm L e Precipath HDL/LDL-C
- Kit HDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation (Colesterolo HDL, senza pretrattamento), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.
  - Calibratori: **S1** NaCl (0,9%); **S2** C.f.a.s. HDL/LDL-C plus.
  - Controllo di qualità: Multiqua 1 (BioRad); Multiqua 3 (BioRad)
- Kit TG (Trigliceridi GPO-PAP), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.
  - Calibratori: **S1** NaCl (0,9%); **S2** C.f.a.s.
  - Controllo di qualità: Multiqua 1 (BioRad); Precinorm U (Roche); Multiqua 3 (BioRad);
- Kit CHOL (Colesterolo CHOD-PAP), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.
  - Calibratori: **S1** NaCl (0,9%); **S2** C.f.a.s.
  - Controllo di qualità: Multiqua 1 (BioRad); Precinorm U (Roche); Multiqua 3 (BioRad);
- Campioni di siero o plasma di 69 pazienti scelti a caso (random), arrivati nel laboratorio dell'Ospedale Civico. Secondo le indicazioni pre-analitiche del metodo Roche, i campioni sono stati raccolti in provette per analisi chimico cliniche, con gel (tappo marrone) o con anticoagulante litio-eparina con gel (tappo verdino; LH PST II Plus) della ditta BD Vacutainer Systems Preanalytical Solutions, Belliver Industrial Estate, Plymouth. PL6 7BP. UK.<sup>8</sup>

## Metodi:

### LDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation:

Si tratta di un test enzimatico colorimetrico in fase omogenea per la determinazione diretta del colesterolo-LDL nel siero e nel plasma umani impiegando analizzatori di chimica clinica.

Questo metodo utilizza i vantaggi della solubilizzazione micellare selettiva del colesterolo LDL mediante un detergente non-ionico e l'interazione di un composto di zucchero e di lipoproteine (VLDL e chilomicroni).

Includendo un detergente nel metodo enzimatico, creando una reazione di accoppiamento colesteroloesterasi-colesteroloossidasi, le reattività relative del colesterolo nelle frazioni lipoproteiche crescono in sequenza: HDL < chilomicroni < VLDL < LDL.

In presenza di Mg<sup>2+</sup>, un composto di zucchero riduce notevolmente la reazione enzimatica per la misurazione del colesterolo nelle VLDL e nei chilomicroni. La combinazione di un composto di zucchero con un detergente permette la determinazione selettiva del colesterolo LDL.

Nella reazione finale viene originato un colorante blu-violetto, la cui intensità di colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo, misurata fotometricamente.

[Tratto dalla metodica Roche in allegato 9]

### Formula di Friedewald:

Permette la determinazione indiretta (tramite calcolo) con la formula seguente (in unità SI):

$$\text{LDL-C} = \text{colesterolo totale} - \text{HDL-C} - \text{trigliceridi} / 2.2$$

[mmol/L]    [mmol/L]    [mmol/L]    [mmol/L]

Colesterolo totale, HDL-C e trigliceridi sono stati determinati usando le metodiche Roche/Hitachi, come descritto nelle schede operative del laboratorio dell'ospedale Civico di Lugano.<sup>6</sup>

## Procedimento:

Inizialmente si è dovuto programmare l'Hitachi 912 per il nuovo metodo LDL-C, utilizzando i protocolli già esistenti e i dati forniti con il Kit. <sup>[Allegato10]</sup>

Dopo la programmazione si è proceduto a calibrare lo strumento con i controlli Precipath e Precinorm. Se i valori risultano nei limiti definiti dal metodo si può procedere con le misurazioni dei campioni.

I metodi HDL-C, TG e CHOL sono già programmati sull'Hitachi 912.

Ogni giorno prima della serie d'analisi giornaliera effettuati calibrazioni e controlli di qualità dei metodi HDL-C, TG, CHOL.

Per il nuovo metodo LDL-C è necessario eseguire la calibrazione e i controlli di qualità prima di iniziare con l'analisi della serie di campioni.

La formula di Friedewald della serie di campioni analizzati per valutare il nuovo metodo LDL-C è stata calcolata con il programma Microsoft Excel, in un computer esterno al laboratorio (computer privato).

Sono stati analizzati i primi 40 campioni in doppio e 9 in singolo in serie (Tab. 3) e altri 20 campioni in doppio in una seconda serie (Tab. 4).

Le misurazioni delle due serie sono state fatte in giornate diverse ma in entrambi i casi non ci sono stati criteri di scelta dei campioni (scelta "random").

I campioni, essendo stati scelti a caso, sono stati presi tra i campioni arrivati nel laboratorio dell'Ospedale Civico, è quindi stato impossibile stabilire il tempo passato dal momento del prelievo o se erano pazienti a digiuno (sarebbe stato interessante per valutare la differenza tra i due metodi su campioni non a digiuno).

Sono stati centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti (centrifuga “eppendorf: centrifuge 5804R” con raggio del rotore = 16,1 cm) e conservati a temperatura ambiente (TA) fino al momento della determinazione.

Per la determinazione si è proceduto come segue:

1. Le analisi singole sono state effettuate direttamente nella provetta madre.
2. Le determinazioni in doppio sono state effettuate in aliquote della provetta madre ed analizzate una dopo l'altra in serie.
3. Gli ultimi 20 campioni analizzati sono stati congelati ad una temperatura di  $-30^{\circ}\text{C}$  (congelatore “Colora/UF40-300S; CFC free”, i campioni riposti in un portaprovette sono stati immessi nel congelatore) per 4 giorni, in provette di plastica, aliquote dalla provetta madre.
4. Dopo scongelamento (tolti dal congelatore e lasciati scongelare a TA) sono stati rianalizzati con il metodo LDL-C diretto (Tab. 6). I doppi sono stati fatti di seguito in 2 aliquote, dalla provetta in cui è stato congelato il siero/plasma.

I dati, dapprima rappresentati tramite tabella Excel e calcolati, sono poi stati elaborati, tramite programma di statistica (Analyse-it Software, UK), con la consulenza del dott. Marco Balerna (EOLAB).

# RISULTATI

TABELLA 3: MISURE A FRESCO

CONFRONTO FRIEDWALD-LDL-C							MISURE "IN SEMPLICE"		Delta LDL <sup>Fried</sup> - LDL-C		Delta LDL-C - LDL <sup>Fried</sup>	
Semplici	Campione	Colesterolo (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL Friedewald (mmol/L)	LDL-C plus (mmol/L)	differenza assoluta	% di differenza risp. a LDL-Fried	differenza risp. a assoluta	% di differenza LDL-C		
1	109.9	2.22	5.89	0.75	1.21	0.26	0.95	78.5%	-0.95	-365.38%		
2	53.20	1.86	1.05	0.74	0.64	0.66	-0.02	-2.7%	0.02	2.62%		
3	37.20	2.25	1.25	1.05	0.63	0.85	-0.22	-34.5%	0.22	25.67%		
4	45.20	2.51	1.95	0.51	1.11	0.85	0.26	23.7%	-0.26	-31.02%		
5	52.20	2.47	1.48	0.51	1.29	1.10	0.19	14.5%	-0.19	-17.02%		
6	58.20	2.55	1.85	0.58	1.13	1.19	-0.06	-5.4%	0.06	5.12%		
7	43.20	2.53	1.21	1.10	0.88	1.21	-0.33	-37.5%	0.33	27.27%		
8	64.20	2.70	1.25	1.04	1.09	1.21	-0.12	-10.8%	0.12	9.77%		
9	54.20	2.78	0.80	1.29	1.13	1.27	-0.14	-12.8%	0.14	11.31%		
10	50.20	2.52	0.60	1.17	1.08	1.32	-0.24	-22.5%	0.24	18.39%		
11	56.20	3.54	1.05	1.80	1.26	1.38	-0.12	-9.3%	0.12	8.50%		
12	14.20	2.76	1.17	1.13	1.10	1.41	-0.31	-28.4%	0.31	22.11%		
13	38.20	2.98	1.20	1.17	1.26	1.43	-0.17	-13.1%	0.17	11.57%		
14	55.20	4.11	2.51	0.48	2.49	1.48	1.01	40.5%	-1.01	-68.18%		
15	16.19	3.35	2.90	0.74	1.29	1.49	-0.20	-15.3%	0.20	13.30%		
16	47.20	3.01	1.30	1.19	1.23	1.53	-0.30	-24.5%	0.30	19.67%		
17	46.20	3.16	2.20	1.00	1.16	1.55	-0.39	-33.6%	0.39	25.16%		
18	29.20	3.01	1.94	0.89	1.24	1.58	-0.34	-27.6%	0.34	21.63%		
19	13.20	2.81	0.65	1.12	1.39	1.63	-0.24	-16.9%	0.24	14.45%		
20	14.19	3.30	2.17	0.54	1.77	1.88	-0.11	-6.0%	0.11	5.66%		
21	16.20	3.41	1.56	0.98	1.72	1.89	-0.17	-9.8%	0.17	8.95%		
22	120.9	3.56	0.8	1.89	1.31	1.9	-0.59	-45.0%	0.59	31.05%		
23	20.19	3.64	0.96	1.59	1.61	1.91	-0.30	-18.4%	0.30	15.52%		
24	96.9	3.48	2.75	0.62	1.61	1.93	-0.32	-19.9%	0.32	16.58%		
25	32.20	3.71	1.20	1.60	1.56	2.00	-0.44	-27.8%	0.44	21.77%		
26	49.20	3.45	1.86	0.78	1.82	2.01	-0.19	-10.2%	0.19	9.23%		
27	34.20	3.27	1.73	0.80	1.68	2.09	-0.41	-24.1%	0.41	19.44%		
28	42.20	3.85	0.96	1.65	1.76	2.10	-0.34	-19.1%	0.34	16.02%		
29	19.19	4.89	1.11	2.82	1.57	2.13	-0.56	-36.1%	0.56	26.50%		
30	106.9	4.18	1.56	1.99	1.48	2.24	-0.76	-51.4%	0.76	33.93%		
31	44.20	3.39	1.46	0.80	1.93	2.26	-0.33	-17.3%	0.33	14.76%		
32	110.9	3.86	1.3	1.28	1.99	2.29	-0.30	-15.1%	0.30	13.10%		
33	133.9	3.41	0.68	1.17	1.93	2.3	-0.37	-19.2%	0.37	16.09%		
34	95.90	3.46	1.16	1.1	1.83	2.45	-0.62	-33.9%	0.62	25.31%		
35	132.9	3.66	1.46	1.11	1.89	2.46	-0.57	-30.2%	0.57	23.17%		
36	40.20	4.20	2.36	1.17	1.96	2.48	-0.52	-26.7%	0.52	21.08%		
37	60.20	4.37	2.25	1.28	2.07	2.58	-0.51	-24.8%	0.51	19.87%		
38	124.9	4.27	1.45	1.68	1.93	2.62	-0.69	-35.8%	0.69	26.34%		
39	113.9	4.51	0.7	2.04	2.15	2.73	-0.58	-27.0%	0.58	21.25%		
40	115.9	5.22	0.74	3.07	1.81	2.74	-0.93	-51.4%	0.93	33.94%		
41	28.19	4.49	1.46	1.22	2.61	2.81	-0.20	-7.8%	0.20	7.25%		
42	104.9	5.05	0.92	2.4	2.23	2.84	-0.61	-27.4%	0.61	21.48%		
43	134.9	4.48	1.9	1.1	2.52	2.89	-0.37	-14.7%	0.37	12.80%		

44	118.9	4.41	1.39	1.32	2.46	2.91	-0.45	-18.3%	0.45	15.46%
45	65.20	4.52	0.81	1.35	2.80	2.91	-0.11	-3.9%	0.11	3.72%
46	13.19	5.14	2.35	1.88	2.19	2.92	-0.73	-33.2%	0.73	24.94%
47	105.9	4.98	1.83	1.82	2.33	3.01	-0.68	-29.2%	0.68	22.59%
48	114.9	4.88	0.46	2.26	2.41	3.05	-0.64	-26.6%	0.64	20.98%
49	26.20	5.29	2.02	2.16	2.21	3.08	-0.87	-39.3%	0.87	28.19%
50	123.9	4.79	1.67	1.66	3.27	3.11	0.16	4.9%	-0.16	-5.14%
51	36.20	4.88	1.72	1.28	2.82	3.20	-0.38	-13.5%	0.38	11.93%
52	62.20	5.51	1.88	1.85	2.81	3.30	-0.49	-17.6%	0.49	14.99%
53	111.9	4.8	0.51	1.96	2.61	3.31	-0.70	-26.8%	0.70	21.15%
54	18.19	5.10	0.86	1.37	3.34	3.32	0.02	0.6%	-0.02	-0.58%
55	57.20	6.81	1.34	2.80	3.40	3.39	0.01	0.3%	-0.01	-0.32%
56	61.20	5.15	1.77	1.48	2.87	3.42	-0.55	-19.4%	0.55	16.21%
57	116.9	5.25	1.09	1.82	2.93	3.49	-0.56	-19.1%	0.56	16.05%
58	17.19	5.57	1.33	1.92	3.05	3.49	-0.44	-14.6%	0.44	12.74%
59	122.9	5.1	2.73	1.05	2.81	3.51	-0.70	-24.9%	0.70	19.94%
60	51.20	5.34	0.99	1.77	3.12	3.51	-0.39	-12.5%	0.39	11.11%
61	15.19	5.31	2.32	1.06	3.20	3.54	-0.34	-10.8%	0.34	9.73%
62	35.20	5.59	1.66	1.54	3.30	3.84	-0.54	-16.5%	0.54	14.18%
63	31.20	5.82	2.47	1.10	3.60	3.92	-0.32	-9.0%	0.32	8.23%
64	63.20	5.99	2.17	1.39	3.61	4.12	-0.51	-14.0%	0.51	12.29%
65	24.20	5.86	0.92	1.33	4.11	4.43	-0.32	-7.7%	0.32	7.18%
66	48.20	6.31	1.04	1.69	4.15	4.50	-0.35	-8.5%	0.35	7.84%
67	33.20	6.50	1.35	1.63	4.26	4.71	-0.45	-10.7%	0.45	9.63%
68	15.20	6.88	2.36	1.34	4.47	4.88	-0.41	-9.2%	0.41	8.46%
69	25.20	6.57	1.55	1.36	4.51	4.89	-0.38	-8.5%	0.38	7.86%

= campioni della seconda serie

**TABELLA 4: MISURE LDL-C “IN DOPPIO”**

	Campione	LDL-C plus (mmol/L)		diff <sup>2</sup>
		Misura1	Misura2	
1	13.2	1.63	1.67	0.002
2	34.2	2.09	2.10	0.000
3	35.2	3.84	3.86	0.000
4	36.2	3.20	3.20	0.000
5	37.2	0.85	0.84	0.000
6	38.2	1.43	1.44	0.000
7	40.2	2.48	2.47	0.000
8	42.2	2.10	2.13	0.001
9	43.2	1.21	1.20	0.000
10	44.2	2.26	2.29	0.001
11	45.2	0.85	0.86	0.000
12	46.2	1.55	1.56	0.000
13	47.2	1.53	1.52	0.000
14	48.2	4.50	4.44	0.004
15	49.2	2.01	2.05	0.002
16	50.2	1.32	1.31	0.000
17	51.2	3.51	3.55	0.002
18	52.2	1.10	1.10	0.000
19	53.2	0.66	0.66	0.000
20	54.2	1.27	1.27	0.000
21	55.2	1.48	1.47	0.000
22	56.2	1.38	1.38	0.000
23	57.2	3.35	3.35	0.000
24	58.2	1.19	1.19	0.000

25	60.2	2.59	2.59	0.000	
26	61.2	3.36	3.36	0.000	
27	62.2	3.27	3.27	0.000	
28	63.2	4.16	4.16	0.000	
29	64.2	1.24	1.24	0.000	
30	65.2	2.91	2.90	0.000	
31	95.9	2.45	2.42	0.001	
32	96.9	1.93	1.88	0.003	
33	104.9	2.84	2.82	0.000	
34	105.9	3.01	3.00	0.000	
35	106.9	2.24	2.23	0.000	
36	109.9	0.26	0.27	0.000	
37	110.9	2.29	2.26	0.001	
38	111.9	3.31	3.31	0.000	
39	113.9	2.73	2.71	0.000	
40	114.9	3.05	3.01	0.002	
41	115.9	2.74	2.71	0.001	
42	116.9	3.49	3.46	0.001	
43	118.9	2.91	2.85	0.004	
44	120.9	1.90	1.87	0.001	
45	122.9	3.51	3.51	0.000	
46	123.9	3.11	3.10	0.000	
47	124.9	2.62	2.61	0.000	
48	132.9	2.46	2.47	0.000	
49	133.9	2.30	2.29	0.000	
50	134.9	2.89	2.85	0.002	
Dev.std. Complessiva:				0.0165985	0.027

**TABELLA 5: MISURE “FRESCO-CONGELATO”**

	Chol. mmol/L	Tg mmol/L	HDL mmol/L	LDL-Friedwald mmol/L	LDL-C				diff. fresco <sup>2</sup>	diff. cong <sup>2</sup>
					Fresco mmol/L		Congelato mmol/L			
1	3.46	1.16	1.1	1.83	2.45	2.42	2.46	2.46	0.001	0.000
2	3.48	2.75	0.62	1.61	1.93	1.88	1.66	1.68	0.003	0.000
3	5.05	0.92	2.4	2.23	2.84	2.82	2.77	2.77	0.000	0.000
4	4.98	1.83	1.82	2.33	3.01	3.00	2.87	2.84	0.000	0.001
5	4.18	1.56	1.99	1.48	2.24	2.23	2.12	2.10	0.000	0.000
6	2.22	5.89	0.75	1.21	0.26	0.27	0.05	0.05	0.000	0.000
7	3.86	1.3	1.28	1.99	2.29	2.26	2.13	2.13	0.001	0.000
8	4.8	0.51	1.96	2.61	3.31	3.31	3.22	3.21	0.000	0.000
9	4.51	0.7	2.04	2.15	2.73	2.71	2.63	2.61	0.000	0.000
10	4.88	0.46	2.26	2.41	3.05	3.01	2.96	2.98	0.002	0.000
11	5.22	0.74	3.07	1.81	2.74	2.71	2.59	2.62	0.001	0.001
12	5.25	1.09	1.82	2.93	3.49	3.46	3.35	3.36	0.001	0.000
13	4.41	1.39	1.32	2.46	2.91	2.85	2.75	2.74	0.004	0.000
14	3.56	0.8	1.89	1.31	1.90	1.87	1.83	1.82	0.001	0.000
15	5.1	2.73	1.05	2.81	3.51	3.51	3.26	3.23	0.000	0.001
16	4.79	1.67	1.66	3.27	3.11	3.10	2.91	2.94	0.000	0.001
17	4.27	1.45	1.68	1.93	2.62	2.61	2.47	2.45	0.000	0.000
18	3.66	1.46	1.11	1.89	2.46	2.47	2.29	2.28	0.000	0.000
19	3.41	0.68	1.17	1.93	2.30	2.29	2.18	2.18	0.000	0.000
20	4.48	1.9	1.1	2.52	2.89	2.85	2.71	2.68	0.002	0.001
					2.60	2.58	2.46	2.46	0.015	0.007
					2.59175		2.46			
					0.01956		0.01323			
					2.5534	2.6301	2.433	2.484		

Medie singole:  
Medie  
complessive:  
S.D.  
complessive:  
I.C. 95%:

## 1. Parametri base

I risultati sperimentali originali della determinazione dei quattro parametri-base (colesterolo, trigliceridi, HDL, LDL) su n = 69 campioni sono dati in tabella 6.

La tabella 6 riassume le caratteristiche dei campioni utilizzati nel presente studio. Da essa si può rilevare che molti dei campioni utilizzati presentavano valori al di fuori della norma (vedi ultima colonna).

I valori normali oggi internazionalmente accettati sono i seguenti:

**Colesterolo  $\leq 5.0$  mmol/L, Trigliceridi  $\leq 1.7$  mmol/L, HDL-C  $> 1.0$  mmol/L, LDL-C  $< 2.6$  mmol/L<sup>1</sup>**

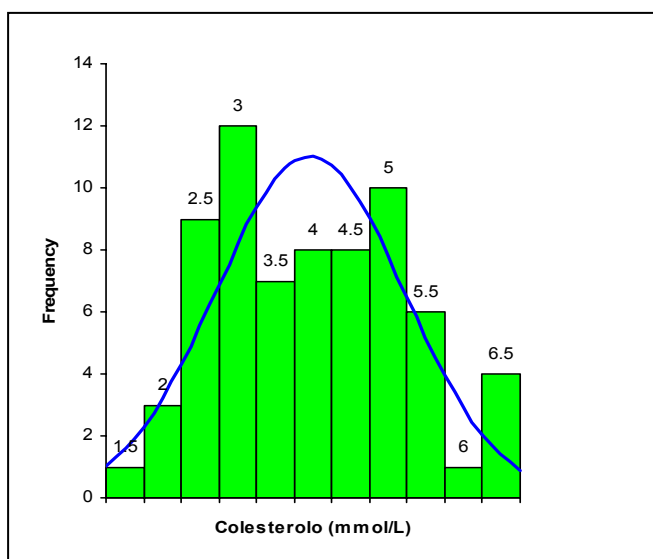
**Tabella 6: Riassunto delle caratteristiche dei campioni utilizzati nel presente studio**

Parametro	n	unità	Media	DS	Varianza	Mediana	Range	Valori normali. EOLAB	n fuori valori normali. (%)
<b>Colesterolo</b>	69	mmol/L	4.21	1.25	1.55	4.20	5.02	$\leq 5.0$	n = 21 (30.4%)
<b>Trigliceridi</b>	69	mmol/L	1.56	1.80	0.63	1.45	5.43	$\leq 1.7$	n = 25 (36.2%)
<b>HDL-C</b>	69	mmol/L	1.38	0.56	0.31	1.28	2.59	$> 1.0$	n = 14 (20.3%)
<b>LDL-C</b>	69	mmol/L	2.50	1.07	1.14	2.46	4.63	$\leq 2.6$	n = 32 (50%)

I grafici da 1 a 4 danno la statistica descrittiva dei quattro parametri e di tutte le misure di tendenza e di distribuzione (media, varianza, mediana,...).

La distribuzione dei dati del colesterolo sembra indicare una bifasicità (due popolazioni di campioni).

**Grafico 1: Colesterolo (mmol/L)**



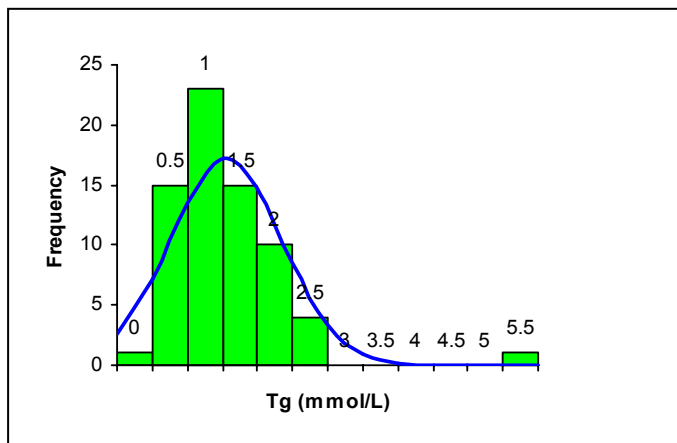
**n = 69**  
**Mean: 4.211**  
**95% IC: 3.912 to 4.511**  
**Variance: 1.5518**  
**Median: 4.200**

<sup>1</sup> I valori normali indicati sono quelli accettati nel 2003 dalla IAS (International Atherosclerosis Society) dalla EAS (European Atherosclerosis Society) e dalla AHA (American Heart Association).



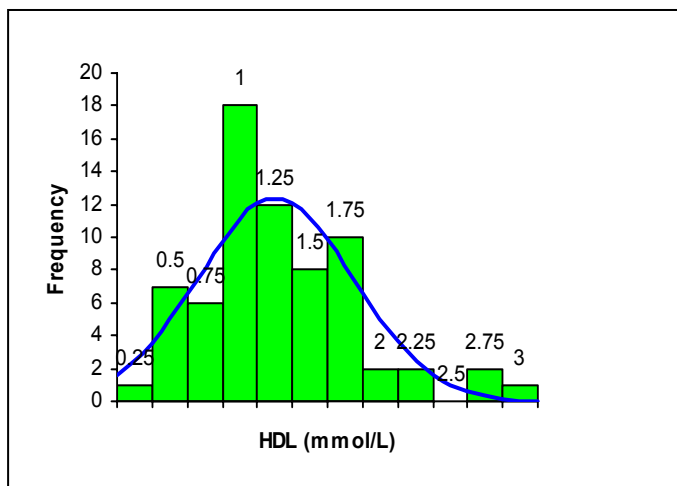
Trigliceridi e HDL mostrano un campione con valori particolarmente alti (grafico 2; punto con TG = 5,89).

**Grafico 2: Trigliceridi (mmol/L)**



**n = 69**  
**Mean: 1.556**  
**95% IC: 1.365 to 1.747**  
**Variance: 0.6330**  
**Median: 1.450**

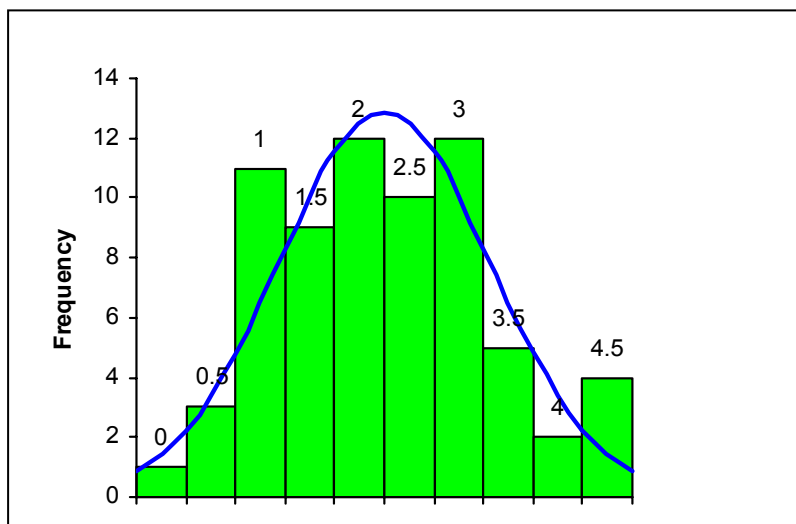
**Grafico 3: HDL (mmol/L)**



**n = 69**  
**Mean: 1.379**  
**95% IC: 1.245 to 1.512**  
**Variance: 0.3097**  
**Median: 1.280**

La distribuzione dell'LDL misurata con il metodo Roche presenta una distribuzione relativamente uniforme (grafico 4).

**Grafico 4: LDL-C plus (mmol/L)**



**n = 69**  
**Mean: 2.503**  
**95% IC: 2.246 to 2.760**  
**Variance: 1.1425**  
**Median: 2.460**

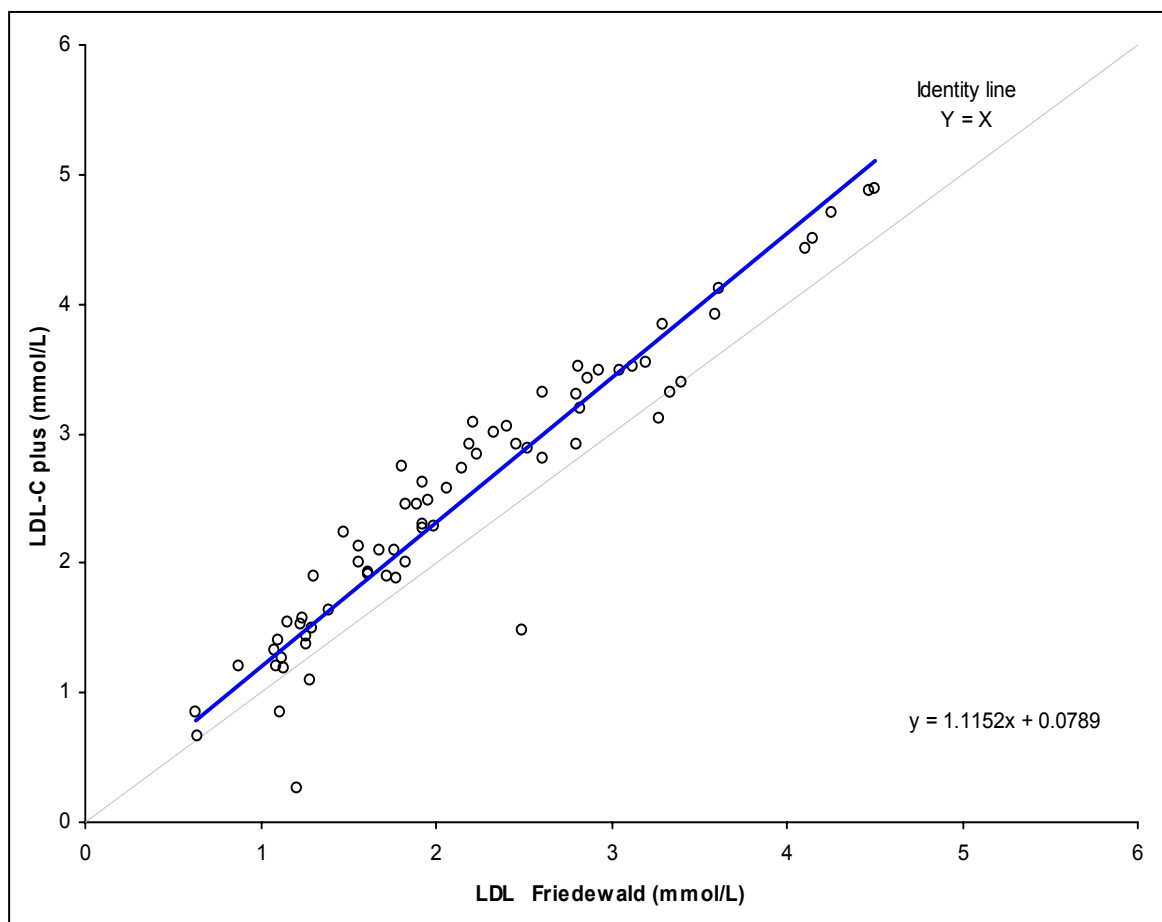
## 2. Relazione tra il colesterolo calcolato e il colesterolo misurato

Sempre usando gli  $n = 69$  campioni descritti sopra si è studiata la relazione tra l'LDL-C così come calcolato secondo il metodo di Friedewald e il colesterolo diretto misurato su Hitachi con metodo Roche.

Il risultato è riportato in grafico 5. La retta di regressione secondo Deming indica una relazione moderatamente buona tra i due metodi con la presenza però di uno spostamento (bias) proporzionale.

L'incrocio della retta di regressione con l'origine degli assi di 0.079 (IC 95%: -0.128 a 0.286) e quindi non diverso da 0.0. La pendenza (1.11) è invece significativamente diversa da 1.0 (IC 95%: 1.028-1.202; da cui il bias proporzionale).

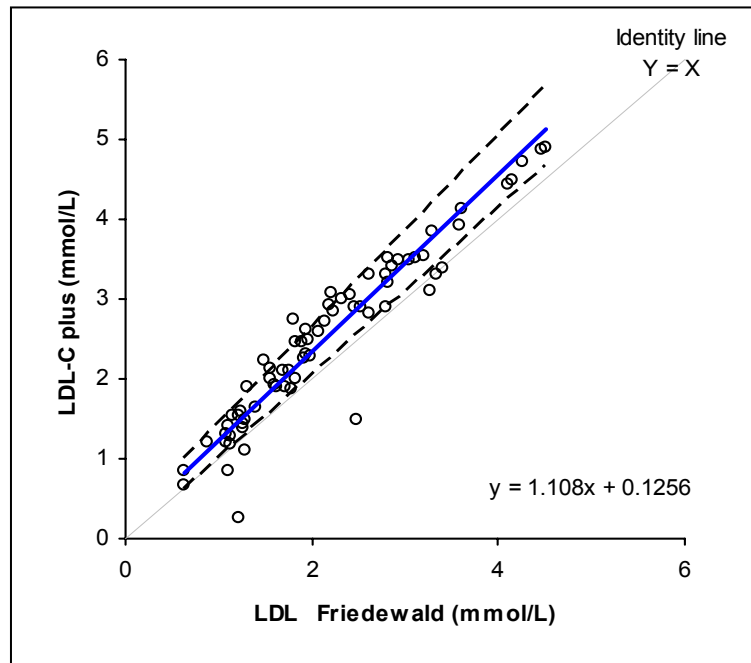
**Grafico 5: LDL Friedewald (mmol/L) vs LDL-C plus (mmol/L). Regressione secondo Deming. (n = 69)**



Siccome l'analisi dei residui standardizzati mostra la presenza di due punti sperimentali vicini a 4.0 si è calcolato anche la regressione dei dati sperimentali secondo Passing & Bablok (regressione non parametrica). In questo caso il metodo mette in evidenza sia un bias proporzionale che una relazione lineare tra i due parametri (grafico 6).

Soprattutto quest'ultimo tipo di analisi fa capire che la determinazione "indiretta" del LDL-C (formula di Friedewald) dà solitamente dei valori inferiori rispetto al metodo diretto (Roche) che, essendo sperimentale, è sicuramente superiore al metodo indiretto, all'incirca del 20-25% con punte fino al 40%.

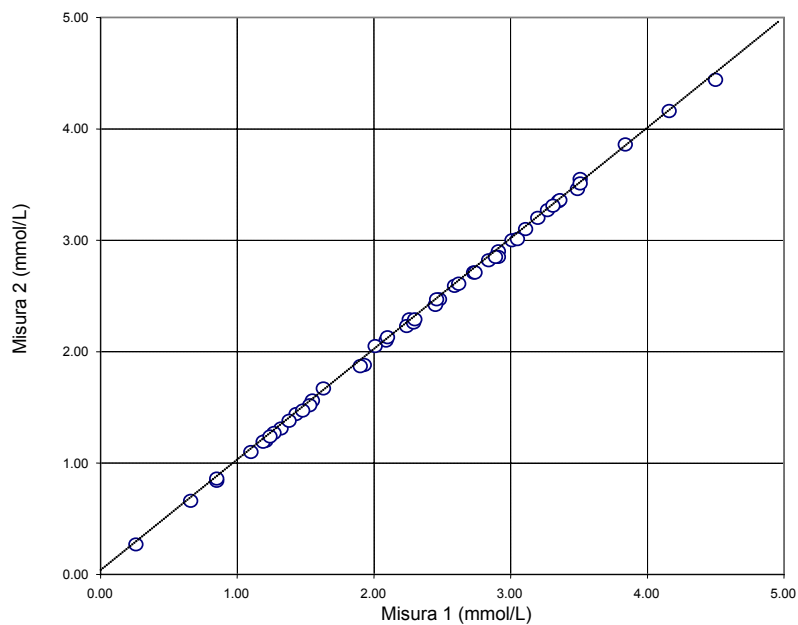
**Grafico 6: LDL Friedewald (mmol/L) vs LDL-C plus (mmol/L). Regressione secondo Passing & Bablok. (n = 69)**



### 3. Ripetibilità delle misure “dirette”

I risultati di n = 50 determinazioni in doppio col metodo diretto (Roche) hanno dato il risultato riportato nel grafico 7.

**Grafico 7: LDL-C plus. Analisi della ripetibilità del metodo (n= 50 misure “dirette” in doppio)**



In tabella 7 si vede l'analisi dei risultati, con un modello di analisi di varianza che tiene conto del fatto che siano misure ripetute, indica che l'uguaglianza dei valori tra le serie va accettata con oltre 95% di probabilità ( $F = 3.50$ , gradi di libertà = 1 e 49,  $p = 0.067$ ).

**Tabella 7: LDL-C plus (mmol/L): Misura1, Misura2 (1-way within subjects ANOVA repeated measures)**

	<b>n</b>	50			
<b>LDL-C plus (mM)</b>	<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>SE</b>	
<b>Misura1</b>	50	2.327	0.970	0.1372	
<b>Misura2</b>	50	2.321	0.965	0.1365	
<b>Source of variation</b>	<b>SSq</b>	<b>DF</b>	<b>MSq</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Within LDL-C plus (mmol/L)</b>	0.001	1	0.001	3.50	0.0673
<b>Between LDL-C plus (mmol/L)</b>	91.794	49	1.873	7285.25	<0.0001
<b>Within cells</b>	0.013	49	0.000		
<b>Total</b>	91.808	99			

**Spiegazione:**

Within LDL-C plus= confronto delle 2 serie di dati

Between LDL-C plus= confronto dei singoli dati (in doppio) l'uno con l'altro

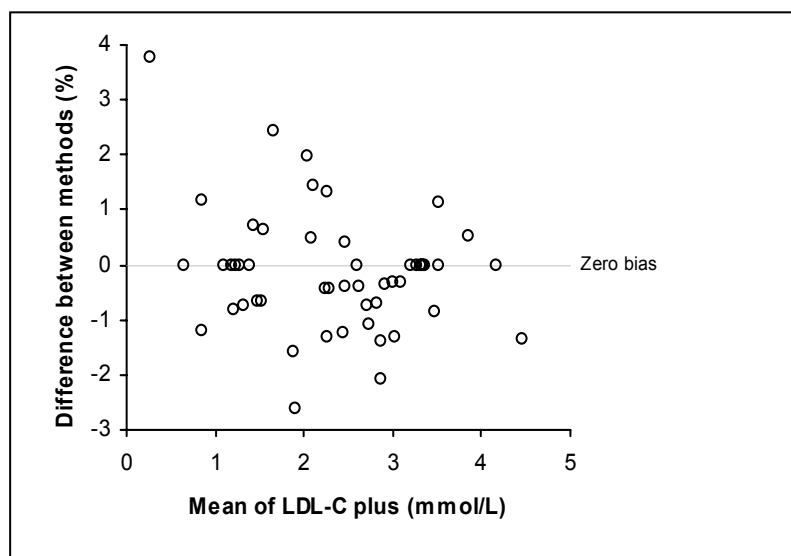
**Conclusione:**

Con  $F = 3.50$  e 1, 48 gradi di libertà si ottiene  $p = 0.0673$ .

Si conclude col 95% di sicurezza che l'ipotesi  $H_0$  NON può essere confutata e che le due serie di dati sono quindi (molto) simili.

Inoltre come dimostrato dal "Bias plots" nel grafico 8 (metodo secondo Altman & Bland). L'errore di ripetibilità tra le due serie è del +/- 2.5% al massimo.

**Grafico 8: Bias plot; LDL-C plus (mmol/L): Misura 1 vs Misura 2 (n = 50)**

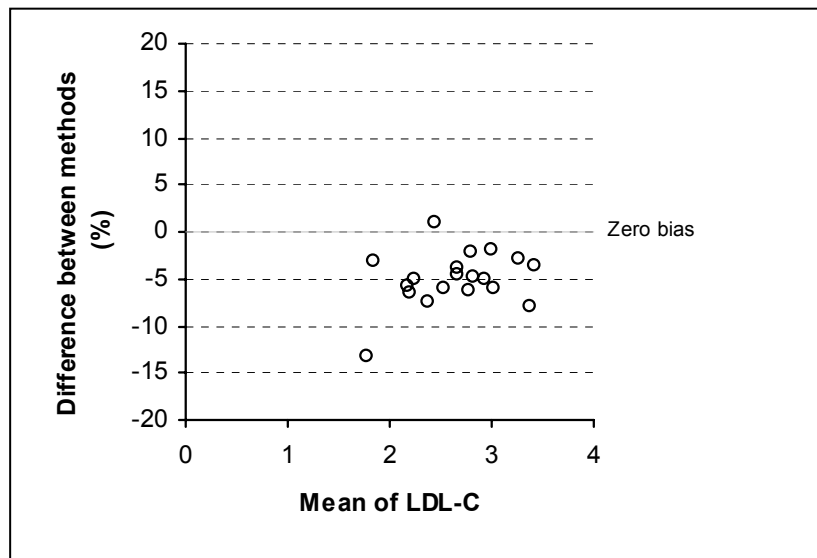


#### 4. Effetto della congelazione dei campioni a -30 °C

I risultati ottenuti con n = 20 campioni misurati in doppio, prima e dopo congelazione, sono dati in grafico 9.

Le differenze percentuali tra i metodi sono risultate variare tra -13 e 1% con una media di -5%.

**Grafico 9: Bias plots; LDL-C: Fresco vs Congelato (n = 20)**



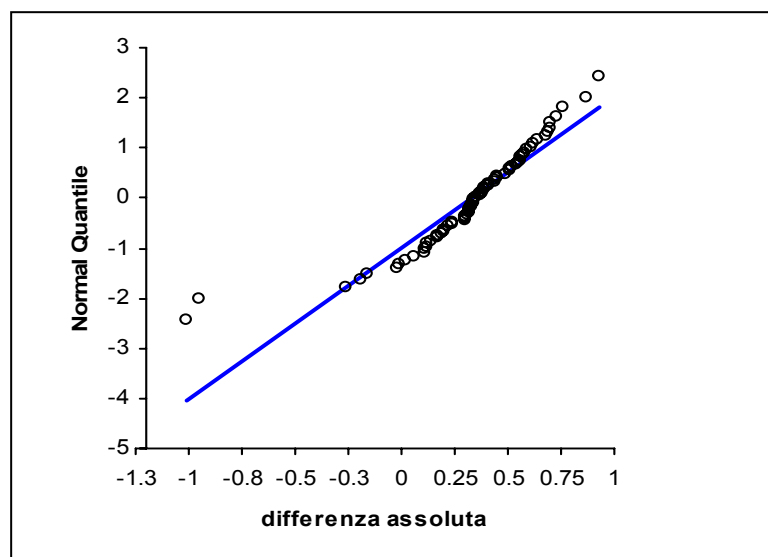
#### 5. Commento al grafico delle differenze (grafico 10)

Calcolando le differenze

$$LDL_{\text{misurato}} (\text{Roche}) - LDL_{\text{calcolato}} (\text{Friedewald})$$

Per gli n = 69 casi esaminati nel presente lavoro si trova che la LDL misurata è significativamente più alta della LDL calcolata (mediana delle differenze = 0.37 mmol/L [IC al 95% da 0.33 a 0.424 mmol/L]. Al valore critico di 2.6 mmol/L, ciò significa valori maggiori del 14 % (IC al 95%: 11.5-16.6%).

**Grafico 10: Delta LDL-C – LDL-Fried. differenza assoluta (n = 69)**



Questo porta dunque a concludere, che la LDL calcolata (cioè la determinazione finora usata nei laboratori EOC) sottostima regolarmente il parametro LDL (grafico 11). Dal punto di vista clinico, la conseguenza di questa “sottostima” è che la LDL calcolata secondo Friedewald classifica “normali” (cl clinicamente accettabili) dei valori che, misurati col metodo Roche, non sono normali.

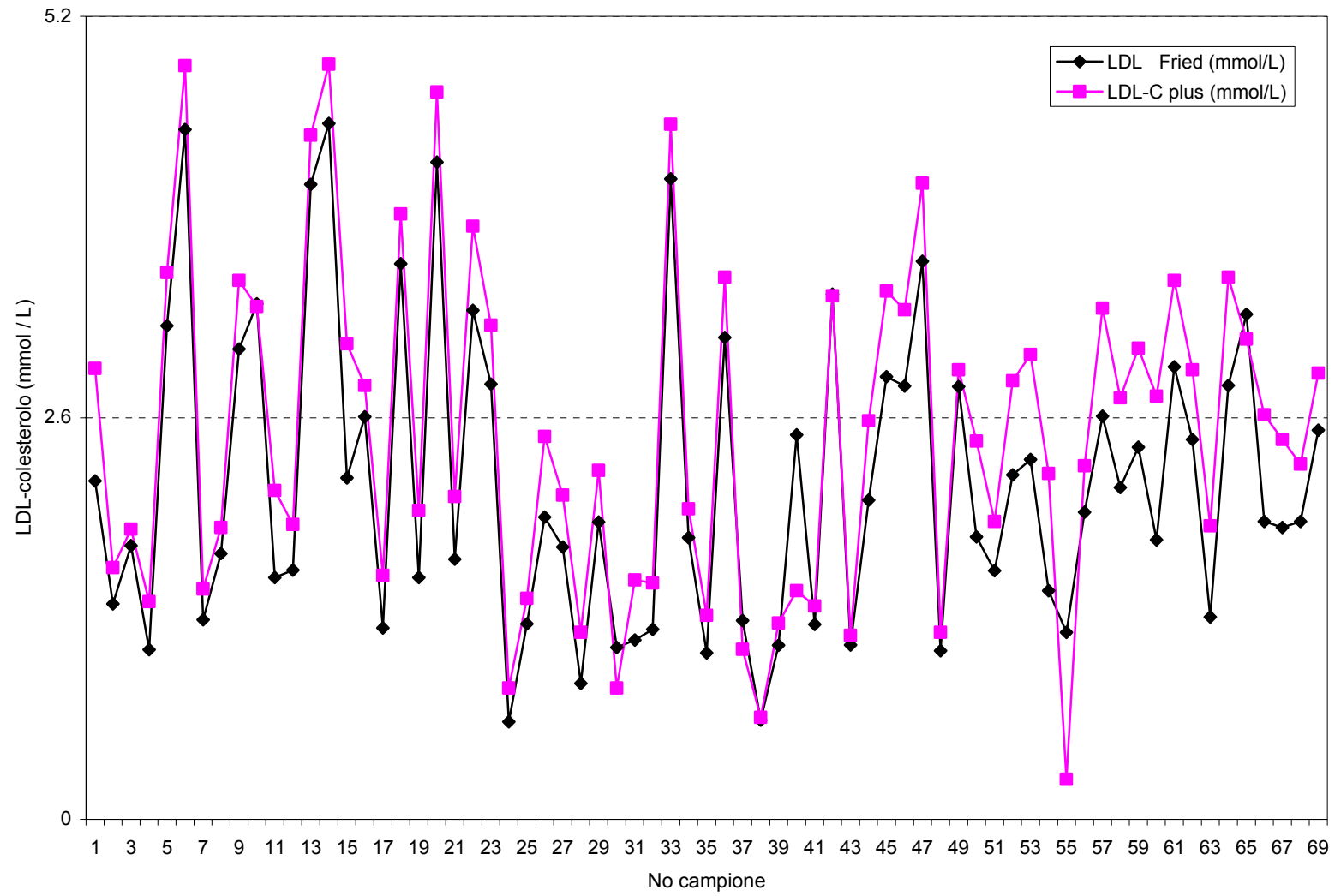
La tabella 8, che segue, riassume la situazione che abbiamo trovato sperimentalmente:

**Tabella 8: Situazione trovata sperimentalmente**

	Numero pazienti considerati “normali” in base al criterio $\leq 2.6$ mmol/L di colesterolo LDL	Numero di pazienti considerati “anormali” in base al criterio $\leq 2.6$ mmol/L di colesterolo LDL	Totali
LDL <sub>calcolata</sub> (Friedewald)	47 (68.1%)	22 (31.9%)	69 (100%)
LDL <sub>misurata</sub> (Roche)	37 (53.6%)	32 (46.4%)	69 (100%)

[Allegato 11]

Grafico 11: LDL-Colesterolo calcolato (Friedewald) vs misurato (Roche). n = 69 dati



## 6. Valutazione dell'errore

### 6.1. Errore sistematico (ES), inaccuratezza:

A 2.6 mmol/L (livello critico di decisione clinica), ES si calcola dalla regressione (Deming/Passing & Bablok).

#### 6.1.a.

Deming:  $y = 0.079 + 1.115 x \Rightarrow 0.079 + 1.115 * 2.6 = 2.98 \text{ mmol/L}$

da cui: ES assoluto =  $(2.98 - 2.60) \text{ mmol/L} = 0.38 \text{ mmol/L}$   
ES % =  $0.38 / 2.6 = \mathbf{14.6 \%}$

#### 6.1.b.

Passing & Bablok:  $y = 0.126 + 1.108 x \Rightarrow 0.126 + 1.105 * 2.6 = 2.99 \text{ mmol/L} \approx 3.0 \text{ mmol/L}$

da cui: ES assoluto =  $(2.99 - 2.6) \text{ mmol/L} = 0.39 \text{ mmol/L}$   
ES % =  $0.40 / 2.6 = \mathbf{15.4 \%}$

### 6.2. Errore random (Er), imprecisione:

È ottenibile dall'esperimento di ripetibilità delle misure. La  $\Sigma$  (differenza tra misure ripetute)<sup>2</sup> dà:  
 $0.027 \text{ mmol/L} = d^2$ . La deviazione standard (complessiva) delle misure si ottiene con  $\sqrt{\frac{\sum d^2}{N}}$ .

Otteniamo:  $\sqrt{\frac{0.027}{50}} = 0.017 \text{ mmol/L}$

### 6.3. Calcolo dell'errore totale (TE):

#### 6.3.a.

Deming:  $(0.38 + 3 * 0.017) \text{ mmol/L} = 0.431 \text{ mmol/L} = \text{TE assoluto}$   
TE % =  $0.431 / 2.6 = \mathbf{16.6\%}$

#### 6.3.b.

Passing & Bablok:  $(0.40 + 3 * 0.017) \text{ mmol/L} = \text{TE assoluto}$   
TE % =  $0.451 / 2.6 = \mathbf{17.3 \%}$



## DISCUSSIONE

I dati ottenuti da questo studio hanno permesso di mettere in rilievo l'attendibilità del metodo Roche per la determinazione del LDL- colesterolo sierico, soprattutto se confrontato con il "metodo indiretto" basato sul calcolo che utilizza le concentrazioni di colesterolo, trigliceridi ed HDL-colesterolo (formula di Friedewald).

Come spiegato nella parte introduttiva, questo "metodo indiretto" ha del resto dei limiti ben noti ripetutamente riportati in Letteratura (paziente a digiuno,  $TG \leq 4,5$  mmol/L e  $>$  colesterolo; si sono inoltre osservati valori falsati in pazienti diabetici e con malattie del metabolismo lipidico).

Il metodo diretto (Roche) non è invece soggetto a tali limiti, ciò permette di ottenere dei risultati analiticamente e clinicamente più attendibili in uno spettro maggiore di campioni.

Il mio lavoro ha anche permesso di evidenziare che la congelazione dei campioni porta ad una variazione minima dei valori di LDL-colesterolo.

Nella Letteratura riguardante l'incidenza del colesterolo totale e del LDL-colesterolo per il rischio di eventi coronarici, viene descritta l'importanza che deve essere data alla misura del LDL-colesterolo per una corretta diagnosi di iperlipidemia e per il monitoraggio delle terapie normo-lipidizzanti. Questo fatto, recentemente sfociato nella definizione di ben precisi limiti comuni per i quattro parametri lipemici (colesterolo, trigliceridi, HDL e LDL) da parte delle maggiori Società Internazionali di cardiologia a livello mondiale, fa capire la necessità di affinare i metodi di analisi così da avere a disposizione dei metodi accurati, precisi e ripetibili per la determinazione di tali parametri.

Dai risultati ottenuti in questo lavoro si può osservare che il "metodo indiretto" tende a "sottostimare" la concentrazione di LDL-colesterolo nel siero. L'osservazione di questa "sottostima" la reputo interessante non solo dal punto di vista analitico: essa permette infatti di stabilire che campioni già oltre il limite patologico di 2.6 mmol/L (metodo diretto) vengono in realtà ancora classificati come "normali" dal metodo sec. Friedewald.

L'errore totale (inaccuratezza + imprecisione) fatto con il metodo indiretto rispetto al metodo diretto è stato calcolato infatti del 16.6 - 17.3%.

I vantaggi analitici e clinici ottenibili attraverso l'introduzione del metodo di misura diretta del LDL-colesterolo vanno naturalmente soppesati anche sul piano economico.

Intanto va detto che il metodo basato sul calcolo non ha costi particolari proprio perché è il risultato di una semplice operazione matematica. L'introduzione del metodo quantitativo "misurato" può essere visto da almeno due punti di vista:

1. Esso non introduce nuovi costi di macchine, personale o metodiche aggiuntive;
2. Il costo per analisi è calcolabile come segue:

Contenuto di un kit di LDL-colesterolo Roche:

R1: 4 \* 60 ml: CHF 951.30

R2: 4 \* 20 ml: CHF 170.10

Calibratore: 4 x 1 ml: CHF 231.30

Per analisi, un Hitachi 912 consuma:

250  $\mu$ l di R1 e 83 $\mu$ l di R2 (volume del campione: 3  $\mu$ l)

Ciò porta ad un calcolo di potenziali 960 campioni di siero al costo di circa 1.17 CHF. A questa cifra vanno aggiunti i costi dei controlli di qualità esterni ed interni. D'altra parte, l'analisi "Colesterolo LDL" (8397.00 dell'Elenco Federale delle analisi) è fatturabile 20 punti per determinazione.

La determinazione diretta introduce dunque dei costi non esistenti finora in ambito EOC.

Oltre ai vantaggi indicati sopra, essa offre però la possibilità al medico di chiedere specificamente solo la determinazione di questo parametro, cosa impossibile nel caso del "metodo indiretto" che richiede la determinazione di tre parametri (al costo di 25 punti). Sta dunque al clinico stabilire il suo comportamento: se richiede un bilancio lipidico completo, sapendo che l'introduzione del nuovo metodo quantitativo Roche comporterà un aumento della fattura; se invece richiede solo la determinazione del parametro LDL-colesterolo la spesa diminuirà.

A sua volta, ciò mi porta a dire che l'approccio del medico potrebbe quindi diventare più selettivo e, d'altra parte, a pensare che in futuro la posizione già esistente nell'Elenco Federale delle analisi "blocco dei lipidi" (8614.00, 25 punti) possa essere ampliata e comprendere anche questa analisi così importante per la diagnosi e la terapia delle iperlipidemie.

In conclusione, vorrei affermare che il presente lavoro ha permesso di verificare che un metodo di determinazione diretto è sicuramente più attendibile di un metodo indiretto basato su parametri "indiretti" e che subisce l'influsso di diversi fattori di disturbo. Questo mi porta a concludere che, vista l'attendibilità e la "buona" economicità della determinazione del LDL-colesterolo Roche, i laboratori dell'Ente Ospedaliero Cantonale dovrebbero usare questo metodo in futuro per offrire una migliore qualità di risultati ai medici.

# ALLEGATI

## I LIPIDI

Nell'organismo umano i lipidi (grassi) sono componenti strutturali delle membrane cellulari, costituiscono una forma di immagazzinamento di energia e sono precursori di molte molecole essenziali.

I lipidi sono costituiti da lunghe catene di idrocarburi e sono insolubili in acqua. Vengono classificati in tre gruppi principali:

- **Lipidi semplici**  
Trigliceridi (glicerolo + acidi grassi)
- **Lipidi composti**  
Fosfolipidi e lipoproteine
- **Lipidi derivati**  
Colesterolo

### **Lipidi semplici:**

Sono costituiti principalmente da trigliceridi, i grassi più rappresentati nell'organismo. La molecola dei trigliceridi risulta dal legame tra il glicerolo e gli acidi grassi.

Gli acidi grassi sono costituiti da un gruppo carbossile seguito da una catena di atomi di carbonio lineare legata ad atomi di idrogeno.

Vengono detti saturi quando presentano legami semplici (-C-C), monoinsaturi quando hanno un doppio legame (-C=C-) e polinsaturi quando hanno più doppi legami.

Gli acidi grassi in natura non si presentano quasi mai in forma libera, ma sono sempre legati per formare lipidi semplici o composti, come negli alimenti dove si trovano solo sottoforma di trigliceridi.

### **Lipidi composti:**

I fosfolipidi contengono molecole di acidi grassi legate ad un gruppo fosforico e ad una base azotata. Per la loro maggiore solubilità facilitano il trasporto degli acidi grassi e formano le membrane cellulari.

I lipidi sono insolubili in ambiente acquoso per cui necessitano di apoproteine che fungono da *carriers*, formando le lipoproteine.

### **Lipidi derivati:**

Contengono sostanze derivate da lipidi semplici e complessi. Il più noto è il colesterolo.

### **Funzione dei lipidi nell'organismo:**

- Riserva energetica
- Protezione meccanica per alcuni organi
- Strato isolante dal punto di vista termico<sup>9</sup>

## **Assorbimento intestinale dei lipidi:**

### Emulsificazione:

Nel tratto gastro-intestinale porta alla digestione dei lipidi con formazione, nel duodeno, di micelle miste. Esse sono composte da acidi (sali) biliari, fosfolipidi, lipidi neutri, vitamine liposolubili e colesterolo esogeno.

Nel digiuno, dopo essere stata digerita, la componente alimentare viene assorbita mentre gli acidi biliari vengono riassorbiti a partire dall'ileo.

### Digestione: enzimi lipolitici pancreatici

La lipasi degrada i trigliceridi a lunga catena a monoacilgliceroli e ad acidi grassi. La fosfolipasi A2 stacca l'acido grasso in posizione 2 dei fosfolipidi. La colesterolo esterasi idrolizza gli esteri del colesterolo.

### Assorbimento

Acidi grassi liberi, monoacilgliceroli, lisofosfolipidi, colesterolo libero e trigliceridi a catena corta (10 C) vengono assorbiti.

### Ri-esterificazione:

I trigliceridi vengono risintetizzati nelle cellule intestinali.

### Chilomicroni:

I trigliceridi neosintetizzati vengono trasportati al fegato mediante chilomicroni.

### Trasporto:

I chilomicroni entrano nel sistema linfatico e raggiungono i tessuti periferici e il fegato.

I trigliceridi a catena corta raggiungono il fegato attraverso la circolazione portale.

### Utilizzazione:

A livello tissutale i trigliceridi vengono idrolizzati da specifiche lipasi lipoproteiche.

## **Sistema di trasporto dei lipidi alimentari:**

I chilomicroni sintetizzati dalle cellule dell'epitelio intestinale vengono immessi nel sistema linfatico, trasportando i trigliceridi ai tessuti. I Remnants (residui) dei chilomicroni, composti colesterolo di origine alimentare e trigliceridi, vanno al fegato.

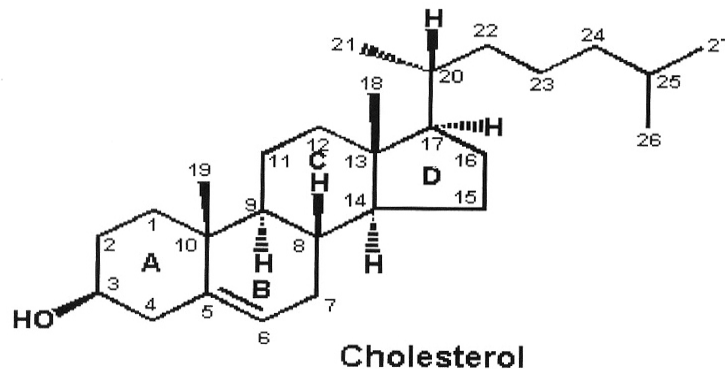
## **Sistema di trasporto dei trigliceridi epatici.**

Il fegato sintetizza trigliceridi e li incorpora nelle VLDL che li rilasciano ai tessuti periferici. Le VLDL si trasformano IDL e queste in LDL.<sup>10</sup>

## IL COLESTEROLO

Il colesterolo è un componente fondamentale delle membrane biologiche, nonché precursore degli ormoni steroidei e degli acidi biliari.

Sia il colesterolo alimentare che quello risintetizzato nelle cellule sono trasportati in circolo dalle lipoproteine.



### Biosintesi del colesterolo:

Poco meno della metà del colesterolo deriva dalla nuova sintesi, il resto è di origine alimentare. Circa il 10% è sintetizzato dagli epatociti e il 15% dalle cellule intestinali.

La sintesi del colesterolo avviene a livello citoplasmatico a partire dall'acetil-CoA.

- L'acetil-CoA è generato nei mitocondri e trasportato nel citoplasma in forma di citrato
- Dall'acetil-CoA si forma il 3-idrossi-3-metil glutaril-CoA (HMG-CoA)
- L'HMG-CoA viene trasformato in mevalonato
- Il mevalonato è convertito in 5-pirofosfomevalonato, che decarbossila a isopentenil pirofosfato (IPP)
- L'IPP è trasformato in geranilpirofosfato
- Il geranilpirofosfato in farnesilpirofosfato
- Dal farnesilpirofosfato viene formato lo squalene
- Lo squalene è trasformato per ciclizzazione in lanosterolo
- Alla fine attraverso una lunga serie di reazioni, il lanosterolo è convertito in colesterolo

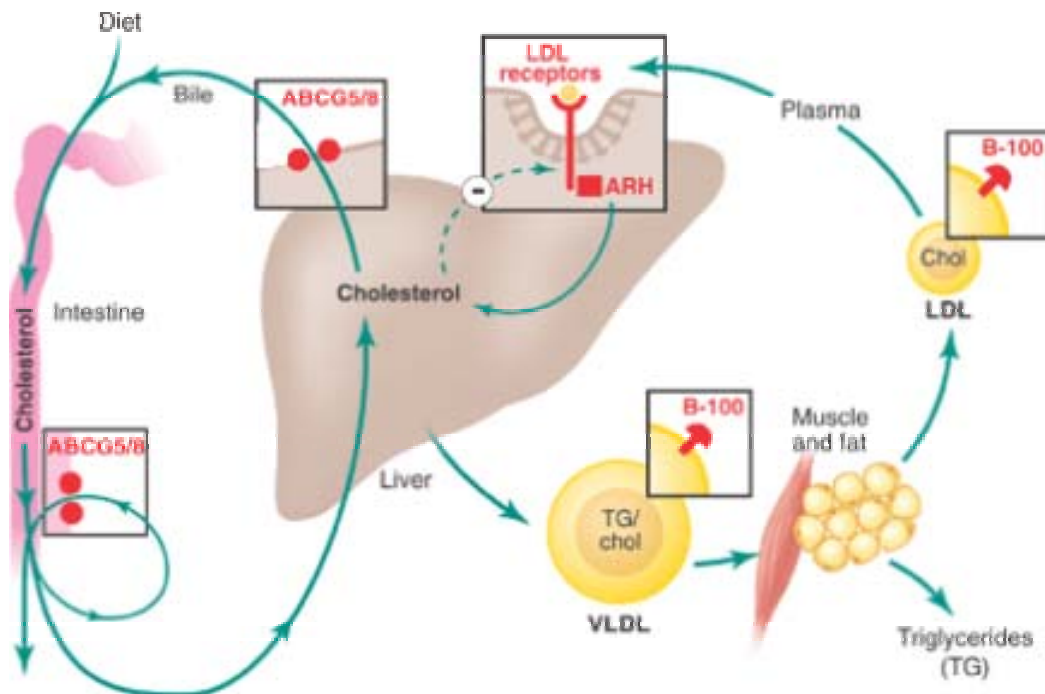
### Regolazione della sintesi del colesterolo:

La sintesi del colesterolo è influenzata dai livelli di colesterolo introdotto con la dieta ed è regolata attraverso tre meccanismi:

1. Regolazione dell'attività e dei livelli dell'HMG-CoA reduttasi
2. Esterificazione del colesterolo libero intracellulare in eccesso per mezzo dell'enzima acil-CoA: colesterolo aciltransferasi (ACAT).
3. Regolazione dei livelli plasmatici del colesterolo attraverso LDL e HDL.

## Trasporto del colesterolo:

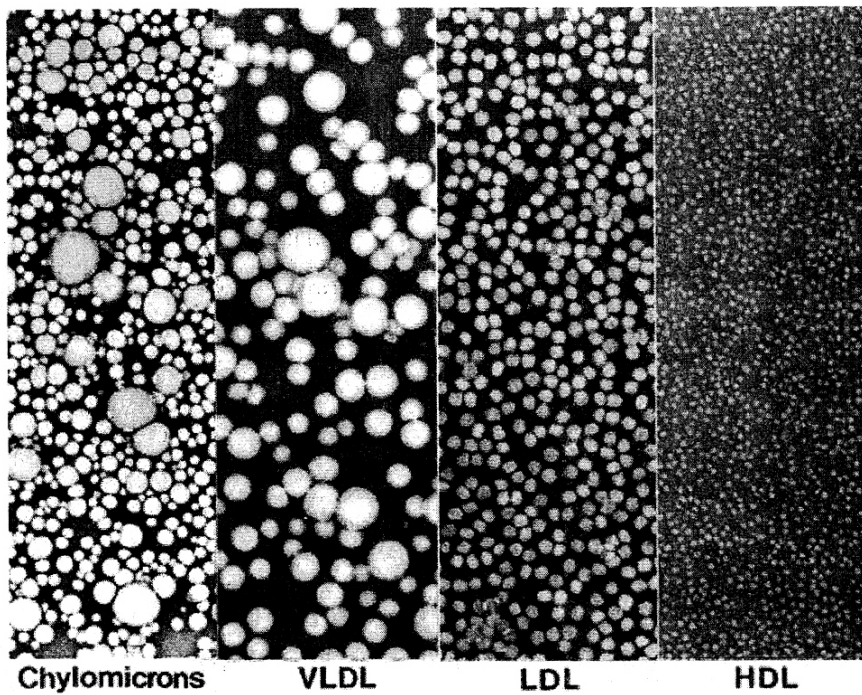
- Il colesterolo esogeno è trasportato nel plasma dall'intestino al fegato sotto forma di esteri associati ai chilomicroni
- Il colesterolo è trasportato agli organi associato alle LDL.
- Il fegato sintetizza le VLDL che si trasformano in circolo in LDL in seguito alla demolizione dei trigliceridi operata dalle lipoprotein lipasi
- Il colesterolo delle membrane plasmatiche può essere acquisito dalle HDL, esterificato ad opera dell'enzima LCAT e trasportato alle VLDL e LDL. Le HDL lo riportano al fegato da cui verrà escreto nella bile come colesterolo libero o in forma di sali biliari.<sup>11</sup>



## LIPOPROTEINE

Lipoproteine separate dal plasma utilizzando l'ultracentrifugazione e fotografate con microscopio elettronico. Le lipoproteine sono visualizzate su sfondo nero.

Queste foto sono state preparate da Robert Hamilton, Ph.D. del *Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco*.<sup>13</sup>



Chylomicrons

VLDL

LDL

HDL

X 60,000

X 180,000

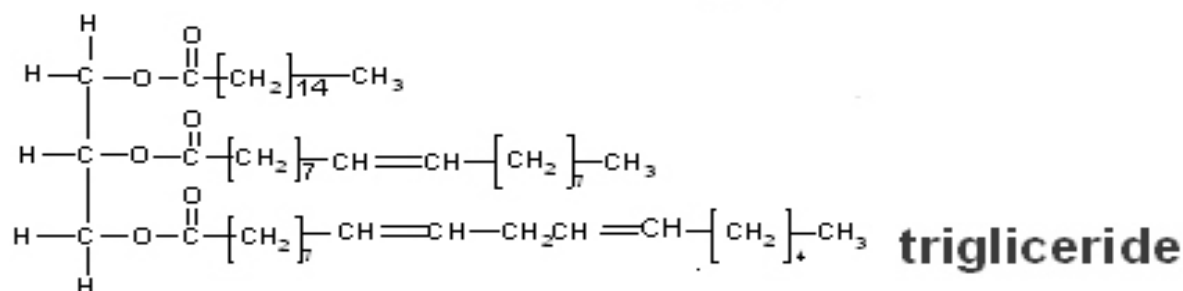
X 180,000

X 180,000



## I TRIGLICERIDI

Sono formati da glicerolo esterificato e acidi grassi. I Trigliceridi sono la principale causa di accumulo degli acidi grassi e costituiscono la maggiore riserva energetica del corpo umano.<sup>14</sup>



15

## I CHILOMICRONI

Sono le lipoproteine meno dense e più voluminose, la loro composizione in lipidi rispecchia quella ingerita con il pasto: trigliceridi, fosfolipidi e colesterolo.

Vengono sintetizzati dalle cellule epiteliali dell'intestino e servono per trasportare i trigliceridi alimentari ai tessuti ed ai muscoli e il colesterolo alimentare al fegato. Nel circolo ematico i trigliceridi presenti nei chilomicroni vengono scissi in monoacilgliceroli, glicerolo e acidi grassi dalle lipasi lipoproteiche, per essere assorbiti dalle cellule.

I chilomicroni rimanenti, dopo la scissione dei trigliceridi, vengono eliminati dal fegato.

A digiuno non sono presenti nel circolo ematico.<sup>16</sup>

## VLDL

Sono lipoproteine a bassissima densità e sono sintetizzate dal fegato. Il loro compito è di trasportare i trigliceridi di sintesi epatica, dal fegato ai tessuti, in particolare a quello adiposo che li immagazzina.

Oltre ai trigliceridi contengono colesterolo libero ed esterificato, fosfolipidi e l'apoproteina B-100 identica a quella delle LDL.

Le VLDL catabolizzate perdono trigliceridi, che si legano alle apo C e vengono trasferiti sulle HDL.

Le VLDL sono così trasformate in IDL che verranno catabolizzate allo stesso modo diventando LDL.<sup>17</sup>

## HDL

Sono sintetizzate nel fegato e nell'intestino tenue come particelle discoidali ricche in proteine. Le HDL sono convertite in particelle sferiche di HDL<sub>3</sub> e HDL<sub>2</sub> in seguito all'accumulo di esteri di colesterolo.

Il colesterolo libero prelevato dai tessuti o presente nei remnants dei chilomicroni e delle VLDL viene esterificato dall'LCAT rendendo possibile la trasformazione in particelle sferiche.

Le HDL, in seguito, vengono endocitate dal fegato.

Il ruolo principale delle HDL è quello di sottrarre colesterolo libero dai tessuti periferici, in particolare dalle pareti dei vasi sanguigni, esterificarlo e portarlo al fegato dove viene eliminato attraverso la bile.<sup>18</sup>

### **Trasporto inverso del colesterolo:**

Meccanismo attraverso il quale un eccesso di colesterolo viene rimosso dai tessuti.

- Il fegato produce delle particelle vuote di HDL che incorporano il colesterolo prelevandolo dalle membrane cellulari e lo esterificano (LCAT: Lecitina-colesterolo aciltransferasi).
- Gli esteri del colesterolo vengono in parte trasferiti alle LDL che provvedono insieme alle HDL a riportare il colesterolo al fegato.<sup>10</sup>

## LE IPERLIPOPROTEINEMIE

Sono malattie del metabolismo lipidico che si manifestano con un patologico aumento delle concentrazioni delle lipoproteine plasmatiche.

Queste concentrazioni subiscono variazioni fisiologiche in rapporto alla razza, al sesso, all'età e alle abitudini dietetiche.

L'aumento delle lipoproteine comporta anche un aumento dei lipidi (colesterolo, trigliceridi) del plasma.

L'iperlipidemia può essere primaria, provocata da un'alterazione propria del metabolismo lipidico, oppure secondaria causata da malattie come l'ipotiroidismo, la colestasi, la sindrome nefrosica, farmaci estroprogestinici e altro.

L'interesse clinico delle iperlipidemie è dovuto alla ormai conosciuta conseguenza, ossia la vasculopatia aterosclerotica (soprattutto la cardiopatia ischemica).

L'incidenza di queste complicazioni è direttamente proporzionale alla concentrazione di LDL-C nel siero e inversamente proporzionale alla concentrazione di HDL-C.

Nel soggetto normale attraverso il recettore per le apo-B100 vengono degradate circa 1/3 delle LDL circolanti, mentre un'altra piccola quantità viene eliminata con meccanismo indipendente nel sistema reticolo-endoteliale.

Quando l'attività dei recettori non è sufficiente a mantenere normale la concentrazione delle LDL nel siero si verifica un aumento compensatorio di altre vie cataboliche che però conduce al deposito di colesterolo e alla formazione di cellule schiumose e di depositi colesterinici.

Un'altra notevole scoperta è stata quella di osservare in pazienti con compromissione vascolare aterosclerotica livelli sierici più elevati di lipoproteina Lp(a).

Questa proteina è costituita da una molecola di LDL alla quale l'apoproteina (a) è legata all'apo-B100 con ponti disolfuro.

La Lp(a) ha alcuni aspetti strutturali simili a quelli del plasminogeno, non è però in grado di attivare la fibrinolisi. Questo fatto la porta ad essere in competizione con il fibrinogeno riducendo la fibrinolisi ed essere quindi pro-aterogena.

Si conosce ancora poco di questa proteina. Si conoscono i vari isomeri e si sa che è sintetizzata nel fegato ma non come viene eliminata.

## **Classificazione delle iperlipoproteinemie secondo Fredrickson:**

Un aumento del colesterolo nel siero è quasi sempre dovuto a un incremento delle LDL, mentre un aumento dei trigliceridi è causato da un incremento delle VLDL.

### Fenotipo I (chilomicronemia):

Grave ipertrigliceridemia che può essere dovuta a un deficit di lipasi lipoproteica o a un deficit del suo cofattore (apo C-II).

### Fenotipo IIa (ipercolesterolemia):

E spesso dovuta alle abitudini alimentari in soggetti predisposti (ipercolesterolemia poligenica) mentre in pochi casi è provocato da un deficit dei recettori per apo-B, E (ipercolesterolemia famigliare).

### Fenotipo IIb (ipercolesterolemia con ipertrigliceridemia):

Forma rara dovuta alla presenza di una lipoproteina anomala ("beta VLDL") che causa ipertrigliceridemia con ipercolesterolemia. Questo fenotipo compare in soggetti con disbetalipoproteinemia (omozigoti per apo E-2) nei quali si associa un'altra dislipidemia, fattori dietetici o metabolici.

### Fenotipo III (iperlipoproteinemia famigliare):

Forma rara a trasmissione autosomica recessiva, dovuta ad una mutazione del gene che codifica la sintesi dell'apo E. La sostituzione aminoacidica dell'apo E causa una meno efficiente captazione epatica dei chilomicroni e delle IDL.

### Fenotipo IV (ipertrigliceridemia):

Spesso provocato dalla dieta (eccesso di alcool) o da una malattia genetica (ipertrigliceridemia famigliare o iperlipidemia famigliare).

### Fenotipo V:

Grave ipertrigliceridemia (eccesso di VLDL e chilomicroni) provocata da eccessi alimentari o disturbi metabolici (diabete scompensato) in soggetti affetti da ipertrigliceridemia famigliare.<sup>17</sup>

## **L'ATEROSCLEROSI**

L'aterosclerosi è causata da un eccesso di LDL che l'organismo non riesce a metabolizzare, di conseguenza i macrofagi e le cellule muscolari lisce delle pareti arteriose assorbono questo eccesso, sovraccaricandosi di colesterolo esterificato, formando le tipiche placche ateromatose.

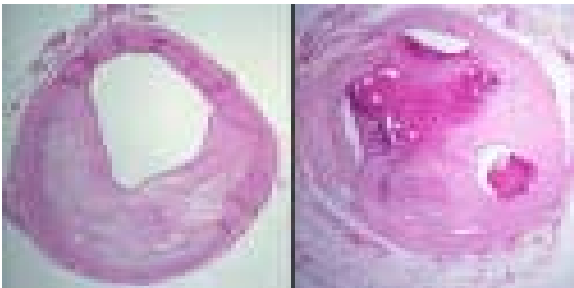
L'ispessimento della parete riduce il lume dei vasi e irrigidisce la parete vasale, che perde la propria elasticità. Il flusso sanguigno subisce rallentamenti e, se il restringimento è notevole, le arterie possono occludersi completamente, bloccando la circolazione. Spesso l'occlusione è dovuta alla formazione di trombi o coaguli in corrispondenza del restringimento, dove il sangue circola con maggiore difficoltà.

Questo processo si sviluppa molto lentamente e inizia precocemente, fin dai 20 anni, senza alcun sintomo o disturbo per decenni.<sup>17</sup>

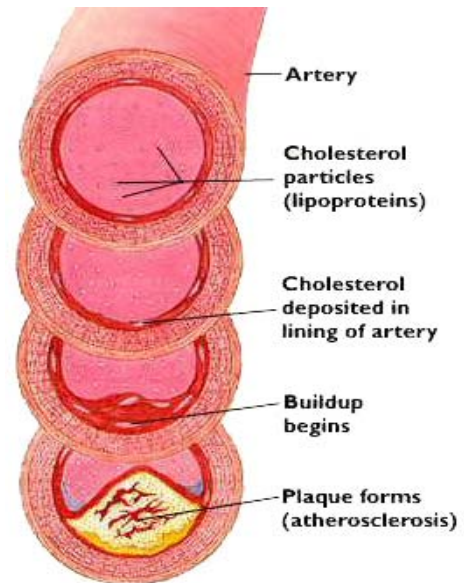
Generalmente vengono colpite le arterie coronarie portando ad angina ed infarto, le arterie cerebrali con ictus, le arterie renali con insufficienza renale, le arterie delle gambe con disturbo che si manifesta camminando, le arterie retiniche con disturbi della vista.

I fattori di rischio più importanti che possono comportare l'insorgere della malattia sono:

- fattore ereditario
- aumento patologico di colesterolo HDL
- ipertensione arteriosa
- fumo
- diabete<sup>19</sup>



<http://medlib.med.utah.edu/WebPath/ipeg5/CV119.jpg>



[www.ppsinc.org/images/cholplaque.jpg](http://www.ppsinc.org/images/cholplaque.jpg)

## LA IPOBETALIPOPROTEINEMIA

La ipobetalipoproteinemia è una malattia autosomica codominante, il difetto genetico coinvolge il gene per l'Apo-B100. Molte sono mutazioni *non sense* che portano alla produzione di una proteina apoB troncata; fin'ora ne sono state descritte venticinque.

Le persone eterozigote presentano livelli di colesterolo LDL e apoB approssimativamente dimezzate rispetto alle concentrazioni normali, mentre le persone omozigote presentano concentrazioni plasmatiche di apoB basse o assenti.

Le mutazioni genetiche portano ad alterazioni nello splicing dell'RNA oppure generazioni di peptidi non funzionali, vi è una minore sintesi di apolipoproteine come le LDL che porta ad una minore quantità di colesterolo circolante, inferiore ai livelli normali.

Negli eterozigoti la malattia è asintomatica, negli omozigoti si presenta con malassorbimento dei grassi alimentari a livello intestinale.<sup>20</sup>

Allegato 9

### Metodica LDL:

*LDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation (Colesterolo LDL, senza pretrattamento), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.*

- C.f.a.s Lipids
- Precipath HDL/LDL-C
- Precinorm L

## PROGRAMMAZIONE DEL METODO LDL-C PLUS 2<sup>nd</sup> GENERATION SU HITACHI 912

Cancellazione test del FE (non utilizzato):

Selezionare UTILITÀ nella barra principale.

Aprire **Applicazioni** e restare in **Analisi**. Andare sotto **Selezionare test** e cercare un test in disuso da sostituire con il nuovo metodo. Cliccare **Elimina** e confermare l'operazione.

Inserire il nuovo metodo:

Sempre sotto **Analisi** vado in **Leggi metodica** e con il lettore ottico leggo i barcode (presenti nella scatola dei reagenti) e **OK**.

Andare sotto **Range**. Selezionare il test **LDLC2** e mettere in **Unità** mmol/l e fare **Salva in memoria** e **OK**.

In **Analisi** :

**Diluente:** 00301 99

**Decremento:** **Classe 1** appaiono i numeri 50, 9, 250 **Classe 2** 0, 0, 0

In **Calibrazione:**

**Selezionare test:** LDLC2

**Al cambio lotto:** lineare

**tanica:** bianco

**Limite doppietta:** 10-100

**Intervalli di sensibilità:** -99999 / 99999

**Salva in memoria.**

In **Range:**

**Intervallo controllo:** 1000

**Unit:** mmol/l

**Situazione:** Attiva

**Valori normali:**

Maschi		Femmine	
0	0	0	0
0	0	0	0
3.37	4.12	3.37	4.12

**Età:** 0

Da 0 anni

**Linearità classe 1:** 0.077 - 14.2

**Salva in memoria.**

Andare in **CALIBRATORI** della barra principale e in **Insallazione**.

**Inserisci.**

**Posizione:** 1

**Nome:** Nacl

**Codice:**400

**Lotto:** 03014

**Scadenza:** 08/03

**Aggiungi**

**Ok**

**Posizione:** 23

**Nome:** LDLC2

**Codice:** 424

**Lotto:** 163959

**Scadenza:** 04/03

**Aggiungi.**

Sotto **Installazione** evidenziare NaCl in pos.1 e fare **Concentrazioni**.

**STD (1) Conc. : 0.00 Aggiorna.**

Evidenziare LDLC2 in po.23 e **Concentrazioni**.

**STD (2) Conc.: 3.12 Aggiorna.**

**Chiudi.**

In **Calibrazione** evidenziare la riga dell' **LDLC2**

**Calibra.**

Evidenziare **Lineare**

Andare in **CONTROLLI** della barra principale

**Installazione.**

Evidenziare la casella nr. 8 e Inserisci

• **Classe 1**

**Nome:** LDLC2 Pn

**Lotto:** 00158787

**Scadenza:** 05/06

**Posizione:** C8

**Memorizza.**

Evidenziare LDLC2 e **Attiva test:**

Selezionare LDLC2 : **Attivo**

**Memorizza**

**Chiudi.**

**Giornaliero, Media: 2.56**  
**SD: 0.20**

**Mensile, Media: 2.56**  
**SD: 0.20**

**Memorizza.**

Andare in CALIBRATORI e fare Calibra ora.

Aggiungere i reattivi.

Nell'apparecchio inserire nel piatto interno dei controlli il Precinorm L in posizione C8 e il calibratore in posizione S23.

In posizione 51 nel piatto delle urgenze mettere il Precipath HDL/LDL-C e programmarlo come un'urgenza.

**Pre-Avvio: 1 - 1 Start**

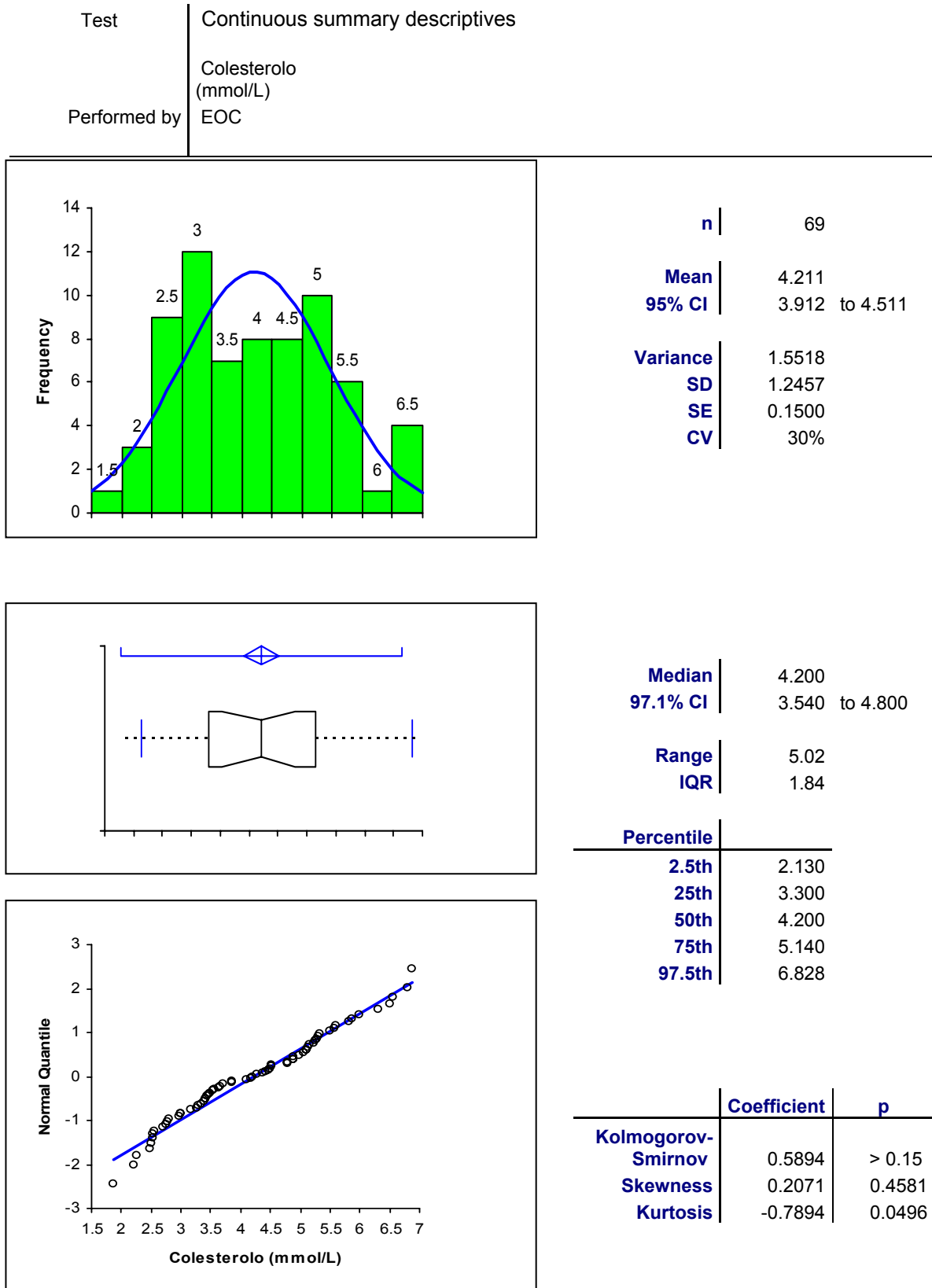
**La calibrazione non deve dare errori e i controlli dare un risultato vicino al valore medio fornito dalla metodica.**

**Tutti i valori inseriti con la programmazione son dati dalla metodica *LDL-C plus 2<sup>nd</sup> generation (Colesterolo LDL, senza pretrattamento), Roche/Hitachi 912, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim.***



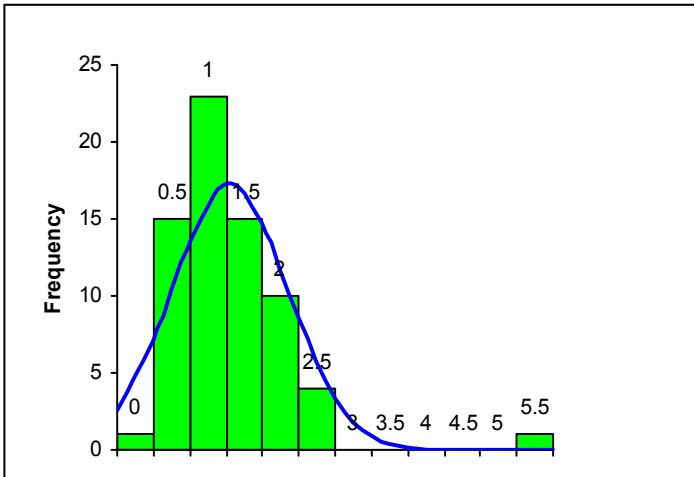
## GRAFICI COMPLEMENTARI AI GRAFICI PRESENTATI NEL LAVORO

**Grafico 1**

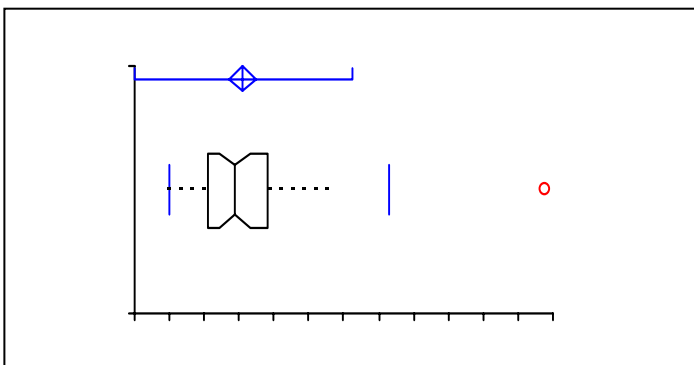


## Grafico 2

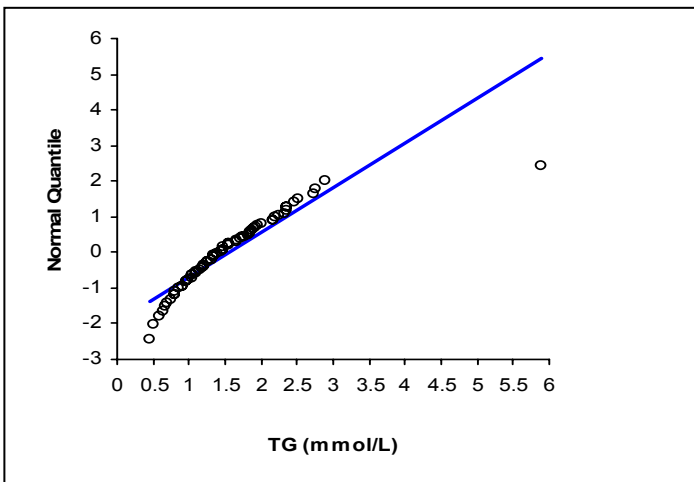
Test	Continuous summary descriptives
Performed by	Trigliceridi (mmol/L) EOC



<b>n</b>	69
<b>Mean</b>	1.556
<b>95% CI</b>	1.365 to 1.747
<b>Variance</b>	0.6330
<b>SD</b>	0.7956
<b>SE</b>	0.0958
<b>CV</b>	51%



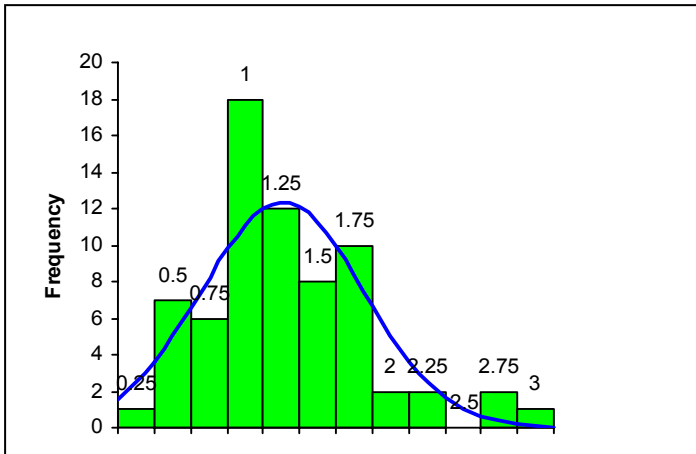
<b>Median</b>	1.450
<b>97.1% CI</b>	1.210 to 1.670
<b>Range</b>	5.43
<b>IQR</b>	0.85
<b>Percentile</b>	
<b>2.5th</b>	0.498
<b>25th</b>	1.050
<b>50th</b>	1.450
<b>75th</b>	1.900
<b>97.5th</b>	3.648



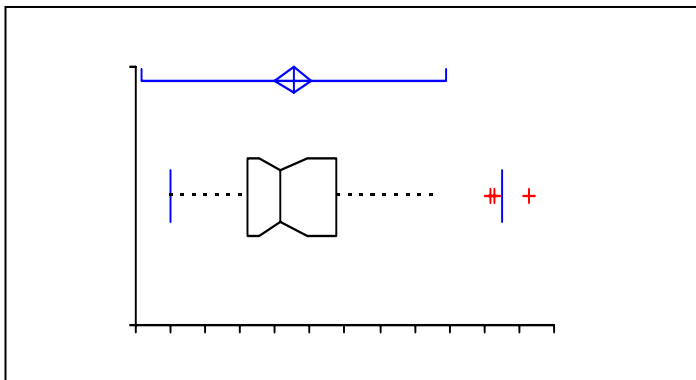
	Coefficient	p
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.7211	> 0.15
<b>Skewness</b>	2.4855	<0.0001
<b>Kurtosis</b>	11.7796	<0.0001

### Grafico 3

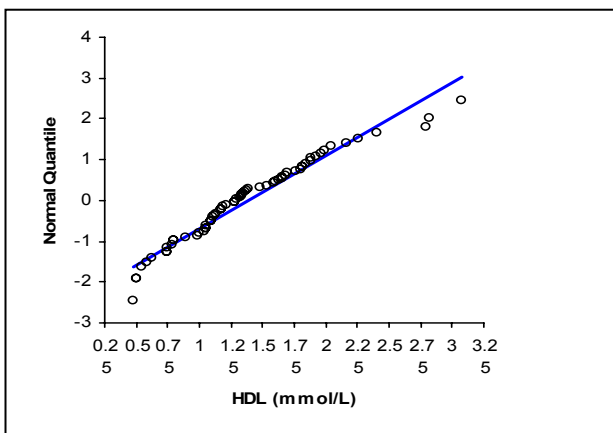
Test	Continuous summary descriptives
Performed by	EOC



<b>n</b>	69
<b>Mean</b>	1.379
<b>95% CI</b>	1.245 to 1.512
<b>Variance</b>	0.3097
<b>SD</b>	0.5565
<b>SE</b>	0.0670
<b>CV</b>	40%



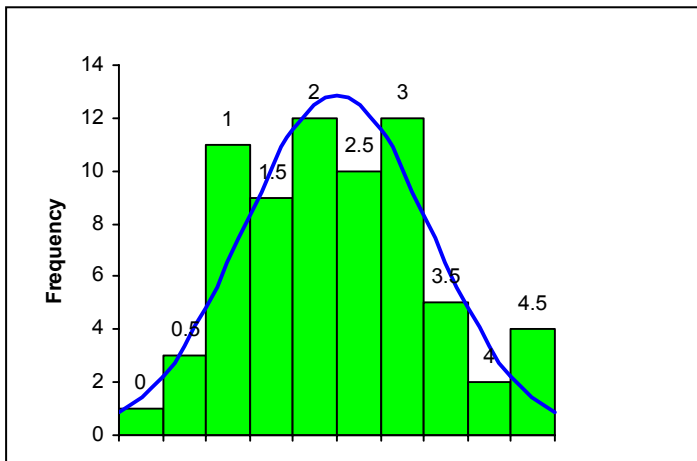
<b>Median</b>	1.280
<b>97.1% CI</b>	1.130 to 1.480
<b>Range</b>	2.59
<b>IQR</b>	0.64
<b>Percentile</b>	
<b>2.5th</b>	0.503
<b>25th</b>	1.050
<b>50th</b>	1.280
<b>75th</b>	1.690
<b>97.5th</b>	2.883



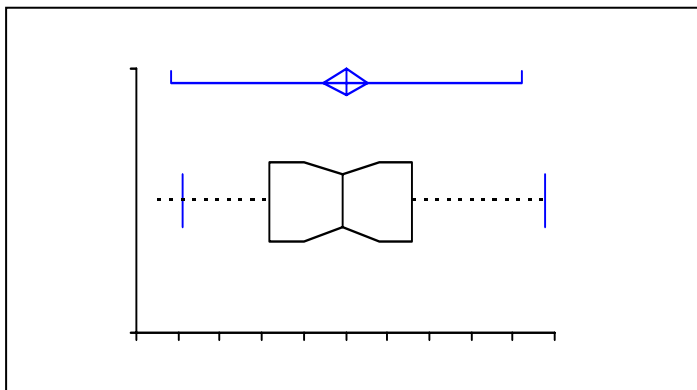
	Coefficient	p
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.4535	> 0.15
<b>Skewness</b>	0.8001	0.0085
<b>Kurtosis</b>	0.8138	0.1672

### Grafico 4

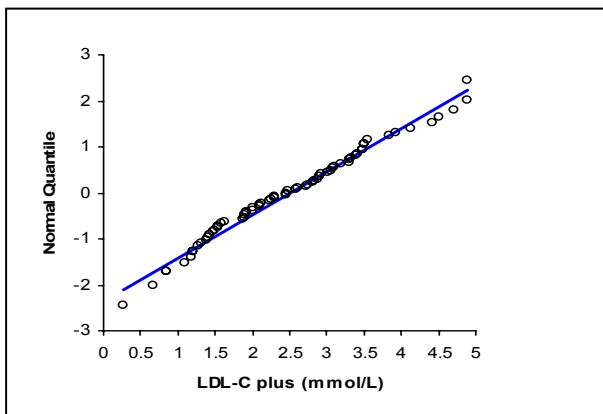
Test	Continuous summary descriptives
Performed by	LDL-C plus (mmol/L) EOC



<b>n</b>	69
<b>Mean</b>	2.503
<b>95% CI</b>	2.246 to 2.760
<b>Variance</b>	1.1425
<b>SD</b>	1.0689
<b>SE</b>	0.1287
<b>CV</b>	43%



<b>Median</b>	2.460
<b>97.1% CI</b>	2.010 to 2.910
<b>Range</b>	4.63
<b>IQR</b>	1.72
<b>Percentile</b>	
<b>2.5th</b>	0.560
<b>25th</b>	1.580
<b>50th</b>	2.460
<b>75th</b>	3.300
<b>97.5th</b>	4.883

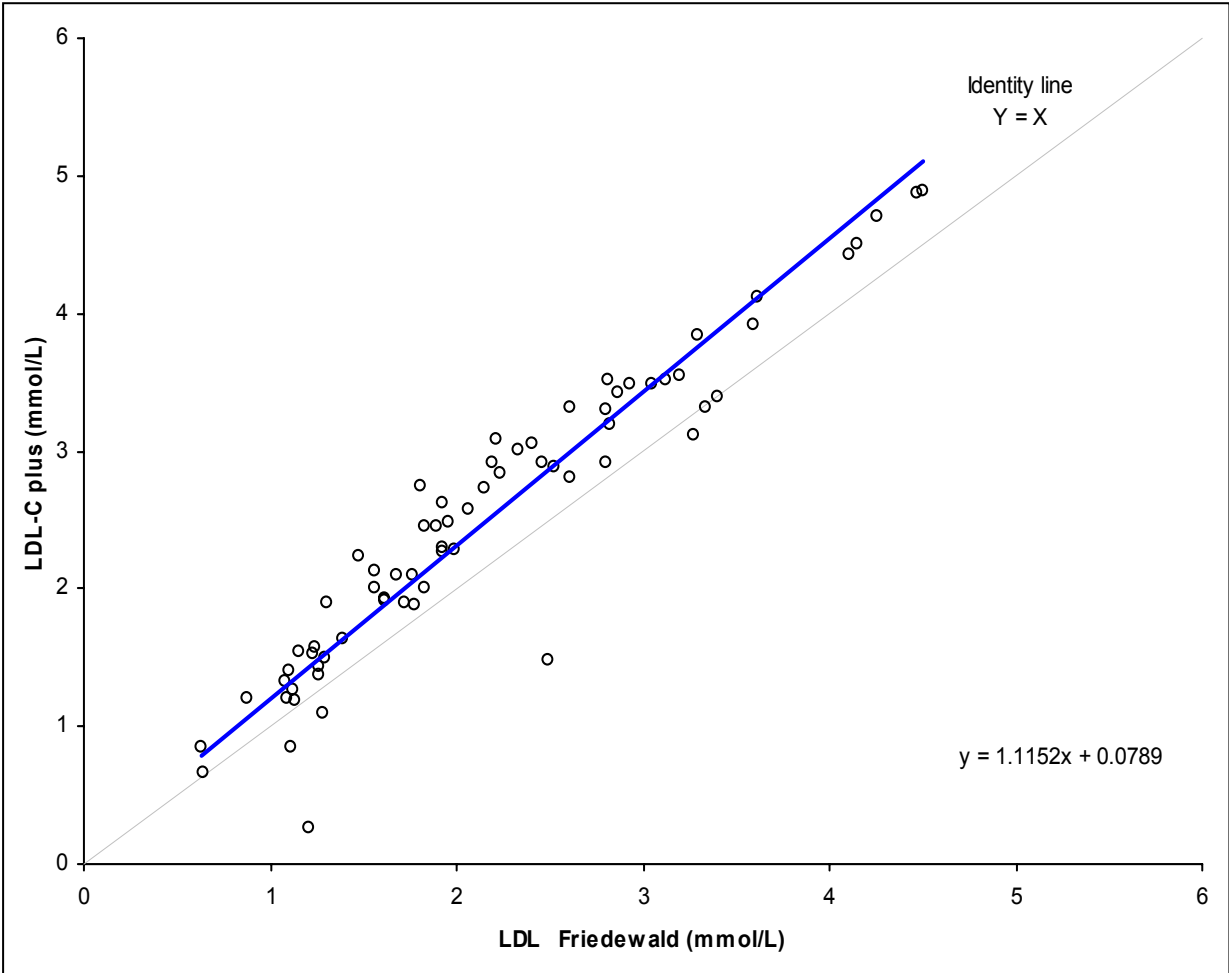


	Coefficient	p
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3127	> 0.15
<b>Skewness</b>	0.2681	0.3391
<b>Kurtosis</b>	-0.4390	0.4314

**Grafico 5**

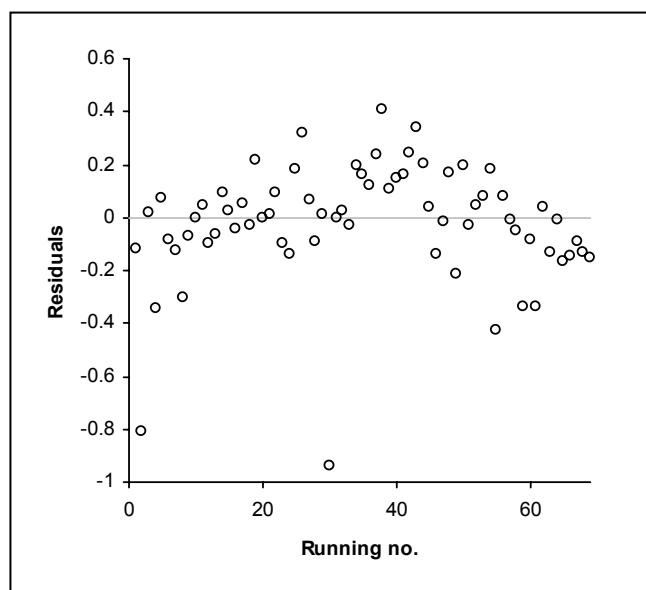
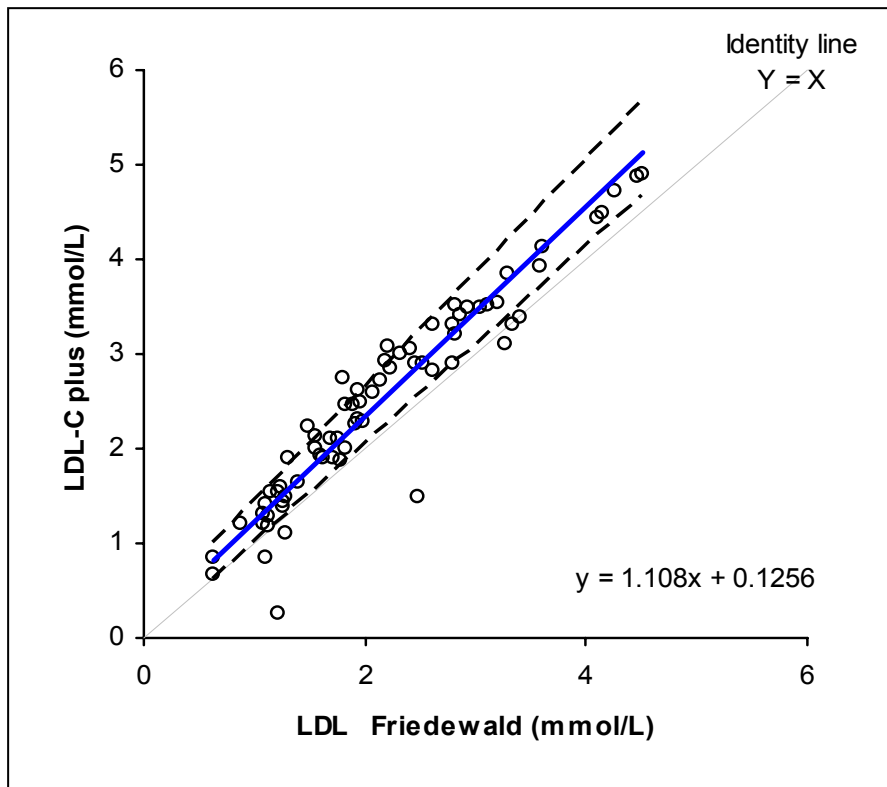
<b>Test</b>	<b>Deming method comparison</b>		
	<b>LDL Friedewald (mmol/L) vs LDL-C plus (mmol/L)</b>		
<b>Performed by</b>	<b>EOC</b>		
<b>n</b>	69		
<b>Imprecision SD</b>	1.0000	1.0000	
<b>Variance ratio</b>	1.0000		
<b>Deming <math>S_{y,x}</math></b>	0.2228		
	<b>Coefficient</b>	<b>SE</b>	<b>95% CI</b>
<b>Intercept</b>	0.0789	0.1038	-0.1282 to 0.2860
<b>Slope</b>	1.1152	0.0437	1.0280 to 1.2024

(proportional bias detected)



**Grafico 6**

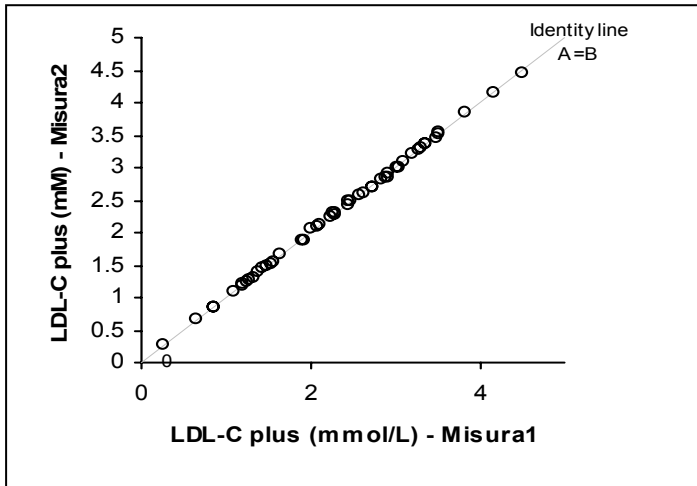
<b>Test</b>	Passing & Bablok method comparison	
	LDL Friedewald (mmol/L) v LDL-C plus (mmol/L)	
<b>Performed by</b>	EOC	
<b>n</b>	69	
	<b>Coefficient</b>	<b>95% CI</b>
<b>Intercept</b>	0.126	-0.052 to 0.249
<b>Slope</b>	1.108	1.047 to 1.200 (proportional bias detected)
<b>Cusum test for linearity - p</b>	< 0.01	(non-linear relationship between X and Y detected)



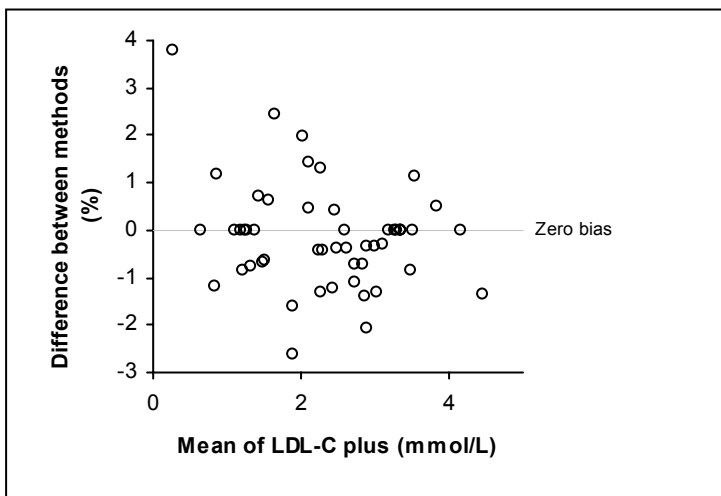
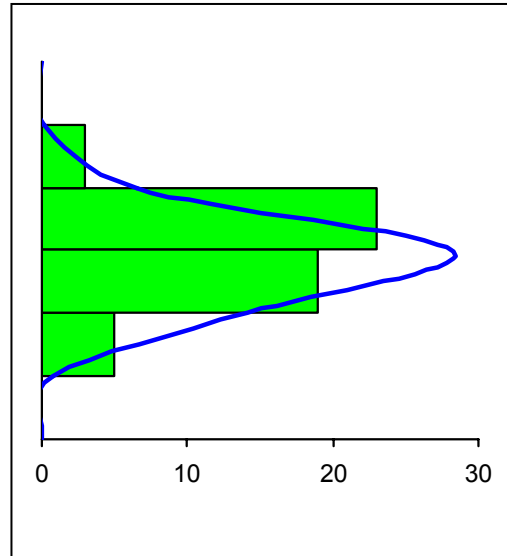
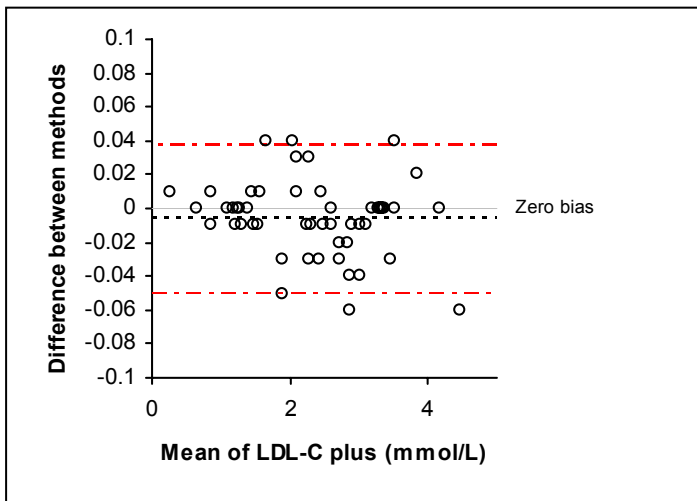
**Grafico 8**

analysed with:  
**Analyse-it +  
 Clinical  
 Laboratory 1.65**

Test | **Bias plots**  
**LDL-C plus (mmol/L): Misura1 vs Misura2**  
 Performed by | **EOC**



<b>n</b>	50		
<b>Bias</b>	-0.006		
<b>95% CI</b>	-0.012	to 0.000	
<b>95% limits of agreement</b>		<b>95% CI</b>	
<b>Lower</b>	-0.050	-0.061	to -0.040
<b>Upper</b>	0.038	0.028	to 0.049



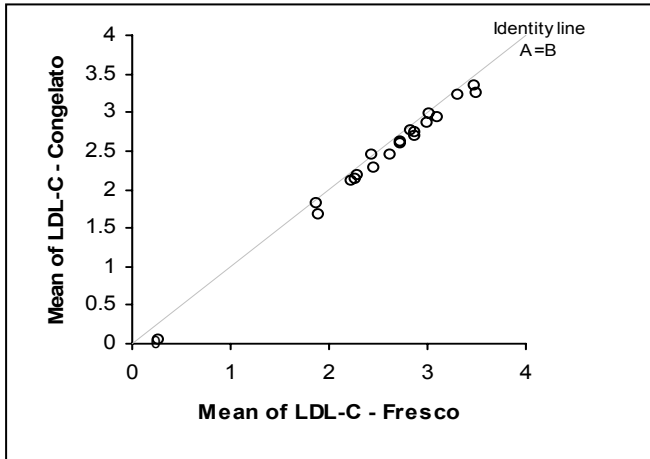
**Grafico 9**

analysed with:  
Analyse-it +  
Clinical  
Laboratory 1.65

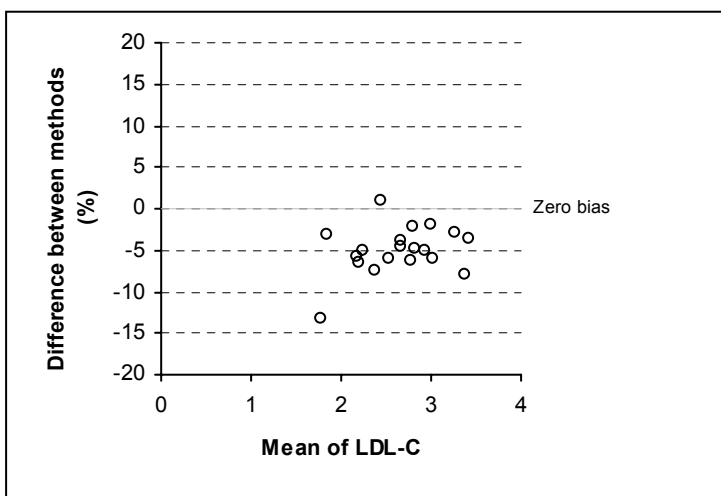
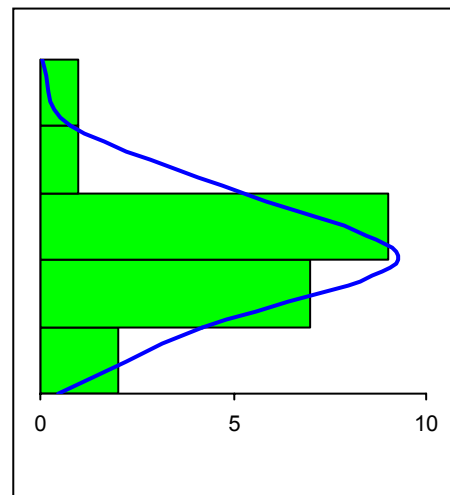
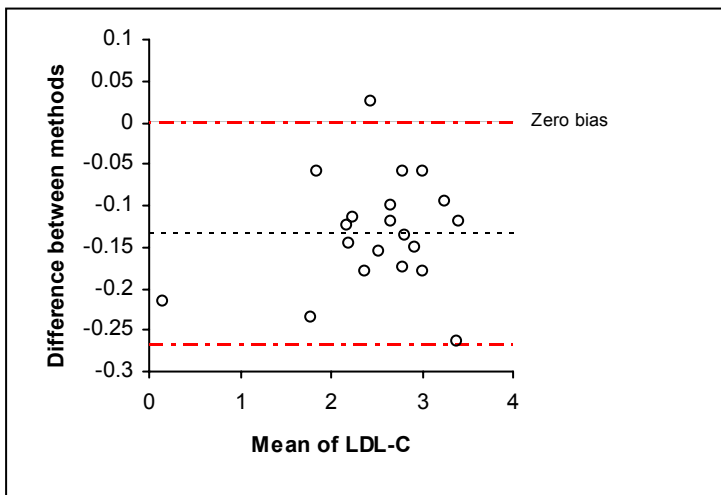
Test | **Bias plots**

**LDL-C: Fresco v Congelato**

Performed by | **EOC**



<b>n</b>	20		
<b>Bias</b>	-0.133		
<b>95% CI</b>	-0.165	to -0.101	
<b>95% limits of agreement</b>		<b>95% CI</b>	
<b>Lower</b>	-0.268	-0.319	to -0.216
<b>Upper</b>	0.001	-0.050	to 0.052

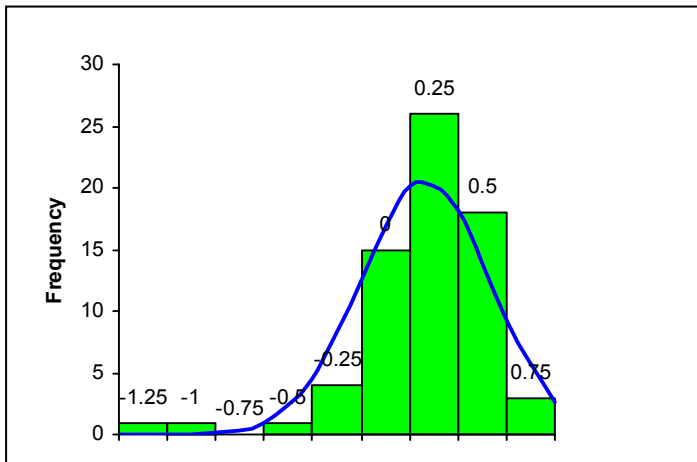




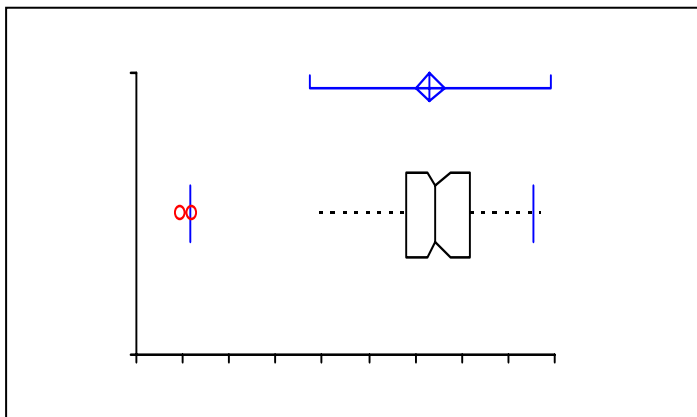
**Grafico 10**

analysed with:  
Analyse-it  
+ General  
1.65

Test | Continuous summary descriptives  
Delta LDL-C - LDL-Fried  
differenza assoluta  
Performed by | EOC

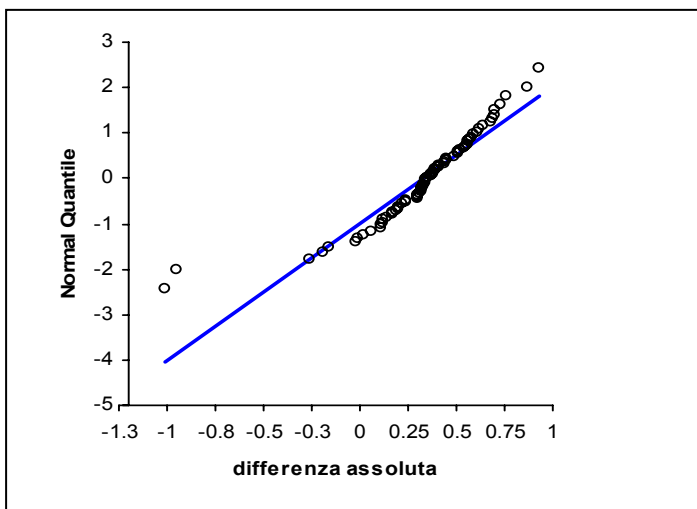


<b>n</b>	69
<b>Mean</b>	0.329
<b>95% CI</b>	0.250 to 0.409
<b>Variance</b>	0.1095
<b>SD</b>	0.3309
<b>SE</b>	0.0398
<b>CV</b>	101%



<b>Median</b>	0.353
<b>97.1% CI</b>	0.312 to 0.435
<b>Range</b>	1.94
<b>IQR</b>	0.35

Percentile	
<b>2.5th</b>	(0.965)
<b>25th</b>	0.198
<b>50th</b>	0.353
<b>75th</b>	0.545
<b>97.5th</b>	0.884



	Coefficient	p
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	1.1896	< 0.01
<b>Skewness</b>	-1.7716	<0.0001
<b>Kurtosis</b>	5.6887	<0.0001

---

## **BIBLIOGRAFIA:**

- <sup>1</sup> <http://bl-msci-007c.ads.iu.edu/c602web/602/c602web/cardio/slide110.htm>
- <sup>2</sup> American Society for Nutritional Science; Symposium: Evolution of Ideas about the Nutritional Value of Dietary Fat (pp. 439S-443S)
- <sup>3</sup> ISS: Pubblicazioni/Notiziario: Dislipidemie genetiche, aterogenesi e malattie cardiovascolari Vol.15-n12(dicembre 2002)
- <sup>4</sup> Lawrence M. Tierney, Jr., Stephen J. McPhee, Maxime A. Papadakis, Current Medical Diagnosis and Treatment; International edition 2002
- <sup>5</sup> Pierpaolo De Feo, Malattie del metabolismo lipoproteico; DIMISEM, Università di Perugia
- <sup>6</sup> C. A. Burtis & E. R. Ashwood; Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry, Fifth Edition (pp.478)
- <sup>7</sup> Nauck et al: Methods For LDL-C with Emphasis on Homogeneous Assays; Clinical Chemistry 48, No. 2, 2002
- <sup>8</sup> Ospedale Civico Lugano:Schede Operative laboratorio
- <sup>9</sup> <http://www.benessere.com/salute/arg00/lipidi.htm>
- <sup>10</sup> Giovanni Togni, Dispense di chimica clinica
- <sup>11</sup> <http://www.med.unibs.it/~marchesi/biotec/slides/colesteolo>
- <sup>12</sup> <http://athena.molbiol.saitma-u.ac.jp/~molbiol/Lec/Lipids/Image/cholQuartet.gif>
- <sup>13</sup> <http://www.ucsf.edu/lipidclinic/lipoproteinems1.htm>
- <sup>14</sup> Gary A. Thibodeau, Kevin T. Patton, Anatomia e fisiologia; III edizione, Casa Editrice Ambrosiana; p.57
- <sup>15</sup> <http://www.med.unibs.it/~rusmati>
- <sup>16</sup> <http://www.med.unibs.it/~marchesi/biotec/slides/lipoproteine>
- <sup>17</sup> <http://www.carloanibaldi.com/terapia/iperlipopr.htm>
- <sup>18</sup> F.Fantini, S.Monesi, S.Piazzini, LA BIOLOGIA: Dalla unitarietà alla diversità dei sistemi viventi; Italo Bovalenta editore;p.618
- <sup>19</sup> [www.aging.it/malanni\\_e\\_malattie/aterosclerosi](http://www.aging.it/malanni_e_malattie/aterosclerosi)
- <sup>20</sup> <http://malattierare.pediatria.unipd.it>

## **ABBREVIAZIONI:**

HDL: lipoproteine ad alta densità  
LDL: lipoproteine a bassa densità  
IDL: lipoproteine a densità intermedia  
VLDL: lipoproteine a bassissima densità  
Chol.: colesterolo  
TG: trigliceridi  
HDL-C: colesterolo HDL  
LDL-C: colesterolo LDL  
EOC: Ente Ospedaliero Cantonale  
EOLAB: Ente Ospedaliero Laboratori  
IC: intervalli di confidenza

---

## **Ringraziamenti:**

Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim, per aver fornito il materiale indispensabile per lo studio.

EOLAB, per la disponibilità di apparecchiature e finanziamenti

Dottor Marco Balerna, per il suo ruolo indispensabile nello svolgimento del lavoro.

Marcello Niosi, per l'aiuto e il sostegno nello svolgimento della parte pratica.

Annette Zuber, per l'aiuto nell'installazione del metodo su Hitachi 912 (Roche).

Laboratoriste/i Laboratorio Ospedale Civico, per la pazienza nei momenti in cui occupavo l'Hitachi 912.

I docenti della SSMT che mi hanno aiutata e sostenuta durante lo svolgimento del lavoro.

A tutti coloro che mi hanno aiutata nella stesura, attuazione, stampa e rilegatura di questo lavoro.