

Editorial Manager(tm) for La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio Italian
Journal of Laboratory Medicine
Manuscript Draft

Manuscript Number: RIME-D-11-00019

Title: Raccomandazioni di consenso SIBioC-SIMeL per la rilevazione e gestione dei campioni emolizzati e utilizzo dell'indice di emolisi Short title: Rilevazione e gestione dei campioni emolizzati

Article Type: Review (Rassegna)

Section/Category: Basic Science Section

Keywords:

Corresponding Author: Davide Giavarina

Corresponding Author's Institution:

First Author: Giuseppe Lippi, MD

Order of Authors: Giuseppe Lippi, MD;Marco Caputo, MD;Giuseppe Banfi, MD, PHD;Massimo Daves, MD;Alberto Dolci, MD;Martina Montagnana, MD;Valentino Miconi, MD;Bruno Milanese, MD;Margherita Morandini, BASc;Elisa Piva, MD;Gian Luca Salvagno, MD;Teresa Troiano, MD;Davide Giavarina

Abstract:

Raccomandazioni di consenso SIBioC-SIMeL per la rilevazione e gestione dei campioni emolizzati e utilizzo dell'indice di emolisi.

Giuseppe Lippi¹, Marco Caputo², Giuseppe Banfi³, Massimo Daves⁴, Alberto Dolci⁵, Martina Montagnana⁶, Valentino Miconi⁷, Bruno Milanese⁸, Margherita Morandini⁹, Elisa Piva¹⁰, Gian Luca Salvagno⁶, Teresa Troiano¹¹, Davide Giavarina¹² per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL-CISMEL sulla Variabilità Extra-Analitica del Dato di Laboratorio

1. U.O. di Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma, Italy
2. Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera, Bussolengo (VR)
3. Istituto Galeazzi, Università di Milano, Milano
4. Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano, Bolzano
5. Laboratorio di Biochimica Clinica, Ospedale Universitario Luigi Sacco, Università di Milano, Milano
6. Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona, Verona
7. Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Arzignano, Arzignano (VI)
8. Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Desenzano del Garda (BS)
9. Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOSMA, Pordenone
10. Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova
11. U.O. di Patologia Clinica 1, Policlinico di Bari, Bari
12. Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale S. Bortolo, Vicenza

Key words: hemolysis; hemolytic anemia, unsuitable samples; preanalytical variability; hemolysis index.

Parole chiave: emolisi; anemia emolitica, campioni non idonei; variabilità preanalitica; indice di emolisi.

Corresponding author:

Prof. Giuseppe Lippi
U.O. Diagnostica Ematochimica,
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma,
Via Gramsci 14
43126 - Parma, Italy
Tel. 0039-0521-703050
Tel. 0039-0521-703197
E-mail: glippi@ao.pr.it, ulippi@tin.it

SOMMARIO

La presenza di emolisi in un campione biologico è causata principalmente da anemia emolitica o emolisi in vitro. La seconda circostanza è conseguente ad attività inappropriate per la raccolta e il trattamento del campione biologico che possono inficiare l'attendibilità dei risultati di molti esami di laboratorio. L'emolisi è valutabile mediante la determinazione dell'emoglobina libera, il cui limite è 20 mg/L nel plasma e 50 mg/L nel siero. L'emolisi si rende visivamente palese quando la concentrazione di emoglobina libera supera 300 mg/L. Poiché i campioni emolizzati sono la causa più frequente di non conformità dei campioni biologici nei laboratori clinici, con prevalenza prossima al 3% di tutti i campioni ricevuti, queste raccomandazioni di consenso sono state redatte specificatamente per assistere i professionisti di laboratorio nella rilevazione e gestione dei campioni emolitici. In sintesi, l'approccio raccomandato si basa su: (i) rilevazione e quantificazione sistematica dell'emolisi, mediante ispezione visiva e successiva determinazione dell'indice di emolisi in tutti i campioni con emolisi visibile; (ii) immediata notifica al reparto della presenza di emolisi del campione secondo modalità definite localmente; (iii) soppressione di tutti i test influenzati dalla presenza e/o grado di emolisi; e (vi) richiesta tempestiva di un secondo campione sul quale eseguire gli esami precedentemente soppressi.

ABSTRACT

Consensus recommendations SIBioC-SIMeL for identification and management of hemolyzed specimens and implementation of the hemolysis index.

The presence of hemolysis in a biological blood sample is mainly caused by hemolytic anemia or hemolysis in vitro. The second circumstance is caused by inappropriate activities for collection and processing of biological samples, that may affect the reliability of test results. Hemolysis is assessed reflected by free hemoglobin quantification, whose limit is 20 mg/L in plasma and 50 mg/L in serum. Hemolysis is visually observed when the concentration of free hemoglobin exceeds 300 mg/L. Since hemolyzed samples are the most frequent cause of unsuitable biological samples in clinical laboratories, with a prevalence approaching 3% of all samples received, these consensus recommendations have been drafted specifically to assist laboratory professionals in detection and management of haemolysed specimens. In synthesis, the recommended approach is based on: (i) systematic detection and quantification of hemolysis, by visual inspection and subsequent quantification of the hemolysis index on all samples with visually detectable hemolysis; (ii) immediate notification to the referring department of the presence of hemolysis in the sample, as locally determined; (iii) suppression of all tests affected by the presence and/or degree of hemolysis, and (vi) timely request of a second sample, on which the exams previously deleted can be performed.

Generalità sui globuli rossi

I globuli rossi (GR) o eritrociti, sono le cellule ematiche più comuni e numerose nei vertebrati e hanno la funzione essenziale di veicolare l'ossigeno ai tessuti attraverso il flusso ematico. Il principale componente dei GR è l'emoglobina, molecola contenente ferro che lega l'ossigeno ed è responsabile del tipico colore rosso del sangue. Negli esseri umani, i GR maturi hanno l'aspetto di dischi biconcavi, flessibili, privi di nucleo e con organelli intracellulari residui che scompaiono con la maturazione eritrocitaria (1). La vita media dell'eritrocita in circolo è di circa 90-120 giorni, prima di subire degradazione per fagocitosi ad opera del sistema reticolo-endoteliale della milza, fegato e midollo osseo. Questo processo si esplica in genere con cinetica sovrapponibile a quella della sintesi midollare, al fine di equilibrarne la produzione-distruzione e mantenere così costante il numero di GR nel sangue (1).

I GR sono continuamente prodotti nel midollo osseo rosso delle ossa lunghe, ad una velocità di circa 2 milioni al secondo. Il processo che porta alla produzione e immissione in circolo di GR è denominato eritropoiesi, e dura all'incirca 7 giorni. L'eritropoiesi è regolata finemente mediante un processo a due fasi, da parte dell'ormone eritropoietina (Epo), che è in grado di stimolare la produzione delle cellule dai loro precursori (cellule staminali) nel midollo osseo e prevenire l'apoptosi dei GR immaturi (reticolociti), fenomeno noto come neocitolisi. I reticolociti comprendono quasi l'1% dei GR circolanti (1).

Le dimensioni dei GR variano considerevolmente nelle diverse specie di vertebrati. Un eritrocita umano tipico ha un diametro di 6-8 micron e uno spessore di 2 micron. Le cellule hanno quindi un volume di circa 90 fL ed una superficie di circa $136 \mu\text{m}^2$, ma possono "rigonfiarsi" fino ad assumere forma sferica di 150 fL, senza distorsione della membrana (figura 1). Gli eritrociti dei mammiferi sono caratterizzati dalla mancanza del nucleo e sono tipicamente a forma di disco biconcavo, appiattito e depresso al centro. Gli unici vertebrati privi di GR sono i coccodrilli della famiglia *Channichthyidae*, che vivono in acque fredde, molto ricche d'ossigeno (in questi animali l'ossigeno viene trasportato in forma liberamente dissolta nel sangue). L'originale forma biconcava degli eritrociti è attribuibile a caratteristiche di ottimizzazione delle proprietà reologiche del sangue nei vasi di grandi dimensioni, quali la massimizzazione della superficie di scambio a parità di volume e la minimizzazione dei contatti con le piastrine (scatter piastrinico). Nella vita adulta, l'uomo ha un numero totale di GR pari a circa $2-3 \times 10^{13}$ ($4.2-6.2 \times 10^{12}/\text{L}$ nei maschi e $3.8-5.5 \times 10^{12}/\text{L}$ nelle donne), ed è considerevolmente superiore a quello delle altre cellule del sangue (ad esempio, il rapporto è di circa 1000:1 con i leucociti) (2). Come premesso, il principale costituente dei GR è l'emoglobina, una metalloproteina complessa contenente gruppi eme, i cui atomi di ferro sono in grado di legare temporaneamente molecole di ossigeno (O_2). Ogni eritrocita umano contiene quasi 270 milioni di molecole di emoglobina, ciascuna con quattro gruppi eme, cossiché l'emoglobina rappresenta circa un terzo del volume totale dei GR (1).

Definizione di emolisi

Il termine emolisi deriva dal greco *haimo* (cioè, sangue) e *lysis* (cioè, scioglimento), e definisce il processo patologico caratterizzato dalla distruzione (rottura) dei GR del sangue con conseguente liberazione di emoglobina e altri componenti intracellulari nel liquido che li contiene (il sangue, in genere). L'emolisi è un fenomeno importante in medicina, per almeno due ragioni. In primo luogo, l'emolisi *in vivo* causata da una varietà di condizioni e patologie, può portare a diversi gradi di anemia (fino ad anemia con pericolo di vita quando la concentrazione di emoglobina diminuisce molto rapidamente e/o scende al di sotto di 60 g/L). In secondo luogo, l'emolisi *in vitro*, che è invece causata da procedure inadeguate per la raccolta e il trattamento del campione biologico, può inficiare l'attendibilità dei risultati di molti esami di laboratorio e influire negativamente sulla diagnosi e cura dei pazienti (3).

Oggettivamente, la presenza e quantificazione dell'emolisi è valutabile mediante la determinazione dell'emoglobina libera nel plasma. Piccole quantità di emoglobina sono sempre

rilevabili nel plasma o nel siero e il limite superiore dell'intervallo di riferimento dell'emoglobina plasmatica e sierica è 20 e 50 mg/L, rispettivamente (è più alta nel siero a seguito del fisiologico processo di coagulazione del campione, che determina la lisi di un piccolo numero di emazie). In genere, l'emolisi si rende palese (visivamente) quando la concentrazione di emoglobina libera supera 300 mg/L (18,8 mmol/L), valori che riflettono una lisi approssimativa dello 0.5% dei GR e che conferisce quindi un colore rosato/rosa/rosso al campione (3).

Prevalenza dei campioni emolizzati

I campioni emolizzati sono un evento piuttosto frequente, con una prevalenza che approssima il 3% di tutti i campioni ricevuti di routine e rappresenta il 40-70% di tutti le non conformità dei campioni (quasi cinque volte maggiore della seconda causa di non idoneità). Come ampiamente descritto in letteratura, l'emolisi in vitro è la principale causa di non idoneità dei campioni per pazienti ambulatoriali e degenti, per campioni in routine e in urgenza (3).

Molti studi nel corso degli ultimi anni hanno valutato retrospettivamente la prevalenza di campioni emolizzati, e alcuni di questi hanno anche definito il rischio potenziale di eventi clinici avversi associati all'analisi dei campioni non idonei. Il problema principale nell'approccio epidemiologico a questo problema (al quale - peraltro - queste raccomandazioni si prefiggono di ovviare, almeno parzialmente) è la difficoltà - se non impossibilità - di produrre stime reali sulla frequenza dei campioni emolizzati nei laboratori clinici per una serie di motivi che comprendono (i) ignoranza o sottostima del problema, (ii) mancata segnalazione, (iii) eterogeneità organizzativa tra i diversi laboratori e conseguente mancanza di un approccio condiviso per l'identificazione, registrazione ed eventuale segnalazione di questi eventi. Nondimeno, alcuni dati possono essere dedotti dalla letteratura scientifica (3).

In un periodo osservazionale di 30 giorni, Carraro et al hanno esaminato la prevalenza dei campioni emolizzati ricevuti nel settore urgenze di un grande Policlinico Universitario Italiano (Padova). Su un totale di 27540 campioni biologici inviati per esami di chimica clinica, coagulazione e test tossicologici, 505 risultavano emolizzati (3.3%). Il 64% di essi erano gravati da un grado di emolisi modesto (<50 mg/L di emoglobina libera), il 31% da un grado intermedio, e il 5% da un grado tale (>300 mg/L di emoglobina libera) oltre il quale alcuni esami potevano risultare inattendibili. La percentuale di campioni emolizzati stratificata per i diversi reparti fu riportata simile per reparti di medicina interna e chirurgia (3.1%), terapia intensiva (3.5%), pronto soccorso e medicina d'emergenza (3.3%). Ancora più significativo appare il dato secondo il quale i campioni emolizzati per cause biologiche (emolisi in vivo) erano 16 su 505 (3.2%), di cui 7 associati a circolazione extracorporea prolungata durante interventi di cardiocirurgia, 3 a reazioni trasfusionali, 2 a tossicità acuta da etanolo, 1 a pancreatite acuta necrotico-emorragica, 1 a rabdomiolisi da overdose di stupefacenti, e 2 ad eziologia ignota. In 5 dei 16 casi (31%) l'emolisi in vivo non è stata sospettata preventivamente dai clinici, e il dato di laboratorio è stato quindi essenziale per diagnosticare una situazione clinica critica e migliorare contestualmente l'outcome (4).

In uno studio successivo Romero et al. hanno descritto la percentuale di campioni emolizzati nel settore urgenze di un ospedale spagnolo (Malaga), identificando un numero significativamente maggiore per campioni provenienti dal reparto di medicina d'emergenza (1.6%) rispetto a quelli inviati da altri reparti ospedalieri (1.0%) e dalla terapia intensiva (0.2%) (5). In analogia, Burns et al. hanno descritto una frequenza di campioni emolizzati nel laboratorio di un ospedale universitario americano (New York) significativamente maggiore per il pronto soccorso rispetto a quelli raccolti dall'ambulatorio prelievi sotto la giurisdizione del laboratorio (12.4% versus 1.6%) (6).

Un ampio studio effettuato nel laboratorio di chimica clinica di un altro policlinico universitario italiano (Verona), basato sull'analisi retrospettiva di 150516 provette primarie per test di routine e urgenze ricevuti nella sezione di chimica clinica (16960 provenienti dal reparto di medicina d'emergenza, 2652 dalla dialisi, 10116 dall'unità operativa di terapia intensiva, 62068

da reparti di medicina interna, 38084 da reparti chirurgici, 11756 dai reparti pediatrici e 8880 dagli ambulatori per prelievo di pazienti esterni afferenti al laboratorio), ha consentito di stimare una frequenza di campioni emolizzati pari al 5.6%. Classificando i campioni emolizzati in base alla loro provenienza, la maggiore frequenza è stata osservata per campioni del reparto di medicina d'urgenza (8.8%), seguita da reparti pediatrici (8.5%), medicina interna (6.2%), terapia intensiva (5.4%) e chirurgia servizi (4.0%). La frequenza minore è stata registrata per campioni provenienti dalla emodialisi (1.5%) e dagli ambulatori per pazienti esterni (0.1%) (7). In un recente sondaggio collaborativo promosso da European Preanalytical Scientific Committee (EPSC) (8) e dall'IFCC Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety (WG-LEPS)" monitorando 388 laboratori in tutto il mondo (179 Stati Uniti, 188 Italia, 20 Australia, 15 Turchia, 10 Repubblica Ceca; 80% pubblici e 20% privati), la frequenza osservata di campioni emolizzati era, in ordine decrescente: 39% da 1 a 3% dei campioni; 28% <1% dei campioni, 21% da 3 a 5% dei campioni, 8% da 5 a 10% dei campioni, e 4% >10% dei campioni. Si conferma in questo sondaggio la netta prevalenza relativa di campioni inviati da reparti di medicina d'urgenza (53%), seguita da reparti pediatrici (16%) e terapia intensiva (7%). Infine, in un recentissimo studio prospettico volto a valutare la prevalenza di emolisi nei campioni inviati per emogas analisi arteriosa, la prevalenza è risultata pari a 1.5% di tutti i campioni (9). E' tuttavia importante sottolineare che l'implementazione di programmi di training specifici per la corretta esecuzione del prelievo venoso sono in grado di ridurre in modo significativo l'incidenza di campioni emolitici (10).

L'anemia emolitica (emolisi *in vivo*)

Le anemia emolitiche rappresentano circa il 5% di tutte le anemie. Sono causate da ridotta sopravvivenza in circolo dei GR in numerose e differenti patologie la cui classificazione convenzionale comprende le cause ereditarie o acquisite descritte in Tabella 1. L'anemia può essere più o meno grave, in relazione alla capacità midollare di compensare adeguatamente la prematura distruzione in circolo degli eritrociti. In genere le patologie che possono causare anemia emolitica sono imputabili ad una aumentata (accelerata) distruzione (ad esempio, le cellule falciformi sono caratterizzate da una sopravvivenza breve per cui solo il 30% dei GR prodotti dal midollo rimane in circolo dopo 6-16 giorni), che può essere extravascolare (prematura distruzione da parte dei macrofagi, in particolare quelli della milza e del fegato), o - meno comunemente - intravascolare (rottura della membrana eritrocitaria in circolo) (11,12).

La presentazione clinica dell'anemia emolitica dipende da vari fattori, tra i quali l'entità e la velocità di distruzione dei globuli rossi in circolo. Malgrado i sintomi siano simili ad altre forme di anemia (ad esempio, stanchezza, pallore, dispnea), nell'emolisi acuta il quadro clinico è importante, con tachicardia e ipotensione ortostatica e serio rischio per la vita del paziente. Nei pazienti con emolisi modesta l'anemia può essere invece completamente asintomatica. La rottura dei GR in circolo determina comunque segni caratteristici come ittero e talora emoglobinuria. Aumenta poi considerevolmente il rischio di complicanze a lungo termine, come la splenomegalia, calcolosi biliare, ipertensione polmonare (anche associata a episodi sincopali, dolore toracico e dispnea progressiva), edema. Sebbene la mortalità per anemia emolitica sia generalmente bassa, pazienti anziani o con patologie cardiovascolari hanno un rischio sostanzialmente aumentato (11,12).

La rottura della membrana eritrocitaria determina la liberazione di molti componenti intracellulari, in particolare emoglobina, lattato deidrogenasi (LDH), aspartato aminotransferasi (AST) e potassio. L'aumento dell'LDH (in genere degli isoenzimi LDH1 e LDH2) compare generalmente quando la conta dei reticolociti corretta arbitrariamente in base all'ematocrito (cosiddetto "indice reticolocitario") risulta superiore al 10%, anche se con lo sviluppo dell'analisi automatizzata dei reticolociti, il conteggio assoluto dei reticolociti ha prodotto lo stesso significato clinico rendendo di fatto questo calcolo obsoleto (13). Nell'approccio diagnostico all'anemia emolitica è importante la valutazione dei reticolociti, che aumentano

caratteristicamente 24-48 ore dopo l'episodio emolitico, come pure la bilirubina indiretta e l'urobilinogeno. La valutazione dell'anemia emolitica deve essere guidata dall'esame morfologico del periferico, che diventa cruciale nella distinzione tra emolisi immune e non-immune. Sferociti e microsferociti rappresentano segni caratteristici di anemia emolitica immune, mentre globuli rossi frammentati e/o schistociti rappresentano segni distintivi di anemia emolitica non-immune, generalmente da causa meccanica (12). Nei pazienti con anemia emolitica autoimmune, la maggior parte degli autoanticorpi sono immunoglobuline di classe IgG, rilevabili mediante test di Coombs diretto (prova diretta di antiglobulina, DAT) (11). In presenza di emolisi intravascolare di grado elevato (es. anemia emolitiche da incompatibilità trasfusionale, protesi valvolari cardiache) l'emoglobina libera nel plasma può anche influenzare gli indici eritrocitari (es. MCHC falsamente elevato) (14).

L'emolisi in circolo determina la fuoriuscita dagli eritrociti di emoglobina che si dissocia in dimeri, che con elevata affinità si legano simmetricamente ad una molecola di aptoglobina, inibendone l'attività ossidativa. L'apoaptoglobina ha una emivita di 5 giorni, mentre i complessi aptoglobina-emoglobina hanno una emivita di 10-30 minuti. I complessi aptoglobina-emoglobina sono poi rimossi dal circolo dal sistema reticolo-endoteliale, soprattutto nella milza. Il consumo di aptoglobina non stimola la produzione epatica e pertanto - in ambito clinico - la sua determinazione è utile per identificare e monitorare l'emolisi intravascolare. Al contrario, in presenza di emolisi extravascolare, il sistema reticolo-endoteliale rimuove direttamente gli eritrociti e la concentrazione di aptoglobina appare sostanzialmente normale o solo lievemente ridotta (il calo della concentrazione di aptoglobina rappresenta pertanto un criterio importante per la diagnosi di emolisi intravascolare da moderata a severa) (11,12).

Emolisi *in vitro*

Nonostante i recenti progressi tecnologici e informatici abbiano contribuito ad abbattere considerevolmente l'incertezza della fase analitica, la qualità globale degli esami di laboratorio risente ancora considerevolmente di problemi che possono scaturire dalla fase extra-analitica, e in particolare nella fase preanalitica. Gli errori preanalitici rappresentano oggi quasi il 70% degli errori riscontrabili nell'ambito del processo diagnostico, e possono frequentemente tradursi in esami inattendibili che possono mettere a rischio la salute dei pazienti. I problemi più comuni sono imputabili a procedure inadeguate per la raccolta, gestione e conservazione del campione. Nell'ambito degli errori preanalitici, l'emolisi *in vivo* rappresenta la causa di gran lunga preponderante di campioni non idonei, con percentuali variabili dal 50 al 70% (15,16). Le cause che possono determinare emolisi *in vitro* iniziano al letto del paziente e si estendono lungo tutta la filiera che porta il campione all'analisi. In genere, esse sono attribuibili a (i) caratteristiche anatomiche del paziente (ad esempio, vene fragili o non facilmente localizzabili), (ii) l'abilità dell'operatore deputato alla raccolta del campione biologico; (iii) il dispositivo utilizzato per il prelievo; (iv) il trattamento del campione immediatamente dopo il prelievo; (v) condizioni di trasporto del campione al laboratorio; (vi) trattamento del campione prima dell'analisi; e (vii) conservazione del campione (16-18).

Diagnosi differenziale tra patologia emolitica ed emolisi *in vitro* da errore preanalitico

L'aspetto più rilevante che il laboratorio deve affrontare in merito alla gestione dei campioni emolizzati è quello di discriminare l'emolisi *in vitro* dall'anemia emolitica, mediante una strategia che deve essere guidata da finalità cliniche piuttosto che da considerazioni analitiche. Il presupposto fondamentale è rappresentato dalla necessità di centralizzare la gestione del paziente, come attestato da un caso recente in cui un paziente è deceduto per arresto cardiaco per la terapia di una iperpotassiemia spuria, in quanto il laboratorio non prevedeva una strategia di gestione dei campioni emolizzati (19). Da questa sfortunata circostanza appare evidente come una stretta collaborazione tra laboratorio e clinica rappresenti un presupposto fondamentale per un'appropriata gestione del rischio clinico e appare altresì ragionevole la segnalazione tempestiva

della presenza di emolisi nel campione al reparto richiedente, secondo modalità definite localmente con la direzione e i reparti clinici.

L'emolisi *in vivo* si accompagna frequentemente ad un'anemia normocromica e normocitica, accompagnata da un grado variabile di reticolocitosi ed emoglobinuria. La diminuzione di aptoglobina plasmatica è tradizionalmente considerata un indice affidabile nell'identificare l'accelerata distruzione in circolo dei GR. Al contrario di altri potenziali marcatori, l'aptoglobina non è influenzata dall'emolisi *in vitro*, poiché i complessi aptoglobina-emoglobina generati dopo la lisi delle emazie in circolo sono rapidamente metabolizzati dai monociti e macrofagi dei tessuti mediante il recettore CD163. La determinazione dell'aptoglobina è oggi disponibile su molti strumenti automatizzati di chimica clinica ed è quindi utilizzabile sia in routine che in urgenza, rappresentando uno strumento potenzialmente utile allorquando si renda clinicamente necessario distinguere tra anemia emolitica ed emolisi *in vitro*.

Relativamente all'utilizzo di questo marcatore come indice di emolisi intravascolare esistono tuttavia alcune considerazioni aggiuntive che ne potrebbero limitare l'utilizzo clinico. In primis, la diminuzione della sua concentrazione plasmatica può essere mascherata da un contemporaneo aumento di sintesi, sempre possibile se coesiste una situazione flogistica in atto (aptoglobina è proteina di fase acuta). Inoltre, considerando che l'emivita dei complessi aptoglobina-Hb è molto breve, è possibile che tutta l'aptoglobina presente sia consumata rapidamente in caso di emolisi intravascolare, sia in presenza di crisi emolitica acuta, sia in caso di emolisi cronica, e non sia pertanto più quantificabile. In questa circostanza, potrebbe essere suggeribile l'utilizzo della emopessina. Infine, i complessi aptoglobina-emoglobina si generano anche *in vitro*. Pertanto, qualora si debba misurare l'aptoglobina in un campione emolizzato, deve essere valutata preliminarmente sui singoli sistemi analitici l'eventuale interferenza (infatti, i diversi anticorpi commerciali non reagiscono in egual misura con aptoglobina libera e legata all'emoglobina).

Recentemente è stato anche sviluppato un nuovo metodo basato sulla citometria a flusso per rilevare i GR danneggiati e basato su anticorpi anti-emoglobina. Le performance analitiche di questo test sono veramente ottimali per l'uso clinico, ma l'introduzione nella prassi quotidiana di laboratorio per lo screening dei campioni emolizzati è tuttavia ostacolata da ovvie ragioni tecniche, economiche e pratiche (20).

Interferenze dell'emolisi *in vitro* sugli esami di laboratorio

La presenza di emolisi nei campioni biologici riflette caratteristicamente un processo più generale di danneggiamento delle cellule ematiche e che coinvolge pertanto GR, globuli bianchi e piastrine. Il conseguente rilascio in circolo di molecole, proteine ed enzimi intracellulari può generare effetti importanti (e indesiderati) sull'attendibilità di alcuni esami di laboratorio. La Federazione Internazionale di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio (IFCC) fornisce una chiara definizione di interferenza analitica, che è "*errore di misurazione sistematico causato da un componente presente nel campione che di per sé non dovrebbe produrre un segnale nel sistema di misura*" (21). Selby ha fornito però un'altra definizione, forse anche più idonea e razionale in questo specifico contesto, e cioè "*effetto di una sostanza presente in un sistema analitico che causa la deviazione del valore misurato dal valore vero*" (22). Infine, il documento EP07-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) riporta la definizione di interferenza in termini di "*causa di errore sistematico, clinicamente significativo, nella determinazione della concentrazione di un analita, dovuto all'effetto di un altro componente o di una proprietà (chimico-fisica) del campione*".

In linea generale, la presenza di emolisi nel campione può inficiare l'attendibilità delle determinazioni mediante tre meccanismi: (i) rilascio di elementi ad elevata concentrazione intracellulare, che aumentano falsamente la concentrazione dei medesimi nel siero o nel plasma (es. potassio, transaminasi e lattato deidrogenasi, LDH); (ii) diluizione e relativa diminuzione spuria nel siero o nel plasma di alcuni analiti poco rappresentati all'interno del GR per fuoriuscita

dell'acqua intracellulare (es. sodio) e (iii) interferenza spettrofotometrica nella determinazione a causa di un aumento dell'estinzione (o "assorbanza"), modificazione del "valore di bianco" ("blank value"), soprattutto per i test basati su lettura spettrofotometrica a 415, 540 and 570 nm, cioè le lunghezze d'onda in grado di misurare l'emoglobina libera (es. gamma-glutamyl-transferasi, GGT); (iv) miscellanea di altre interferenze analitiche (es. diminuzione spuria della bilirubina nella reazione di Jendrassik-Gróf a causa dell'attività pseudoperossidasi della emoglobina, aumentata attività della creatina chinasi a seguito del rilascio di adenilato chinasi intraeritrocitaria); (v) rilascio di sostanza ad azione tromboplastinica (3, 23-26) (Tabella 3). Peculiare è invece il comportamento del magnesio; infatti, pur essendo la concentrazione intraeritrocitaria di questo analita quasi il doppio di quella plasmatica, il suo aumentato rilascio dai GR è sovra-compensato da interferenza analitica nella sua determinazione causata dalla presenza di emoglobina libera, per cui l'effetto globale è solitamente quello di una sottostima.

Un discorso a parte meritano le determinazioni immunochimiche, per le quali malgrado sia provata un'interferenza, non è possibile definire a priori la direzione del "bias". Ad esempio, due articoli di recente pubblicazione hanno infatti dimostrato che l'emolisi può alterare significativamente alcune determinazioni di troponina, per lo più metodo-dipendenti. Nel primo studio è stato osservato un calo fino al 50% della concentrazione di troponina T ad alta sensibilità e contestualmente un aumento fino al 576% di troponina I per valori di emolisi elevati, superiore a 600 mg/L (27). Nel secondo studio, i risultati sono sovrapponibili, con variazioni significative della determinazione delle troponine per valori di emolisi superiori a 1.9 g/L (28). Un ultimo studio non ancora pubblicato (Daves et al) ha confermato che per valori di emolisi modesti o lievi (cioè <600 mg/L), i valori di troponina I e T sono ancora attendibili.

Nel corso degli ultimi anni sono stati prodotti numerosi studi volti a definire l'interferenza dell'emolisi sui test di laboratorio. L'eterogeneità nel disegno degli studi, delle piattaforme analitiche e soprattutto delle diverse tecniche analitiche non consente di produrre un quadro d'insieme univoco, poiché i differenti metodi possono essere più o meno sensibili all'interferenza. Dovrebbe anche essere compito specifico dei produttori definire con precisione degli effetti dell'emolisi sulla determinazione dei vari analiti e il personale di laboratorio dovrebbe verificare successivamente contro quale target è stata valutata l'accettabilità del bias. In tabella 3 sono sintetizzate le evidenze clinico/analitiche di riferimento. Come detto, è tuttavia consigliabile che ogni laboratorio valuti localmente, in funzione della piattaforma analitica e del metodo utilizzato, il grado di emolisi oltre il quale i risultati del test devono essere definiti inattendibili. Un metodo facilmente utilizzabile a questo scopo prevede l'aggiunta di concentrazioni scalari di emolisato (ottenuto ad esempio mediante congelamento per almeno 24 ore di sangue intero autologo) in aliquote di siero o plasma e valutazione del *bias* usando come riferimento i limiti delle specificazioni desiderabili di qualità definite sulla base della variabilità biologica intra- e inter-individuale (29) o della differenza critica.

Identificazione dei campioni emolizzati

L'emolisi in vitro rappresenta un problema significativo per il laboratorio clinico, anche perché è identificabile solo dopo che il campione ha subito il processo di centrifugazione, con separazione di siero o plasma dagli elementi corpuscolati del sangue. Ciò è ovviamente possibile in laboratori che dispongano di sistemi "aperti" (strumentazione preanalitica separata da quella analitica), ma è virtualmente impossibile in laboratori che utilizzino sistemi "chiusi", in cui la strumentazione di preanalitica è in serie ("in catena") con quella analitica. Contestualmente, la rilevazione di emolisi è virtualmente impossibile nei campioni di sangue intero (ad esempio campione per esame emocromocitometrico o velocità di eritrosedimentazione). In quest'ultima circostanza, l'unica possibilità d'identificazione del problema - rappresentata dalla centrifugazione sistematica di tutti i campioni dopo l'analisi - presenta considerevoli problemi di natura organizzativa e soprattutto di attendibilità clinica, qualora si rendesse necessario risospendere e rianalizzare il campione dopo che è stato centrifugato.

Sulla base delle premesse, l'identificazione dei campioni emolizzati appare essenziale, poiché (i) l'emolisi potrebbe sottendere o riflettere patologie gravi responsabili o associate ad anemia emolitica che richiedono una urgente notifica ai clinici; (ii) alcuni test su campioni emolizzati in vitro determinano risultati inattendibili, che non riflettono la condizione *in vivo* e possono portare a conseguenze potenzialmente negative sull'outcome del paziente a causa di decisioni diagnostico-terapeutiche inadeguate. Tradizionalmente, i campioni emolizzati sono stati identificati arbitrariamente, mediante ispezione visiva del campione da parte del personale del laboratorio. Nonostante la quantificazione dell'emoglobina libera nel siero o plasma sia teoricamente possibile utilizzando saggi immunonefelometrici, l'utilizzo di questo approccio di routine su tutti i campioni è poco pratico (aumento del *turnaround time*, indisponibilità del test sulla strumentazione in urgenza) e comunque gravato da costi proibitivi. Recenti sviluppi tecnologici hanno consentito di progettare e implementare su molte strumentazioni di laboratorio alcune tecniche innovative completamente automatizzate per la rilevazione del grado di emolisi (indice di emolisi o HI) e di altre sostanze potenzialmente interferenti, quali lipemia e bilirubina (complessivamente denominati "indici del siero") (23,24). Nella maggior parte dei casi, gli strumenti forniscono una misura qualitativa o quantitativa dell'emoglobina libera presente nel campione. Comprensibilmente, questa misura non ha finalità cliniche o diagnostiche, ma è utilizzata per dare un giudizio oggettivo sulla qualità globale del campione in analisi. L'operatore può adottare le soglie di indice d'emolisi prestabilite dal produttore, o adattare localmente, per generare un avviso strumentale qualora l'indice ecceda i limiti, trasmettere il risultato dello stesso indice di emolisi sul referto e stabilire il grado di interferenza sulle analisi richieste onde aggiungere commenti o sopprimere il risultato.

Pur con alcune differenze nell'approccio tecnologico alla quantificazione degli indici del siero, i sistemi in commercio si basano essenzialmente sul monitoraggio dell'assorbimento del siero o del plasma a diverse lunghezze d'onda (tradizionalmente tra 340 e 670 nm). Mediante risoluzione di una serie di equazioni predefinite, ogni indice viene calcolato, ed è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza interferente nel campione. È palese che questo approccio (valutazione dell'indice d'emolisi sui campioni) determina numerosi benefici. In primo luogo, è un sistema oggettivo, facile, veloce e relativamente poco costoso per standardizzare la prassi di rilevazione dei campioni emolizzati tra i vari laboratori, in accordo con quanto definito dal Working Group dell'IFCC (30), superando così il limite del controllo visivo, che è intrinsecamente soggettivo e arbitrario. Il rilevamento automatico consente poi di aumentare la probabilità di intercettare i campioni emolizzati prima che siano analizzati e velocizza le azioni da intraprendere sui medesimi. Per gli strumenti che forniscono risultati quantitativi, l'indice d'emolisi può essere utilizzato come misura attendibile del grado d'interferenza, qualora si decidesse - prassi peraltro sconsigliata da queste raccomandazioni - di correggere matematicamente alcuni parametri sulla base della concentrazione di emoglobina libera presente nel campione. Infine, la valutazione sistematica dell'indice d'emolisi può essere vantaggiosamente utilizzata per definire le qualità dei prelievi e del trasporto dei campioni, soprattutto come indice delle performance del personale sanitario deputato a questa operazione (31). Rimane tuttora da definire con certezza il potenziale bias determinato dalla presenza di altri interferenti quali ittero e lipemia nella determinazione dell'indice d'emolisi.

Il primo studio multicentrico (32), basato sull'invio di campioni di siero a concentrazione nota di emoglobina libera a diversi laboratori per la valutazione dell'indice di emolisi su sei differenti piattaforme analitiche di quattro diversi produttori, ha evidenziato una sostanziale riproducibilità ($p=0.911$ per risultati ottenuti su strumenti differenti, mediante test di Kruskal Wallis), imprecisione (coefficiente di variazione compresi da 0.1% a 2.7%) e omogeneità di rilevazione dell'interferenza, espressa in termini quantitativi o semiquantitativi. A dispetto della sostanziale comparabilità dei risultati grezzi, è stata però evidenziata una discreta disomogeneità nei limiti decisionali stabiliti dal produttore, cosicché campioni caratterizzati da emolisi modesta (~ 0.5 g/L) venivano considerati idonei all'analisi su alcune strumentazioni ma non su altre. Ciò

evidenzia la necessità di una maggiore standardizzazione o omogeneizzazione dei comportamenti e - a maggior ragione - la validità del concetto di definire localmente il grado di interferenza dell'emolisi sui singoli parametri e l'aggiustamento contestuale delle soglie predefinite. Un secondo aspetto critico, che deve essere ancora definito con precisione, è relativo all'impatto dell'esecuzione dell'indice d'emolisi sul TAT dei risultati.

Gestione dei risultati ottenuti su campioni emolizzati

La procedura più idonea per la gestione dei risultati ottenuti su campioni emolizzati è tuttora fonte di accesi dibattiti. Un sondaggio recentemente effettuato in Croazia, ha evidenziato come solo il 47% dei partecipanti abbia indicato una modalità di richiesta di altri campioni allorquando su quelli ricevuti in precedenza sia stato rilevato un grado di emolisi elevato. Nel suddetto sondaggio collaborativo EPSC/IFCC WG-LEPS (8), al quesito "come sono gestiti i campioni emolizzati nella tua realtà", il 44% degli intervistati ha espresso la risposta "*si eseguono tutte le analisi richieste con soppressione dei risultati dei test inattendibili per la presenza di emolisi*", mentre il 56% degli intervistati ha espresso la risposta "*viene rigettato il campione e ne viene richiesto un altro*". Nessun laboratorio ha indicato strategie alternative (ad esempio, "*si eseguono tutte le analisi richieste con soppressione dei risultati dei test inattendibili per la presenza di emolisi e viene richiesto un altro campione*", "*correzione dei risultati per l'indice di emolisi e produzione nel referto del commento < esami eseguiti su campioni emolizzati >*" o "*refertazione del risultato e aggiunta di un commento, del tipo < sovrastima della concentrazione di potassio: escludere emolisi in vivo o di ripetere il prelievo >*". Alla luce di quanto espresso in precedenza ed espresse nelle raccomandazioni per l'identificazione e gestione dei campioni non idonei precedentemente redatte in precedenza dal nostro Gruppo di Studio (33,34), l'approccio più consono sembra essere quello basato su: (i) immediata notifica al reparto della presenza di emolisi del campione secondo modalità definite localmente; (ii) soppressione di tutti i test influenzati dalla presenza e/o grado di emolisi definito localmente; e (iii) richiesta tempestiva di un secondo campione sul quale eseguire gli esami precedentemente soppressi. Questa procedura, con l'eventuale consulenza da parte del laboratorio per la situazione specifica, dovrebbe consentire di confermare o confutare l'ipotesi che il paziente sia affetto da anemia emolitica (3,35).

In merito alla soppressione degli esami, come già detto, questa prassi dovrebbe basarsi su considerazioni relative all'interferenza osservata con la strumentazione e il metodo in uso o, al più, utilizzando come riferimento generico i dati riportati in tabella 3. In linea generale, vale però il principio che un'emolisi lieve (emoglobina libera <50 mg/L) e appena visibile ad occhio nudo non altera sostanzialmente i test di laboratorio, un'emolisi modesta (emoglobina libera >50 e <600 mg/L) altera significativamente pochi parametri (Tabella 3), mentre nei campioni con emolisi elevata (emoglobina libera >600 mg/L) molti parametri possono essere alterati. Infine, nei campioni con grado elevato d'emolisi (es. emoglobina libera >2 g/L), tutti i parametri di chimica clinica e coagulazione sono potenzialmente alterati, per cui sarebbe consigliabile non procedere con alcun test e richiedere sempre un secondo campione. L'identificazione di campioni emolizzati deve poi essere sempre registrata, secondo le modalità espresse dalle raccomandazioni per l'identificazione e gestione dei campioni non idonei precedentemente redatte dal Gruppo di Studio (33,34).

Ringraziamenti

Si ringraziano Maria Stella Graziani, Anna Lucia Caldini e Giuliano Deri per i validi suggerimenti nella stesura del documento.

Bibliografia

1. Franco, RS. The measurement and importance of red cell survival. *Am J Hematol* 2009;84:109.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th Edition. Lyon Cedex: WHO Press; 2008.
3. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:764-72.
4. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem* 2000;46:306-7.
5. Romero A, Muñoz M, Ramos JR, et al. Identification of preanalytical mistakes in the stat section of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:974-5.
6. Burns ER, Yoshikawa N. Hemolysis in serum samples drawn by emergency department personnel versus laboratory phlebotomists. *LabMedicine* 2002;33:378-80.
7. Lippi G, Bassi A, Brocco G, et al. Preanalytic error tracking in a laboratory medicine department: results of a 1-year experience. *Clin Chem* 2006;52:1442-3.
8. European Preanalytical Scientific Committee. Available at: <http://specimenscare.com>.
9. Lippi G, Ippolito L, Fontana R. Prevalence of hemolytic specimens referred for arterial blood gas analysis. *Clin Chem Lab Med* 2011 Jan 25. [Epub ahead of print].
10. Ong ME, Chan YH, Lim CS. Reducing blood sample hemolysis at a tertiary Hospital Emergency Department. *Am J Med* 2009;122:1054.
11. Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM Jr. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician* 2004;69:2599-606
12. Hoffman R, Furie B, Benz EJ, McGlave P editors. Hematology: Basic Principles and Practice 5th Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009.
13. Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, et al. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1369-80.
14. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol* 2007;29:21-41.
15. Lippi G, Simundic AM. Total quality in laboratory diagnostics. It's time to think outside the box. *Biochem Med* 2010;20:5-8.
16. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, et al. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:358-65.
17. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. *Clin Lab* 2006;52:217-30.
18. Lippi G, Caputo M, Banfi G, et al, per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL-CISMEL sulla Variabilità Extra-Analitica del Dato di Laboratorio. Raccomandazioni per il prelievo di sangue venoso. *Biochim Clin* 2008;32:569-77.
19. Ismail A, Shingler W, Seneviratne J, et al. In vitro and in vivo haemolysis and potassium measurement. *Br Med J* 2005;330:949.
20. Lee W, Kim Y, Lim J, et al. Rapid, sensitive diagnosis of hemolytic anemia using antihemoglobin antibody in hypotonic solution. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32:37-43.
21. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4. <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol13no4/130401002.htm>.
22. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann. Clin Bioch* 1999;36:704-21.
23. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJ, et al. Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:413-9.

24. Vermeer HJ, Steen G, Naus AJ, et al. Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:114-9.
25. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:311-6.
26. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, et al. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:181-4.
27. Florkowski C, Wallace J, Walmsley T, et al. The effect of hemolysis on current troponin assays--a confounding preanalytical variable? *Clin Chem* 2010;56:1195-7.
28. Bais R. The effect of sample hemolysis on cardiac troponin I and T assays. *Clin Chem* 2010;56:1357-9.
29. Westgard J. Biological Variation Database specifications. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
30. Sciacovelli L, Plebani M. The IFCC Working Group on laboratory errors and patient safety. *Clin Chim Acta* 2009;404:79-85.
31. Plebani M, Lippi G. Hemolysis index: quality indicator or criterion for sample rejection? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:899-902.
32. Lippi G, Salvagno GL, Blanckaert N, et al. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:934-9.
33. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, et al. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:728-36.
34. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, et al. Raccomandazioni per la rilevazione e gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2007;31:216-24; *RIMeL - IJLaM* 2007; 3:124-34.
35. Simundic AM, Topic E, Nikolac N, et al. Hemolysis detection and management of hemolysed specimens. *Biochem Med* 2010;20:154-9.

SINTESI DELLE RACCOMANDAZIONI

Queste raccomandazioni sono state prodotte con un sistema di grading per quanto riguarda la “forza delle raccomandazioni” che da esse possono essere derivate (dall’inglese “*strength of recommendations*”), espresso in lettere (da A ad E) (Tabella 4).

a) Rilevazione sistematica dell’emolisi nei campioni

- E’ raccomandata la rilevazione sistematica dell’emolisi nei campioni di siero o plasma. *Raccomandazione di grado A.*
- E’ raccomandata la rilevazione sistematica dell’emolisi nei campioni di sangue intero (es. campione per esame emocromocitometrico o emogasanalisi). *Raccomandazione di grado D.*
- Per i sistemi aperti, in cui sia possibile visualizzare la qualità del campione dopo centrifugazione, la valutazione del grado di emolisi dei campioni si basa su una prima ispezione visiva volta ad identificare la presenza di emolisi, seguita dalla determinazione dell’indice di emolisi in tutti i campioni in cui l’emolisi sia sospettata visivamente. *Raccomandazione di grado B.*
- Per i sistemi chiusi, in cui non sia possibile visualizzare la qualità del campione dopo centrifugazione (es. strumenti in catena, con connessione seriale tra strumentazione preanalitica ed analitica), la valutazione del grado di emolisi deve essere eseguita sistematicamente mediante determinazione dell’indice di emolisi in tutti i campioni. *Raccomandazione di grado A.*
- Il metodo raccomandato per la quantificazione del grado di emolisi è basato sulla determinazione automatizzata dell’indice di emolisi. *Raccomandazione di grado A.*
- Per i laboratori in cui non sia disponibile la determinazione dell’indice di emolisi automatizzata, è possibile basarsi sull’ispezione visiva, mediante confronto con una foto a colori che riporti chiaramente campioni con limiti di emolisi scalari (Figura 1). *Raccomandazione di grado A.*
- L’identificazione di campioni emolizzati deve essere sempre registrata, secondo le modalità espresse dalle raccomandazioni per l’identificazione e gestione dei campioni non idonei precedentemente redatte dal Gruppo di Studio (33). *Raccomandazione di grado A.*

b) Rilevazione della natura dell’emolisi nel campione

- Segnalare tempestivamente al reparto richiedente la presenza di emolisi nel campione, secondo modalità definite localmente con la direzione ed i reparti clinici. *Raccomandazione di grado A.*
- La determinazione dell’aptoglobina su campioni francamente emolizzati (es. emoglobina libera >600 mg/L) non si esegue di routine, ma può essere eseguita nel sospetto di anemia emolitica, allorquando altri parametri biochimici (es. anemia, più frequentemente normocromica e normocitica, presenza di reticolocitosi ed emoglobinuria) e la situazione clinica lo consigliano (da valutare volta per volta, mediante audit con i clinici). *Raccomandazione di grado A.*

c) Definizione del grado d’interferenza dell’emolisi sugli esami richiesti

- Valutare localmente, in funzione della piattaforma analitica e del metodo utilizzato, il grado di emolisi oltre il quale i risultati del test possono essere definiti inattendibili. *Raccomandazione di grado A.*
- Per la valutazione dell’interferenza da emolisi, l’approccio raccomandato è la preparazione di una serie di campioni di prova, mediante aggiunta di concentrazioni scalari di emolisato (ottenuto ad esempio mediante congelazione per almeno 24 ore di sangue intero autologo) in aliquote di siero o plasma e valutazione del *bias* usando come

riferimento i limiti delle specificazioni desiderabili di qualità definite sulla base della variabilità biologica intra- e inter-individuale o della differenza critica. *Raccomandazione di grado A.*

- Le soglie dell'indice di emolisi predefinite dal produttore vanno verificate e aggiustate sulla base della valutazione eseguita localmente come ai due punti precedenti. *Raccomandazione di grado A.*
- Qualora non sia possibile definire localmente il grado di interferenza sui vari parametri, la tabella 3 può essere utilizzata come riferimento. *Raccomandazione di grado A.*

d) Gestione dei risultati ottenuti su campioni emolizzati

- Immediata notifica al reparto della presenza di emolisi del campione, secondo modalità definite localmente. *Raccomandazione di grado A.*
- Per interferenza “>↑↑” / “>↓↓” (Tabella 3), o calcolata localmente ed eccedente i limiti delle specificazioni desiderabili di qualità definite sulla base della variabilità biologica intra- e inter-individuale o della differenza critica, i risultati devono essere soppressi. *Raccomandazione di grado A.*
- Per interferenza “>↑↑” / “>↓↓” (Tabella 3), o calcolata localmente ed eccedente i limiti delle specificazioni desiderabili di qualità definite sulla base della variabilità biologica intra- e inter-individuale o della differenza critica, va richiesto di un secondo campione sul quale eseguire gli esami precedentemente soppressi. *Raccomandazione di grado A.*

Tabella 1. Patologie responsabili o associate ad anemia emolitica

Patologie ereditarie

1. Difetti nella sintesi emoglobinica
 - o Talassemia
 - o Anemia falciforme
2. Difetti della membrana eritrocitaria
 - o Sferocitosi e ellittocitosi ereditarie
 - o Emoglobinuria parossistica notturna (PNH)
3. Difetti del metabolismo eritrocitario
4. Deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e piruvato chinasi

Patologie acquisite

1. Patologie immuno-mediate
 - o Mycoplasma pneumoniae
 - o Anemia emolitica autoimmune
 - o Patologie autoimmunitarie (es. LES, leucemia linfatica cronica)
2. Ipersplenismo
3. Ustioni e traumi
4. Infezioni
 - o Malaria
 - o Clostridi
5. Danneggiamento “meccanico” in circolo
 - o Coagulazione Intravascolare Disseminata (CID)
 - o Sindrome emolitico-uremica
 - o Porpora trombotica trombocitopenica (TTP)
 - o Valvole cardiache
 - o Sindrome HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets)
6. Trasfusione incongrua
7. Farmaci, tossine ed altre cause meno frequenti.

Tabella 2. Cause principali di emolisi in vitro

- i. Dipendenti dal paziente
 - Vene fragili
 - Vene di difficile localizzazione
 - Prelievo in sede di ematoma
- ii. Dipendenti dall'operatore
 - Esperienza
 - Tentativi di prelievo non riusciti
 - Trapassamento della vena
 - Perdita della vena durante il prelievo
- iii. Dispositivo utilizzato per il prelievo
 - Uso di cateteri venosi o aghi a farfalla
 - Utilizzo di aghi di calibro ridotto (ad esempio, inferiori a 23 Gauge)
 - Imperfetta rimozione della soluzione antisettica dalla cute
 - Utilizzo prolungato del laccio emostatico
 - Raccolta in contenitori inadeguati
 - Inappropriato riempimento (insufficiente o eccessivo) della provetta
 - Trasferimento del sangue da siringa a provetta
- iv. Trattamento del campione immediatamente dopo il prelievo
 - Agitazione eccessiva o inadeguata
 - Miscelazione inadeguata con l'anticoagulante
- v. Trasporto del campione
 - Sistema di trasporto (sistemi pneumatici, corrieri)
 - Condizioni di trasporto (traumi meccanici, durata, temperatura ed umidità)
- vi. Trattamento del campione immediatamente prima dell'analisi
 - Ritardo di centrifugazione
 - Condizioni di centrifugazione (velocità, tempo, temperatura)
 - Inefficiente separazione di plasma o siero dagli elementi corpuscolati
 - Risospensione del campione dopo centrifugazione
- vii. Conservazione del campione
 - Ricentrifugazione
 - Condizioni di conservazione (temperatura e durata)

Tabella 3 – Interferenza dell'emolisi sui test di laboratorio.

Per interferenza “>↑↑” / “>↓↓” o calcolata localmente ed eccedente i limiti delle specificazioni desiderabili di qualità definite sulla base della variabilità biologica intra- e inter-individuale o della differenza critica, i risultati devono essere soppressi.

	Grado di Emolisi*		
	Lieve	Modesta	Elevata
Aumento spurio in siero o plasma a causa di rilascio di analiti ad elevata concentrazione intraeritrocitaria			
➤ Emoglobina (Hb)	-	-	↑ o ↓
➤ Potassio (K)	↑	↑↑	↑↑↑
➤ Lattato Deidrogenasi (LDH)	↑	↑↑	↑↑↑
➤ Aspartato Aminotransferasi (AST)	↑	↑↑	↑↑↑
➤ Alanina Aminotransferasi (ALT)	-/↑	↑	↑↑
➤ Creatinina (Crea)	-	-	↑
Effetti di diluizione per analiti a bassa concentrazione intraeritrocitaria			
➤ Albumina (Alb)	-	-	↓
➤ Cloro (Cl)	-	-	↓
➤ Glucosio (Glu)	-	↓	↓↓
➤ Sodio (Na)	-	-	↓
Interferenza chimica o spettrofotometrica			
➤ Fosfatasi Alcalina (ALP)	-	-	↓
➤ Bilirubina (Bil)	-	↑ o ↓	↑↑ o ↓↓
➤ Creatina kinasi (CK)	-	↑	↑↑
➤ Ferro	-	-	↑
➤ γ-glutamyl-transferasi (GGT)	-	-	↓
➤ Lipasi	-	-	↓
➤ Magnesio	-	-	↓
➤ Fosforo	-	-	↓
➤ Urea	-	-	↓
Determinazioni immunichimiche (es. troponina)	-	↑ o ↓	↑↑ o ↓↓
Rilascio di sostanze ad attività tromboplastinica			
➤ Tempo di protrombina (PT)	-	↑	↑↑
➤ D-dimero	-	↑	↑↑
➤ Tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT)	-	↓	↓↓
➤ Antitrombina	-	-	↓

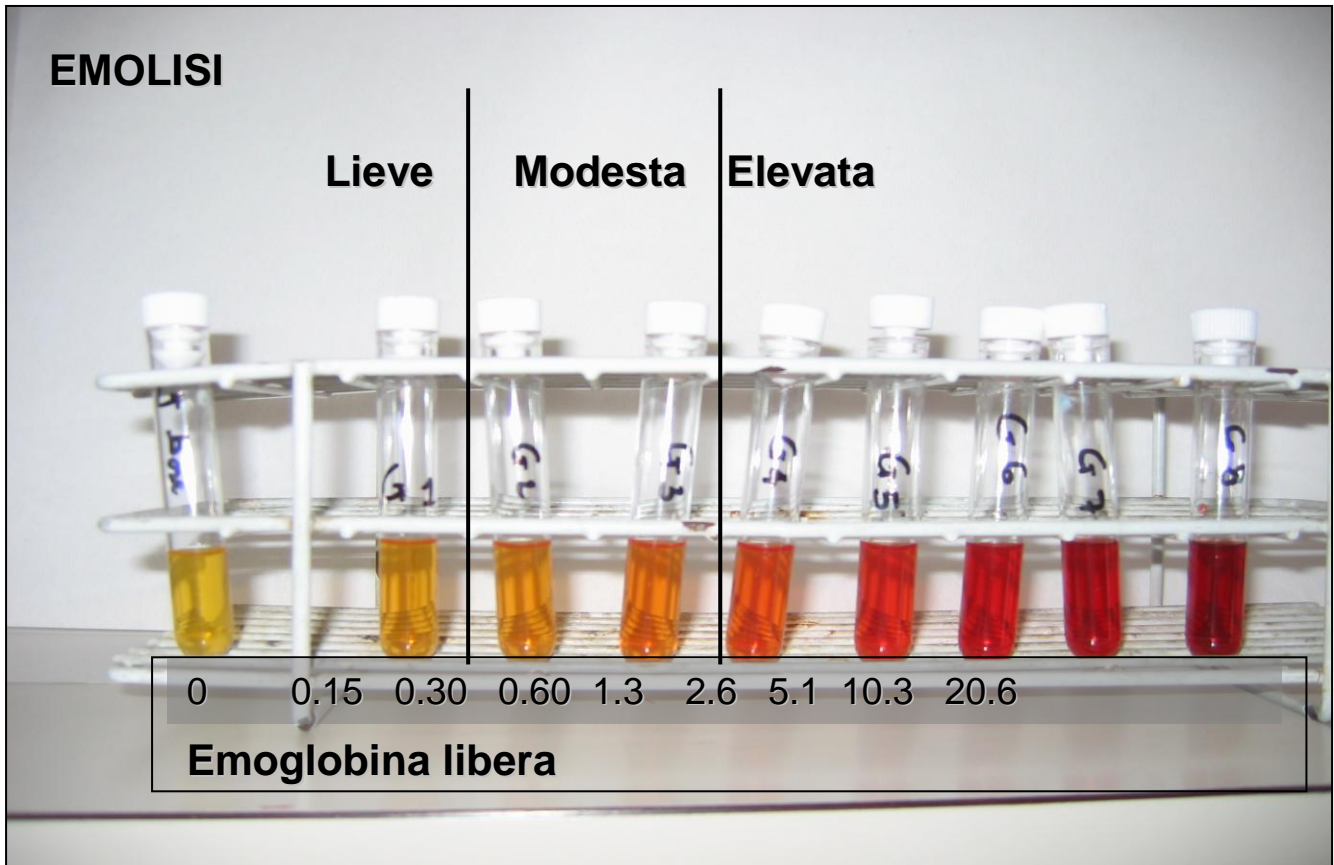
Lieve: <300 mg/L; modesta: 300-600 mg/L; elevata: >600 mg/L.

Tabella 4. Definizione della forza delle raccomandazioni, in accordo con le indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità

Indice	Spiegazione
A	L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità, anche se non necessariamente di tipo I o II
B	Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba sempre essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata.
C	Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o l'intervento.
D	L'esecuzione della procedura non è raccomandata
E	Si sconsiglia fortemente l'esecuzione della procedura

Figura 1.

Scala di emolisi nei campioni biologici.



This piece of the submission is being sent via mail.

*Conflict of Interest

é un articolo intersocietario bignogne chiedere la liberatoria a SIMeL e a SIBIOC