

Valori di colesterolemia nella popolazione di differenti regioni italiane: risultati di una indagine 1999

Carlo Franzini¹, Simona Brambilla¹, Paola Luraschi¹, Elena Tragni², Giovanni Galli², Alberico L. Catapano²

¹Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Istituto di Scienze Biomediche Ospedale L. Sacco

²Università degli Studi di Milano, Facoltà di Farmacia, Istituto di Scienze Farmacologiche

Con la collaborazione di: N. Pansini, V. Brescia, L. Loidice (Bari); A. Crippa, A. Vernocchi (Bergamo); F. Pagani, M. Panteghini (Brescia); G. Nubile, G. Angelini, C. Romano (Chieti); P. Bonini, F. Ceriotti (Milano); C. Brambilla (Legnano, Milano); L. Prencipe, A. Marocchi (Milano); F. Salvatore, L. Sacchetti (Napoli); S. Micciché, C. Vetro (Palermo); P. De Sole (Roma); R. Pagni, A. Gariboldi, A. Craegli (Torino); M.S. Graziani (Verona)

Per conto del: Gruppo di Studio SIBioC "Fattori di rischio cardiovascolare"

ABSTRACT

Cholesterolaemia in the population of different Italian Regions: results from a 1999 survey

The aim of this work was to assess the frequency of serum cholesterol values exceeding stated decision limits in the Italian population, and to verify if differences in the serum cholesterol values distribution still exist among the Italian Regions. 13 laboratories from 10 Regions extracted from about 3000 to about 50000 cholesterol values from their information system, irrespectively of the physiopathological conditions of the individuals. A total of 125799 cholesterol were processed to yield the original frequency distributions (whole population and different Regions), from which a "gaussian portion" was extracted by applying the Batthacharya's approach. The following conclusions were drawn: about 51%, 43% and 17% of the total values are higher than, respectively, 190 mg/dL, 200 mg/dL and 240 mg/dL; such percentages are higher in the northern as compared to the southern Regions; the observed Region-specific distributions suggest the occurrence of a North to South negative gradient in the cholesterol values of the population; the need for the correct use of decision values (universally acceptable) instead of reference values (population-dependent) for risk evaluation has therefore to be stressed.

RIASSUNTO

Il presente lavoro aveva lo scopo di valutare, nella popolazione italiana, con quale frequenza i valori di colesterolemia fossero superiori a limiti prefissati, e di verificare se erano ancora osservabili differenze inter-Regionali nella distribuzione dei valori di colesterolo della popolazione. 13 laboratori, in 10 differenti Regioni Italiane, hanno estratto casualmente dal loro sistema informativo un numero di valori di colesterolemia variabile da circa 3000 a circa 50000, indipendentemente da qualsiasi considerazione sulle condizioni fisiopatologiche degli individui. Sono stati elaborati un totale di 125799 valori, generando le distribuzioni di frequenza globali e per ciascuna Regioni. Da tali distribuzioni è stata estratta la "porzione gaussiana" applicando il principio di Bhattacharya. Dai dati così elaborati si sono tratte le seguenti conclusioni: circa 51%, 43% e 17% dei valori totali risultano superiori a, rispettivamente, 190 mg/dL, 200 mg/dL, 240 mg/dL; tali percentuali sono generalmente più elevate nelle Regioni del Nord che in quelle del Sud; le frequenze riscontrate suggeriscono l'esistenza di un gradiente negativo Nord-Sud nella distribuzione dei valori di colesterolemia della popolazione; si deve pertanto sottolineare l'importanza dell'uso corretto dei valori decisionali (universalmente accettati) al posto dei valori di riferimento (dipendenti dalla popolazione) per la valutazione del rischio.

INTRODUZIONE

E' pratica medica corrente sorvegliare i valori della colesterolemia nella popolazione e nei singoli, ai fini di ridurre il rischio di malattia cardiovascolare intervenendo su tale fattore (1). L'eventuale intervento medico è modulato non tanto sulla base di valori di riferimento caratteri-

stici della popolazione ma in riferimento alla percentuale di rischio associata ai differenti valori di colesterolemia: da qui l'interesse rilevante del "valore decisionale" rispetto ai "valori di riferimento". Tuttavia può essere interessante rispondere alle seguenti domande. In una data popolazione con quale frequenza si riscontrano valori di colesterolemia tali da consigliarne la riduzione? Esistono ancora,

dopo anni di campagne e di interventi, differenze di distribuzione dei valori di colesterolemia legati alla area geografica di residenza? La opportunità di dare una risposta a questi quesiti sottolinea l'interesse di conoscere i valori di riferimento della popolazione: tali valori infatti approssimano assai da vicino le risposte ai quesiti posti.

La teoria e gli approcci sperimentali per la produzione di validi valori di riferimento sono stati appropriatamente descritti (3-6). Tuttavia, il procedimento è complesso: è possibile che lo sforzo della produzione di accurati valori di riferimento, per popolazione, per fasce di età e per sesso, non sia sufficientemente compensato dall'utilizzo previsto dei valori medesimi, in un contesto nel quale il riferimento sostanziale per la guida dell'intervento è rappresentato dal valore decisionale, come su accennato.

Si è tentato di ottenere una accettabile risposta ai quesiti su menzionati con un approccio sperimentale più semplice, ossia analizzando con appropriata metodologica statistica la distribuzione dei valori di colesterolemia accumulati nei sistemi informativi di laboratori appartenenti a differenti Regioni italiane. I risultati di tale approccio sono descritti in questo lavoro.

MATERIALI E METODI

13 laboratori italiani hanno accettato di raccogliere e di fornire (su supporto magnetico, dischetto) un numero congruentemente elevato di valori di colesterolemia misurati in un intervallo di tempo definito in campioni afferenti al Laboratorio, indipendentemente da qualsiasi variabile fisiologica del paziente (età, sesso, eccetera) e da qualsiasi motivazione (salute/malattia, valutazione di rischio, profilo) che avesse giustificato la richiesta della analisi. I valori raccolti ed inviati erano ottenuti in condizioni analitiche ordinarie, con il sistema analitico proprio di ciascun laboratorio. In linea di massima era implicitamente considerato che strumento, reagenti e calibratori fossero forniti dalla medesima casa dello strumento, e che il "sistema" venisse impiegato seguendo le istruzioni del costruttore.

Veniva anche richiesto di indicare la percentuale dei pazienti degenti sul totale, il metodo analitico, e pochi ulteriori dati.

I valori inviati venivano sottoposti ad uniforme analisi statistica, come segue.

Venivano innanzitutto determinati i seguenti parametri statistici delle singole distribuzioni originali:

- moda;
- percentili non parametrici 2,5°, 50° (mediana) e 97,5°;
- percentuali dei valori rispettivamente ≤ 116 mg/dL, ≥ 190 mg/dL; ≥ 200 mg/dL, ≥ 240 mg/dL.

Alle differenti popolazioni di valori si applicava quindi una uniforme divisione in classi, da 70 mg/dL a 500 mg/dL per classi di 10 mg/dL, eliminando i valori < 70 mg/dL e > 500 mg/dL; questi ultimi risultavano globalmente 1111 su un totale di 125799, pari allo 0,88%. Si calcolavano quindi le distribuzioni di frequenza relative, ed a tali distribuzioni si applicava una funzione smussante (7). Alle distribuzioni smussate si applicava la funzione di Bhattacharya (funzio-

ne derivata logaritmica della frequenza sul valore di classe) la cui porzione lineare coincide con la porzione normalmente distribuita (qui di seguito indicata come "porzione gaussiana") della distribuzione originale (7). Da ogni distribuzione originale si estraeva in tal modo una "porzione gaussiana", i cui limiti erano rappresentati rispettivamente dai limiti inferiore e superiore delle classi corrispondenti ai limiti inferiore e superiore della porzione lineare della funzione derivata logaritmica. Di tale "porzione gaussiana" venivano infine calcolati i percentili (non-parametrici) 2,5°, 5°, 50° (mediana), 95° e 97,5°.

I differenti calcoli matematico-statistici sono stati effettuati con applicazioni personali su tabellone elettronico Microsoft-Excel o con il pacchetto statistico Instat.

RISULTATI

Le caratteristiche principali del campione originale, includente un totale di 125799 singoli valori di colesterolemia, sono riassunte nella tabella 1. Tutti i laboratori dichiaravano di eseguire le misure con metodo enzimatico basato sulla azione degli enzimi colesterolo esterasi, colesterolo ossidasi e perossidasi. Nella tabella 2 sono riportati i parametri statistici delle distribuzioni dei valori forniti da ciascun laboratorio. E' anche riportata la percentuale di valori osservati inferiori a 116 mg/dL, e la percentuale dei valori superiori a, rispettivamente, 200 e 240 mg/dL.

Nella figura I è riportata, a titolo esemplificativo, l'effetto della applicazione della funzione smussante ad una distribuzione originariamente alquanto irregolare; nella figura II, sempre a titolo di esempio, la funzione derivata logaritmica è sovrapposta alla distribuzione smussata risultante. Nella tabella 3 sono riportati i parametri statistici relativi alla distribuzione della "porzione gaussiana" estratta da ciascun gruppo-campione di risultati, come porzione lineare della funzione derivata logaritmica. Sono anche riportate le percentuali di valori superiori a 190, 200 e 240 mg/dL inclusi in tale porzione.

La figura III mostra gli intervalli interfrattili 90% (dal 5° al 95° percentile non-parametrico) ed il valore mediano (50° percentile non-parametrico) delle distribuzioni dei valori di colesterolemia estratti come "porzione gaussiana" dai valori forniti dai differenti laboratori nelle varie provincie, ordinati in ordine di valore crescente della mediana. Nella tabella 4 sono riportate le statistiche parametriche principali (media e deviazione standard) delle distribuzioni dei valori appartenenti alle "porzioni gaussiane" estratte dai differenti gruppi-campione: le significatività delle differenze tra i valori medi (per il gruppo totale di laboratori e per i 4 laboratori dell'area milanese) sono state verificate con la statistica ANOVA.

La distribuzione globale dei valori forniti dai differenti laboratori, compresi nell'intervallo 70-500 mg/dL ($n = 124688$) è mostrata nella figura IV sottoforma di curva (smussata) di distribuzione relativa e della relativa funzione derivata logaritmica. Di tutti tali valori il 6,5 % risultava < 116 mg/dL, il 51,2% > 190 mg/dL, il 43,3% > 200 mg/dL, il 17,3% > 240 mg/dL.

TABELLA 1
Caratteristiche principali del campione

Codice lab.	Città	Sistema analitico	Percentuale di pazienti degenti	Tempo di raccolta dei dati (settimane)	Numero di dati raccolti
01	Bari	Olympus 600	91	10	4491
02	Bergamo	DAX 48	81	5	6986
03	Brescia	Ra-XT	0	12	5248
04	Chieti	Syncron CX5	38	28	8189
05	Milano (1)	Hitachi 747	n.c.	8	13492
06	Milano (2)	Vitros	n.c.	n.c.	5186
07	Milano (3)	Hitachi 747	n.c.	16	9631
08	Milano (4)	Hitachi 917	n.c.	8	3315
09	Napoli	Hitachi 747	100	n.c.	4037
10	Palermo	Olympus 600	75	12	4550
11	Roma	Hitachi 917	n.c.	28	49365
12	Torino	Hitachi 747	76	4	5365
13	Verona	Olympus AV-5200	n.c.	3	5944

n.c. = dato non comunicato

TABELLA 2
Dati originali: parametri statistici della distribuzione e percentuali di valori inferiori e superiori a limiti prefissati

Cod. Lab.	N° di valori	Moda mg/dL	Percentili (*)			Percentuale dei valori			
			2,5° mg/dL	50° mg/dL	97,5° mg/dL	<116 mg/dL %	>190 mg/dL %	>200 mg/dL %	>240 mg/dL %
01	4491	175	102	189	303	6	49	42	17
02	6986	195	98	191	299	6	51	42	17
03	5248	205	145	219	312	0,2	76	67	32
04	8189	185	107	194	294	4	54	45	17
05	13492	205	119	203	300	2	62	53	21
06	5186	225	142	218	311	0,3	75	66	31
07	9631	195	95	194	303	6	54	45	19
08	3315	220	124	213	313	2	69	61	28
09	4037	175	144	185	293	7	46	38	14
10	4550	185	110	189	301	4	50	42	17
11	49365	185	124	186	267	0	43	37	14
12	5365	195	83	184	296	11	46	39	15
13	5944	195	102	193	294	5	53	44	16

(*) percentili non-parametrici

DISCUSSIONE

Le caratteristiche del gruppo-campione (vedi tabella 1) mostrano un certo grado di disomogenità, soprattutto per quanto concerne la percentuale dei pazienti degenti, variabile da 0 a 100 (talora non comunicato), e per l'intervallo di tempo per la raccolta dei campioni, variabile da 3 a 28 settimane. Di questo si deve tenere conto nella interpretazione dei risultati. E' nota la tendenza dei valori dei pazienti degenti ad essere alquanto più bassi rispetto a quelli dei pazienti ambulatoriali, mentre quanto più l'intervallo di tempo per la raccolta dei campioni è ampio, tanto più possibile diventa che i valori registrati includano ripetizioni di pazienti ipocolesterolemici.

Pur con queste limitazioni, le distribuzioni originali (tabella 2) mostrano elevate percentuali di valori superiori ai limiti "di attenzione" generalmente considerati (190 mg/dL o 200 mg/dL) e percentuali consistenti (da 14 a 32%) di valori superiori al limite di 240 mg/dL; si osserva pure, peraltro, una discreta disomogeneità dei parametri della distribuzione.

E' pure evidente, anche se non in tutti i gruppi-campione, la presenza di una discreta proporzione (da 0 a 11%) di valori al disotto del limite di 116 mg/dL (pari a 3,0 mmol/L), valore questo ultimo considerato come discriminante per ipocolesterolemia (8). Globalmente la percentuale di valori < 116 mg/dL (6,5%) è superiore a quella

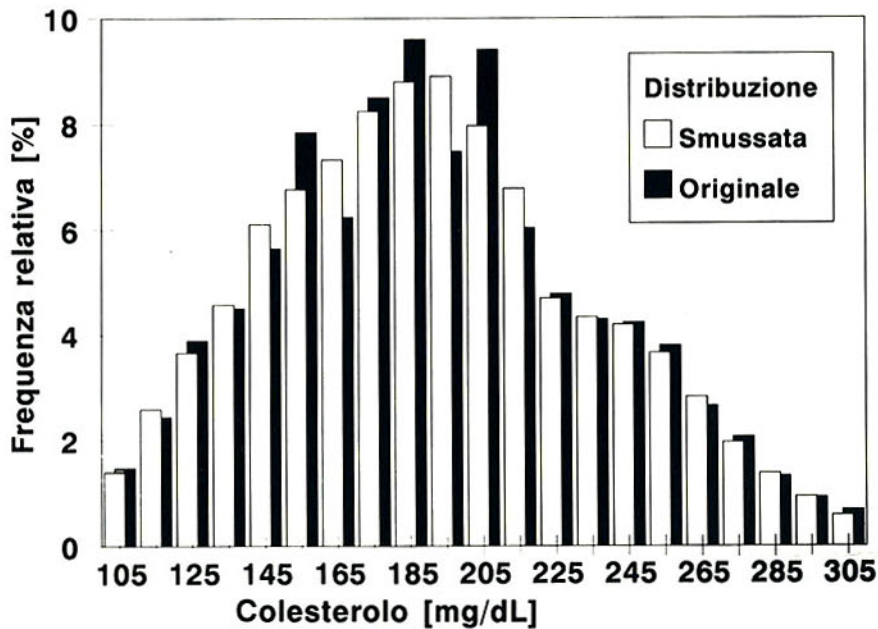


FIGURA I

Esempio di effetto della funzione smussante: l'istogramma di frequenza smussato risulta più regolare, ma le evidenti asimmetrie di distribuzione non vengono mascherate

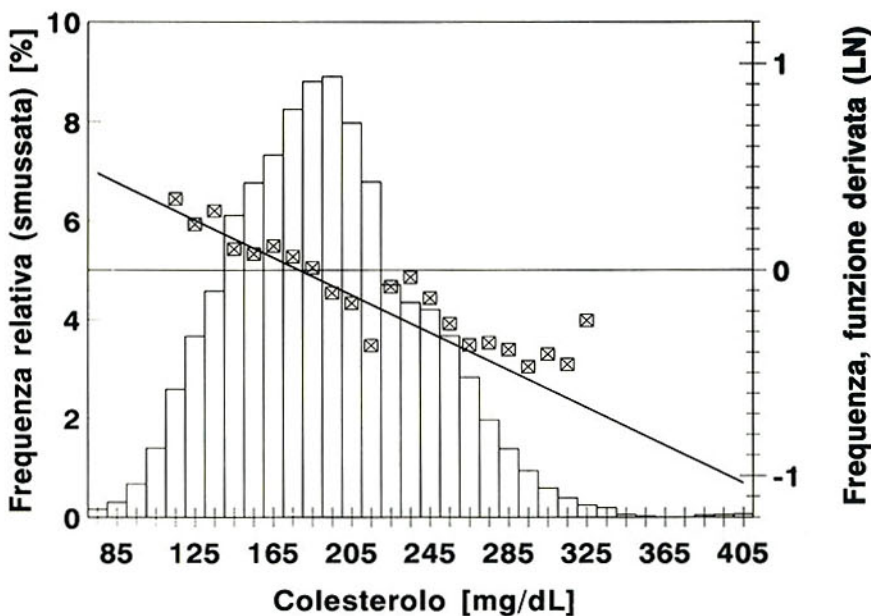


FIGURA II

Esempio di applicazione della funzione derivata logaritmica. E' possibile evidenziare una porzione lineare della funzione anche se i limiti di tale porzione possono non essere estremamente evidenti

riportata in altri lavori (8), ma risulta piuttosto variabile da laboratorio a laboratorio (tabella 2).

L'utilizzo di tecniche statistico-matematiche di deconvoluzione applicate a distribuzioni miste ("normali" più "patologici") per ricavare i valori di riferimento è considerato non sempre o non molto attendibile (9), a meno che le banche dati del laboratorio non vengano integrate con dati diagnostici (10) e vengano trattate con approccio statistico adeguato (11). Tuttavia in questo lavoro lo scopo non era di determinare accurati valori di riferimento, ma di fare un tentativo di separare porzioni gaussiane da gruppi-campione differenti applicando una metodologia unifor-

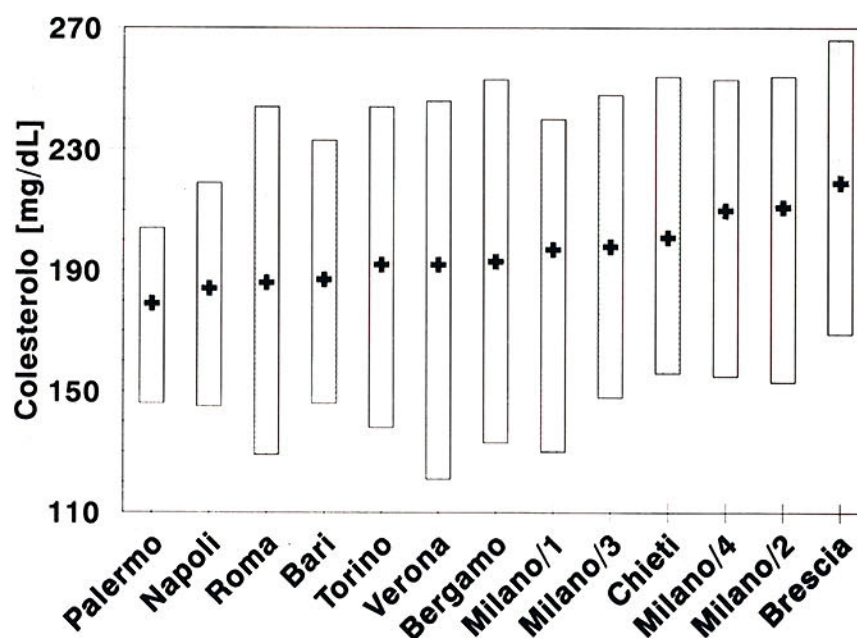
me e pertanto passibile di generare valori confrontabili, anche senza ricorrere a modificazioni complesse (12) dell'approccio adottato. La figura I mostra come la applicazione della funzione smussante elimini alcune irregolarità nell'istogramma di distribuzione senza peraltro annullare significativamente le asimmetrie di distribuzioni eventualmente presenti, evidenti nell'istogramma di figura I appositamente scelto come esempio. Nella applicazione della funzione derivata logaritmica le maggiori difficoltà si sono riscontrate nella definizione degli esatti limiti di linearità della funzione medesima; l'utilizzo di un approccio statistico in sostituzione di quello visivo (esemplificato

TABELLA 3

"Porzione gaussiana" dei valori estratta da ciascun gruppo-campione: parametri statistici della distribuzione e percentuali di valori superiori a limiti prefissati

Cod. Lab.	N° di valori	% di valori del campione originale	Percentili (*)			Percentuale dei valori		
			2,5° mg/dL	50° mg/dL	97,5° mg/dL	>190 mg/dL %	>200 mg/dL %	>240 mg/dL %
01	3072	68	143	187	237	48	37	0,9
02	6258	90	126	193	281	54	44	16
03	4588	87	165	219	282	80	70	29
04	6615	81	153	201	277	63	52	18
05	11900	88	117	196	252	58	48	12
06	4473	86	146	211	266	72	62	21
07	7657	80	144	198	264	59	48	15
08	2767	84	149	210	266	70	60	20
09	2661	66	143	184	227	73	31	0
10	2508	55	144	179	210	32	19	0
11	41104	83	124	186	267	74	39	12
12	4110	77	133	192	261	52	43	12
13	5633	95	112	192	266	52	43	13

(*) percentili non-parametrici

**FIGURA III**

"Porzione gaussiana" della distribuzione dei valori di colesterolemia nei singoli gruppi-campione. Le barre indicano l'intervallo interquartile (non-parametrico) centrale 90%; le croci il 50° percentile (mediana)

nella figura II) a tale definizione non ha portato vantaggi sostanziali. In considerazione delle molte limitazioni, non si è ritenuto opportuno utilizzare in questa indagine approcci statistico-matematici più complessi.

Pur considerando le limitazioni discusse, la applicazione del metodo ci ha permesso di selezionare da ciascun gruppo-campione una "porzione gaussiana" i cui limiti corrispondono abbastanza da vicino ai valori di riferimento riportati nella letteratura e generati con approccio più rigoroso (13,14). Tale "porzione gaussiana" includeva globalmente 104920 singoli valori analitici, pari all'83,4 % dei 125799 valori originali; peraltro, tale percentuale risultava

piuttosto variabile nei differenti laboratori, oscillando tra 55% e 95% (tabella 3).

La figura III mostra le variazioni geografiche riscontrate tra le differenti "porzioni gaussiane", corrispondenti sostanzialmente alle variazioni attese (15,16). Anche considerando la necessità di alcune correzioni, derivanti per esempio dal fatto che i gruppi con il valore mediano più basso e più alto (rispettivamente, Napoli e Brescia, figura III) sono anche i gruppi con la maggiore e con la minore percentuale di pazienti degenti (tabella 1), la valutazione globale della figura III sembra confermare la persistenza di un gradiente negativo Nord-Sud nella concentrazione

TABELLA 4

"Porzione gaussiana" dei valori estratti da ciascun gruppo-campione. Parametri statistici parametrici della distribuzione e significatività statistica delle differenze tra i valori medi. I dati relativi al laboratorio 11 non sono inclusi in questa tabella perchè forniti già suddivisi in classi

Cod. lab.	Provincia	n.	Media (mg/dL)	Dev. Standard (mg/dL)
01	Bari	3072	188 (*)	27,3
02	Bergamo	6258	196 (*)	41,0
03	Brescia	4588	220 (*)	32,5
04	Chieti	8189	205 (*)	34,0
05	Milano (1)	11900	195 (*) (#)	35,3
06	Milano (2)	4473	210 (*) (#)	32,6
07	Milano (3)	7657	200 (*) (#)	33,4
08	Milano (4)	2767	209 (*) (#)	32,3
09	Napoli	2661	184 (*)	24,7
10	Palermo	2508	178 (*)	19,8
11	Torino	4110	193 (*)	35,5
12	Verona	5633	191 (*)	40,8

(*) $P < 0,0001$ (ANOVA)
 (#) $P < 0,0001$ (ANOVA)

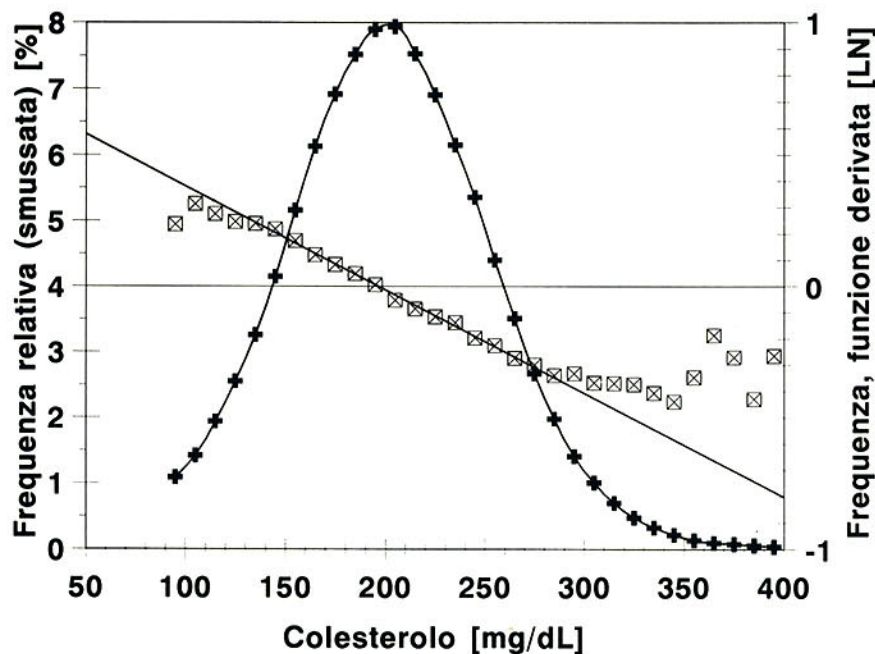


FIGURA IV

Curva di frequenza (smussata) dei valori totali forniti dai 13 laboratori (n = 124688) e corrispondente funzione derivata logaritmica: la porzione lineare di questa ultima corrisponde all'intervallo 130 - 290 mg/dL

media di colesterolo nella popolazione (17). Non sono facili da spiegare le differenze statisticamente significative tra i valori medi delle "porzioni gaussiane" estratte dai dati forniti da quattro laboratori della area milanese. Curiosamente, tuttavia, tali differenze sono simili a quelle riscontrate alcuni anni orsono in una indagine più limitata (18), e si è tentati di attribuire tali differenze a problemi di accuratezza analitica (19,20).

Riunendo in un gruppo unico tutti i valori forniti dai differenti laboratori, per un totale di 124688 valori singoli ed applicando alla distribuzione la funzione smussante (che peraltro modifica solo lievemente la curva o l'isto-

gramma di distribuzione) si ottiene una curva di distribuzione molto regolare anche se lievemente asimmetrica (figura IV). La funzione derivata logaritmica di tale curva mostra un allineamento consistente dei punti sulla relativa retta di regressione nella proiezione lineare, permettendo una più chiara identificazione dei limiti di linearità, che corrispondono all'intervallo 130 - 290 mg/dL.

Con la dovuta considerazione alle differenti limitazioni menzionate, appare possibile trarre le seguenti conclusioni:

- una percentuale rilevante dei valori di colesterolemia misurati nei laboratori della penisola sono superiori ai valori indicati come valori decisionali ai fini di attenzione

e/o di intervento medico: per il 51,2% risultano infatti > 190 mg/dL, per il 43,3% > 200 mg/dL, e per il 17,3% > 240 mg/dL. Questo deve fare riflettere sulla necessità/opportunità di intensificare lo sforzo collettivo verso un maggiore controllo di questo fattore di rischio;

- peraltro, la percentuale di valori superiori ai limiti considerati sembra decrescere da Nord a Sud, pur con alcune variazioni, in linea con quanto generalmente riconosciuto;

- la attenzione rivolta alla selezione del valore soglia per i diversi tipi di intervento non è irrilevante. Poiché i dati qui riportati confermano che i valori di attenzione si trovano in prossimità od in coincidenza con i valori modal/mediani della distribuzione, un piccolo spostamento del valore soglia (per esempio da 190 a 200 mg/dL) provoca una variazione di classificazione per una frazione consistente (circa 8%) dei pazienti;

- per i medesimi motivi, viene ribadita la necessità di un attento controllo della accuratezza analitica: una inaccuratezza del 5% modifica la classificazione di quasi il 10% della popolazione nei confronti di un valore decisionale vicino alla mediana della distribuzione (190 - 200 mg/dL);

- in relazione ad un analita di cui sono prevalentemente considerate le variazioni in aumento, si deve rammentare anche la possibilità, tutt'altro che rara, di variazioni in difetto, delle quali potrebbe interessare conoscere la patologia correlata;

- viene comunque ulteriormente ribadita la sostanziale differenza tra valori decisionali e valori di riferimento, questi ultimi da considerarsi come valori descrittivi della posizione e della dispersione dei valori "più frequenti" nella popolazione; viene anche indirettamente richiamata l'attenzione sulla necessità di valori di riferimento specifici per la popolazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Sniderman AD, Cianflone K. Lipids and vascular disease: what we do and do not know. *Clin Chim Acta* 1999; 286:7-22.
2. Graziani MS, Franzini C. Colesterolo. Gruppo di studio 02. Lipidi e lipoproteine. *Giorn It Chim Clin* 1990; 15:87-93.
3. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25:337-342.
4. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25:639-644.
5. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26:593-598.
6. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25:645-656.
7. Oosterhuis WP, Modderman ThA, Pronk C. Reference values: Bhattacharya or method proposed by the IFCC? *Ann Clin Biochem* 1990; 27:359-365.
8. Crook MA, Velauthar U, Moran L, Griffiths W. Hypocholesterolaemia in a hospital population. *Ann Clin Biochem* 1999; 36:613-616.
9. Solberg HE. Using hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clin Chem* 1994; 40:2205-2206.
10. Kouri T, Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Rajamaki A., Finneman H, et al. Reference intervals developed from data for hospitalized patients: computerized method based on combination of laboratory and diagnostic data. *Clin Chem* 1994; 40:2209-2215.
11. Dorizzi RM, Schinella M, Pupillo A. Reference values of biochemical tests calculated using data from routine laboratory data. *Clin Chem* 1999; 45:A99 (Abstract).
12. Baadenhuysen H, Smit JC. Indirect estimation of clinical chemical reference intervals from total hospital patient data: application of a modified Bhattacharya procedure. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:829-839.
13. Rifkind BM, Segal P. Lipid research clinics program reference values for hyperlipidemia and hypolipidemia. *JAMA* 1983; 250:1869-1872.
14. Zanella A. Reference values for plasma lipids and lipoproteins. *JAMA* 1984; 252:343-344 (letter).
15. Cortese C, Angotti E, Cavalcanti E, Rossano G, Maio R, Cosco C, Colonna A. Valutazione del profilo lipidico in un campione di popolazione calabrese. *Biochim Clin* 1990; 14:1504-1506.
16. Castaldo AM, Vrenna L, Castaldo P, Di Giacomo C, Giardiello D, Castaldo A. Valori di riferimento del colesterolo sierico nella popolazione campana. *Giorn It Chim Clin* 1992; 17:101-105.
17. Menotti A. Colesterolemia e cardiopatia coronarica. Revisione di alcuni dati epidemiologici italiani. *Federazione Medica* 1992; 4; 157-162.
18. Franzini C. Reference values and/or decision levels in interpreting serum cholesterol concentrations in heart disease. *LabMedica* 1990; 7(5):3 (letter).
19. Malavasi B, Catapano A, Galli G, Franzini C. A collaborative trial for the evaluation of blood cholesterol measurement in clinical laboratory in Italy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30:157-161.
20. Graziani MS, Ceriotti F, Carobene A, Modenese A, Ferrero C, De Giorgi E, et al. Accuracy of cholesterol measurement in Italian clinical laboratories. Joint project GISSI prevention-Italian Society of Clinical Biochemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35:311-315.