

## RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

L'interferenza da ittero.  
Raccomandazioni GdS VEA SIPMeLThe icterus interference. Recommendations from  
the Extra-analytical Variability Working Group of Italian Society  
for Clinical Pathology and Laboratory Medicine (GdS VEA SIPMeL)

Margherita MORANDINI \*

Laboratorio Analisi, ASFO, Pordenone, Italia

\*Autore di contatto: Margherita Morandini, Laboratorio Analisi, ASFO, Via B. D'Alviano 3, 33170 Pordenone, Italia.  
E-mail: [margherita.morandini@gmail.com](mailto:margherita.morandini@gmail.com)

## RIASSUNTO

Si definisce ittero il colorito giallo della cute, sclere e mucose prodotto da un'elevata concentrazione di bilirubina nel plasma. L'interferenza dell'ittero sugli esami di laboratorio è di tipo fisico (assorbimento della luce tra 400 e 520 nm) o di tipo chimico (interferenze con i reagenti dei metodi chimici o enzimatici). La presenza di interferenza da ittero nel plasma e la sua tipologia (aumento/diminuzione) dipende dal sistema metodo-strumento. In generale, si può sostenere che l'interferenza negativa sia più frequente e importante per la creatinina, le proteine totali, il colesterolo totale e HDL, l'ammoniaca, il folato e la tobramicina; mentre un'interferenza positiva può coinvolgere fosforo, magnesio, urea, FT3, testosterone, estradiolo, fruttosamina, acetaminofene, fenobarbitale, teofillina, paracetamolo. Il dibattito sull'interferenza da ittero sugli esami della coagulazione in strumenti foto-ottici non ha ancora risposte certe. I dati più recenti sulla frequenza dell'interferenza riferiscono lo 0,14% (0,06% sui test di creatinina, 2,2% su quelli per le proteine totali, 3,9% su quelli per l'ammoniaca). I metodi per la rilevazione dell'ittero sono essenzialmente tre: visivo, misurazione della bilirubina, determinazione automatica dei cosiddetti "indici del siero" (*hemolysis, icterus, lipemia* [HIL]). Questi ultimi sono ormai i più diffusi perché più accurati e attuabili sulla grande mole degli esami biochimici. Hanno, però, problemi relativi all'assicurazione di qualità e alle soglie di accettabilità, nonché quelli della mancata armonizzazione. Vi sono in letteratura suggerimenti sulla refertazione dei risultati dei test plasmatici interferiti: 1) per gli analiti con metodo di diluizione convalidato, si raccomanda di diluire; 2) per gli analiti senza metodo di diluizione convalidato o con LoQ (limite di quantificazione) clinicamente critico o dove la diluizione non riporta l'*I-index* all'interno dell'intervallo accettabile, si raccomanda di non riportare il risultato; e 3) per gli analiti in cui il produttore attesta non esserci interferenze fino alle concentrazioni massime di bilirubina testate, il risultato dovrebbe essere correato da un commento: "il campione altamente itterico può influenzare il risultato. Si raccomanda l'interpretazione all'interno del contesto clinico". L'interferenza da ittero negli altri liquidi biologici sui test biochimici parrebbe inferiore al 10%, a eccezione di trigliceridi (sottostima), creatinina e proteine (sovrastima). Nel liquido cefalo-rachidiano, dove la xantocromia può essere d'aiuto nella diagnosi di pregressa emorragia subaracnoidea, un'iperbilirubinemia oltre 20  $\mu\text{mol/L}$  determina una falsa positività. Per quanto riguarda le urine, la conoscenza della bilirubinuria e dell'urobilinogeno può mettere in allarme rispetto a falsi positivi dei chetoni, dell'esterasi leucocitaria e del glucosio e ai falsi negativi del pH e nitriti oltre che della creatinuria. L'interferenza da ittero non è tenuta in debito conto dai laboratori, come dimostrato dall'indagine del Working Group for the Preanalytical Phase di European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Tuttavia, l'interferenza da ittero rappresenta una sfida all'accuratezza del dato analitico e dell'interpretazione clinica. Si raccomanda, pertanto, che: 1) i laboratori siano consapevoli dell'importanza di questa interferenza; 2) provvedano alla sua rilevazione attraverso metodi HIL automatizzati; 3) confermino il livello di bilirubina effettivamente interferente sui singoli test,

tenuto conto della specificità del sistema metodo-strumento; 4) trattino la refertazione degli esami plasmatici interferiti dall'ittero come sopra riportato; 5) tengano presente che un'iperbilirubinemia oltre 20 µmol/L determina falsa positività nel liquido cefalorachidiano per la diagnosi di pregressa emorragia subaracnoidea; e 6) utilizzino le informazioni del *dipstick* su bilirubinuria e urobilinogeno per la verifica di falsi positivi dei chetoni, dell'esterasi leucocitaria e del glucosio e di falsi negativi del pH e nitriti oltre che della creatininuria.

(Per citare questo articolo: Morandini M. L'interferenza da ittero. Raccomandazioni GdS VEA SIPMeL. Riv Ital Med Lab 2022;18:42-56. DOI: 10.23736/S1825-859X.22.00135-9)

## ABSTRACT

“Jaundice” is defined as the yellow color of the skin, sclera and mucous membranes produced by a high concentration of bilirubin in the plasma. The interference of jaundice on laboratory tests is of a physical type (absorption of light between 400 and 520 nm) or of a chemical type (interference with the reagents of chemical or enzymatic methods). The presence of icteric interference in the plasma and its type (increase/decrease) depends on the method-instrument system. In general, it can be argued that negative interference is more frequent and important for creatinine, total proteins, total and HDL cholesterol, ammonia, folate and tobramycin; while a positive interference can involve phosphorus, magnesium, urea, FT3, testosterone, estradiol, fructosamine, acetaminophen, phenobarbital, theophylline, paracetamol. The debate on icteric interference on coagulation tests in photo-optic instruments does not yet have certain answers. The most recent data on the frequency of interference refer to 0.14% (0.06% on creatinine tests, 2.2% on total proteins, 3.9% on ammonia). The methods for detecting icteric interference are essentially three: visual, bilirubin measurement, automatic determination of the so-called “serum indices” (hemolysis, icterus, lipemia [HIL]). The latter are now the most widespread because they are more accurate and feasible on the large amount of biochemical tests. However, some issues exist for quality assurance and acceptability thresholds, as well as for non-harmonization. There are recommendations in the literature on the reporting of interfered plasma results: 1) for analytes with validated dilution method, it is recommended to dilute; 2) for analytes without validated dilution method or with clinically critical LoQ (limit of quantification) or where the dilution does not bring the I-index within the acceptable range, it is recommended to cancel the results; and 3) for analytes in which the manufacturer certifies that there is no interference up to the maximum bilirubin concentrations tested, the result should be accompanied by a comment: “highly icteric sample may influence the result. Interpretation within the clinical context is recommended.” Icteric interference in other biological liquids on biochemical tests, with the exception of triglycerides (underestimation), creatinine and proteins (overestimation), would appear to be less than 10%. In the cerebrospinal fluid, where xanthochromy can help in the diagnosis of previous subarachnoid hemorrhage, hyperbilirubinemia over 20 µmol/L determines a false positivity. As for urine, bilirubinuria and urobilinogen can alarm the false positives of ketones, leukocyte esterase and glucose and false negatives of pH and nitrites as well as of creatininuria. Icteric interference is not taken into due account by laboratories, as demonstrated by the investigation of the Working Group for the Preanalytical Phase of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. However, icteric interference challenges the accuracy of the analytical data and clinical interpretation. It is therefore recommended: 1) that laboratories are aware of the importance of this interference; 2) to provide for its detection through automated HIL methods; 3) to confirm the level of bilirubin effectively interfering on the individual tests, taking into account the specificity of the method-instrument system; 4) to treat the reporting of plasmatic tests affected by icterus as reported above; 5) to keep in mind that hyperbilirubinemia over 20 µmol/L determines false positivity in the cerebrospinal fluid for the diagnosis of previous subarachnoid hemorrhage; and 6) to use the dipstick information on bilirubinuria and urobilinogen for the verification of false positives of ketones, leukocyte esterase and glucose and false negatives of pH and nitrites as well as in the determination of creatininuria.

**Key words:** Jaundice; Guidelines; Bilirubin.

## Introduzione

Si definisce “interferenza analitica” la deviazione dal valore “vero” dell'analita, causata dalla presenza di sostanze endogene o esogene, fonte rilevante di errore di laboratorio e di potenziale danno al paziente per errata diagnosi.<sup>1</sup> In dettaglio, una sostanza interferente nelle procedure analitiche è quella che, alla concentrazione data, provoca un errore sistematico nel risultato analitico. Nel caso di una determinazione quantitativa questo errore deve essere maggiore di un valore dato dalla deviazione

standard di un insieme di risultati, moltiplicato per un valore numerico che dipende dal livello di fiducia desiderato.<sup>2</sup> L'interferenza sui test biochimici dovuta all'emolisi, ittero o lipemia (*hemolysis, icterus, lipemia* [HIL]) è un problema comune nella pratica clinica di laboratorio. Tradizionalmente, l'identificazione e la quantificazione delle interferenze HIL sono state eseguite ispezionando visivamente i cambiamenti nel colore e/o limpidezza del siero o del plasma. I moderni analizzatori biochimici hanno sviluppato strumenti in grado di quantificare oggettivamente l'emoglobina, la bilirubina e la torbidità in campioni di

siero o plasma mediante l'uso di più misurazioni spettrofotometriche, in modo molto più accurato rispetto all'approccio tradizionale.<sup>3</sup> Il documento di riferimento per le interferenze sugli esami di laboratorio dovute a HIL è il CLSI C56-A del 2012.<sup>4</sup>

### Ittero: definizione, cause, laboratorio

Il termine ittero definisce il colorito giallo della cute, sclere e mucose prodotto da un'elevata concentrazione di bilirubina nel plasma.<sup>5</sup> Nei soggetti normali tale concentrazione varia da 0,3 a 1,0 mg/dL con livelli maggiori nei maschi rispetto alle femmine, in rapporto alle diverse quantità di emoglobina nei due sessi. L'iperbilirubinemia, tra 1,5 e 2,5 mg/dL, dà una colorazione giallognola delle sclere (subittero) e oltre 2,5 mg/dL un'analogha colorazione della cute e delle mucose. Non rientrano nella definizione di ittero condizioni di cute gialla dovute ad altre cause (pseudoit-

tero), come nella iperbetacarotenemia da assunzione alimentare<sup>6</sup> o secondaria<sup>7</sup> da farmaci per l'eritema solare e talora nel diabete e nell'ipotiroidismo.<sup>8</sup>

La bilirubina è il catabolita della protoporfirina IX dell'eme. Le diverse fasi fisiologiche del metabolismo della bilirubina sono sintetizzate nella Figura 1.

L'incremento di bilirubina può essere determinato da: 1) iperproduzione (Tabella I); 2) alterata captazione (da farmaci quali rifampicina e rifamicina, novobiocina, acido flavaspidico, probenecid), coniugazione (ittero neonatale, sindrome di Crigler-Najjar tipo I e II, sindrome di Gilbert, deficit acquisito di bilirubin uridin-difosfato glucuronil transferasi) e secrezione biliare (Tabella II); e 3) difetti multipli del metabolismo epatico (come nelle epatiti acute e croniche, cirrosi epatica, neoplasie epatiche primitive e secondarie, ittero benigno postoperatorio e a causa di molti farmaci).<sup>9</sup>

I metodi di laboratorio per la determinazione della bilirubina plasmatica si basano sulla spettrofotometria diretta, su metodi colorimetrici derivati dalla originaria reazione di van den Bergh con diazoreattivo,<sup>10</sup> su metodi enzimatici con la bilirubina ossidasi batterica e sull'uso di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) dopo purificazione dell'analita.<sup>11</sup> I valori di bilirubina si esprimono in unità convenzionali (mg/dL) o unità SI (μmol/L); 1 mg/dL corrisponde a 17,1 μmol/L.

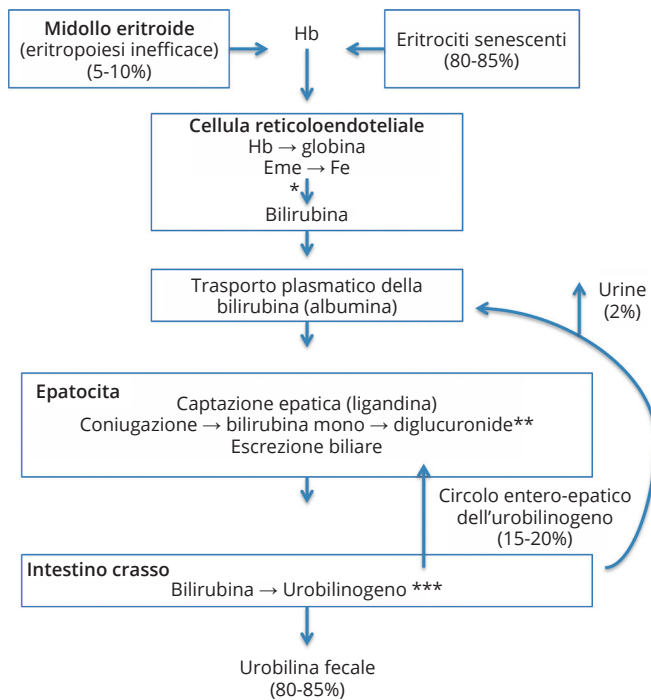


Figura 1.—Schema del metabolismo della bilirubina. La bilirubina è il catabolita della protoporfirina IX dell'eme. \*Nelle cellule reticuloendoteliali, sull'eme agisce un complesso enzimatico ternario (eme-ossigenasi, NADPH citocromo-reduttasi e biliverdina-reduttasi) per dare bilirubina; \*\*la bilirubina captata dall'epatocita è coniugata con acido glucuronico dalla bilirubin uridin-difosfato glucuronil transferasi in monoglucuronato (15%) e diglucuronato (85%); \*\*\*nell'ileo terminale e nel colon la bilirubina coniugata è idrolizzata e trasformata da enzimi batterici in urobilinogeno (urobilinogeno, mesobilirubinogeno, stercobilinogeno): il 15-20% viene riassorbito dal colon (90% ri-escreto, 10% nel torrente circolatorio); la maggior parte viene ossidata a urobilina escreta con le feci.

TABELLA I.—Itteri da iperproduzione di bilirubina.

<b>1. Itteri emolitici</b>
<b>a. Emolisi extravascolare</b>
Disordini della membrana eritrocitaria (sferocitosi ereditaria, ellissocitosi ereditaria)
Emoglobinopatie (drepanocitosi)
Difetti metabolici o enzimatici eritrocitari (deficit di piruvato-chinasi, deficit di G6PD)
Anemie emolitiche autoimmuni
Ipersplenismo
<b>b. Emolisi intravascolare</b>
Cause meccaniche
Coagulazione intravascolare disseminata
Porpora trombotica trombocitopenica
Reazione trasfusionale
Favismo
Attivazione autoimmune del complemento
Emoglobinuria parossistica notturna
<b>2. Itteri da eritropoiesi inefficace</b>
Sindromi talassemiche
Anemie sideroblastiche congenite
Anemie diseritropoietiche congenite
Anemie megaloblastiche
Anemie refrattarie
<b>3. Itteri da riassorbimento di stravasamento emorragico tissutale</b>
Ematoma profondo
Infarto emorragico

TABELLA II.—*Itteri da deficitaria escrezione biliare della bilirubina.*

<b>1. Colestasi intraepatica</b>
<b>a. Malattie congenite</b>
Sindrome di Dubin-Johnson
Sindrome di Rotor
Colestasi intraepatica benigna ricorrente
Colestasi intraepatica della gravidanza
<b>b. Malattie epatocellulari acquisite</b>
Epatite virale acuta e cronica
Epatite tossica e da farmaci
Cirrosi epatica
Neoplasie epatiche
Cirrosi biliare primitiva
Colangite sclerosante primitiva
Tesaurismi
<b>c. Ittero benigno postoperatorio</b>
<b>d. Colestasi da nutrizione parenterale</b>
<b>e. Farmaci</b>
Estroprogestinici
Metiltestosterone
Cloramfenicolo
<b>2. Ostruzione extraepatica</b>
<b>a. Calcolosi</b>
<b>b. Neoplasie</b> (primitive biliari o estrinseche ma comprimenti)
<b>c. Pancreatite cronica</b> con compressione dei dotti biliari
<b>d. Malformazioni</b> (stenosi, atresia, cisti del coledoco)
<b>e. Colangiti batteriche</b>

La determinazione spettrofotometrica diretta della bilirubina avviene a 454 nm, lunghezza d'onda di massimo assorbimento. Poiché a questa lunghezza d'onda assorbe anche l'ossiemoglobina, si sottrae dalla misura l'assorbimento a 520 nm perché l'ossiemoglobina assorbe la luce in egual misura anche a questa lunghezza d'onda. Tuttavia, la spettrometria diretta è interferita anche dai carotenoidi, che assorbono alla stessa lunghezza d'onda di 454 nm e possono dare risultati falsamente elevati. Pertanto, questo modo di misura è utilizzato nei neonati per la valutazione dell'ittero neonatale, perché fino a 3 mesi non vi è l'interferenza plasmatica da carotenoidi, e per le misure di bilirubina nel liquido amniotico e nel liquido cefalorachidiano.<sup>12</sup>

Per l'ittero neonatale è da tempo preferito il metodo di misura transcutanea della bilirubina, basato sulla luce riflessa valutata spettrofotometricamente nell'intero spettro della luce visibile (380-760 nm).<sup>13</sup>

Un metodo più specifico di quelli colorimetrici è stato sviluppato utilizzando l'enzima bilirubina ossidasi batterica, che la ossida a biliverdina. La bilirubina viene misurata come differenza di assorbanza tra 467 nm e 550 nm.<sup>14</sup> Tuttavia, vi sono segnalazioni in letteratura che esistono discrepanze tra metodi enzimatici e metodi colorimetrici o

HPLC riguardanti la bilirubina coniugata, per l'incompleta ossidazione a pH acido (3,7).<sup>15</sup>

La determinazione con HPLC, dopo trans-esterificazione in metanolo alcalino (i mono- e di-glucuronil derivati della bilirubina divengono mono- e di-metilesteri; la bilirubina non coniugata rimane immodificata), serve per studi specifici essendo il metodo più accurato e dà valori di bilirubina, in particolare di bilirubina coniugata, più bassi dei metodi colorimetrici nel plasma dei soggetti normali (bilirubina coniugata al 5% della bilirubina totale).<sup>12</sup>

La determinazione routinaria della bilirubina nel plasma o nel siero si esegue nella maggior parte dei Laboratori con metodi colorimetrici,<sup>16</sup> che per lo più si rifanno al metodo di van den Bergh di più di un secolo fa.<sup>10</sup> La reazione consiste nell'attacco nucleofilo di una molecola del diazo-reattivo di Ehrlich (cloruro di diazonio) all'atomo 9 o 12 del tetrapirrolo con formazione di due molecole di azodipirrolo, composto violetto dosabile spettrofotometricamente a 450 nm. La bilirubina coniugata reagisce direttamente col diazo-reattivo in soluzione acquosa (**bilirubina diretta**), mentre la bilirubina non coniugata reagisce col diazo-reattivo solo dopo esposizione a un solvente come l'alcol etilico o il metanolo in grado di rompere i ponti idrogeno intramolecolari (**bilirubina indiretta**). La classica reazione di van den Bergh prevede la misura della bilirubina diretta e di quella totale (dopo trattamento con solvente alcolico): la bilirubina indiretta si calcola per differenza (bilirubina totale meno bilirubina diretta).<sup>12</sup>

La reazione è delicata perché il diazo-reattivo, prodotto dall'interazione di nitrito di sodio e di acido sulfanilico, è interferita in modo complesso dall'emoglobina (almeno 4 livelli di interferenza) e pertanto richiede diversi interventi protettivi. Inoltre, il metodo è poco accurato perché il tempo di esposizione al diazo-reattivo è critico, le concentrazioni di bilirubina coniugata e non coniugata dipendono dalle condizioni di reazione (pH, forza ionica, temperatura, esposizione alla luce) e la reattività delle frazioni bilirubiniche ai due passaggi della reazione di van den Bergh non è così nettamente distinta. Quindi, alle concentrazioni fisiologiche la bilirubina totale e in particolare quella non coniugata sono sovrastimate, così come, in presenza di alte concentrazioni di bilirubina non coniugata, una quota di essa reagisce direttamente con il diazo-reattivo. Sono state proposte diverse modificazioni alla classica van den Bergh: 1) il metodo di Malloy e Evelyn (reazione a pH 1,2 e solvente metanolo; lettura a 560 nm); 2) il metodo di Jendrassik e Groff (reazione a pH 6,5; solubilizzazione in benzoato di sodio e caffeina; lettura a 600 nm dopo alcalinizzazione a pH 13); e 3) altre modifiche riguardano il sol-

vente della bilirubina non coniugata (dimetil solfossido, urea o antipirina) o il reagente base del diazo-reattivo (al posto dell'acido sulfanilico, la *p*-iodioanilina oppure etil-antranilato diazotizzato).<sup>11, 12</sup>

Nelle urine la misura della bilirubinuria, che può essere un importante segno di ittero a bilirubina coniugata, si basa sulla reazione con sali di diazonio (diversi nelle diverse strisce reattive) in ambiente acido e quella dell'uro-bilinogeno, suggestivo di ittero da iperproduzione, si basa sulla reazione aldeidica di Erlich (p-dimetil-ammino-benzaldeide) o sulla formazione di un azocolorante rosso da un composto diazonico.<sup>17</sup>

Nonostante i diversi problemi di accuratezza e specificità dei metodi colorimetrici per la bilirubina, la distinzione bilirubina diretta/coniugata vs. bilirubina indiretta/non coniugata nel sangue resta un passaggio fondamentale nella diagnostica degli itteri.<sup>18</sup> Gli itteri da iperproduzione sono a bilirubina prevalentemente non coniugata/indiretta (>80/85% del totale) anche se la bilirubina coniugata può essere aumentata in valore assoluto; quelli da ridotta captazione epatica sono legati a farmaci che prevalentemente provocano aumento di bilirubina coniugata/diretta; quelli da deficit di coniugazione epatica della bilirubina sono itteri a bilirubina non coniugata/indiretta; quelli da deficit

di escrezione biliare sono itteri da prevalente bilirubina coniugata/diretta (solitamente sopra il 60%) e quelli da difetti multipli sono per lo più contrassegnati dall'aumento della bilirubina sia coniugata che non coniugata. Entrambe gli ultimi due sono caratterizzati dalla presenza di bilirubinuria (Tabella III).

### Ittero come interferenza analitica nel sangue: meccanismi, caratteristiche, frequenza

L'interferenza dell'ittero nel sangue è di tipo fisico (specifiche proprietà spettrali con assorbimento della luce tra 400 e 520 nm e picco a 456 nm) o di tipo chimico (interferenze con i reagenti dei metodi chimici o enzimatici, come con l'intermedio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nella reazione Trinder).<sup>4</sup> Pertanto, i metodi colorimetrici e turbidimetrici possono essere interferiti dalla bilirubina, mentre i metodi a spettroscopia infrarossa (FTIR) possono essere interferiti nelle patologie con ittero per opera della concomitante iperlipidemia.<sup>19</sup> Entrambe le forme di bilirubina interferiscono con i test analitici tramite interferenza spettrale o interferenza chimica. Tuttavia, in alcuni casi, le forme coniugate e non coniugate di bilirubina hanno dimostrato di causare interferenza in direzioni opposte.<sup>4</sup>

TABELLA III.—Laboratorio degli itteri.

Cause	Bilirubinemia non coniugata	Bilirubinemia coniugata	Bilirubinuria	Note
<b>Iperproduzione</b>				
Emolisi	↑	N	-	Bilirubinemia raramente >4 mg/L
Eritropoiesi inefficace	↑	N	-	
<b>Deficit captazione</b>				
Farmaci	↑	N	-	
Sindrome di Gilbert (alcuni casi)	↑	N	-	
<b>Deficit di coniugazione</b>				
Ittero neonatale	↑	↓	-	Bilirubinemia raramente >5 mg/L
Sindrome di Gilbert (maggior parte di casi)	↑	↓	-	Bilirubinemia raramente >5 mg/L Test del digiuno
Sindrome di Crigler Najjar	↑	↓	-	Tipo I: bilirubinemia tra 20 e 45 mg/L Tipo II: bilirubinemia tra 6 e 20 mg/L
<b>Deficit di escrezione</b>				
<b>a. Ostruzione intraepatica</b>				
Familiari				
Sindrome di Dubin Johnson	↑	↑	+	Bilirubinemia tra 3 e 15 mg/L
Sindrome di Rotor	↑	↑	+	
Farmaci	↑	↑	+	
Colestasi intraepatica ricorrente benigna	↑	↑	+	
Ittero ricorrente della gravidanza	↑	↑	+	Bilirubinemia di solito <6 mg/L
<b>b. Ostruzione extraepatica</b>				
	↑	↑	+	Bilirubinemia tende a un plateau intorno a 30-40 mg/L
<b>Malattie epatocellulari</b>				
Epatiti	↑	↑	+	Bilirubinemia di solito non >50 mg/L;
Cirrosi	↑	↑	+	coniugata 50-70% del totale

Alti livelli di bilirubina sono correlati alle condizioni della malattia del paziente mentre l'emolisi è determinata principalmente da fattori preanalitici come la tecnica di flebotomia, il trasporto e la lavorazione del campione. In questo senso, l'ittero ha più somiglianza con la lipemia, dove condizioni patologiche come il diabete e le dislipidemie sono alla base di molti casi di questa interferenza. Tuttavia, a differenza della lipemia, l'ittero non è fortemente influenzato dallo stato della dieta (digiuno/non digiuno) o da farmaci/trattamenti come le emulsioni lipidiche o il propofol.<sup>20</sup>

Le informazioni sull'interferenza da ittero nel plasma dovrebbero far parte dalle valutazioni dei sistemi analitici del commercio. Tuttavia, vi sono anche valutazioni sistematiche orientate specificatamente alle interferenze HIL e a queste ci affideremo principalmente. Gli esami su plasma interferiti dall'ittero sono sintetizzati in Tabella IV.

Nel 2011, Ji *et al.*<sup>21</sup> hanno esaminato, per l'interferenza ittero, 48 analiti biochimici, immunochimici e tossicologici su Cobas 6000 Roche (Roche, Basilea, Svizzera), riscontrando falsi aumenti per ammoniaca, FT3, acetaminofene, gentamicina, fenobarbitale, teofillina e false diminuzioni per creatinina (metodo Jaffe), GGT, CK, calcio, CO<sub>2</sub>, HDLC, proteine totali, acido urico, IgG, βHCG, tobramicina. Altre fonti segnalano il falso incremento della determinazione del magnesio e la falsa diminuzione di acidi biliari e della lipasi.<sup>22</sup> Reagenti e strumenti sono ugualmente importanti nelle performance dei sistemi di fronte all'interferenza da ittero, come di fronte alle altre classiche interferenze HIL. L'adattamento del metodo Randox Enzymatic Manual UV Ammoniaca (Randox Laboratories, Sidney, Australia) sulla piattaforma dell'analizzatore automatizzato Roche Cobas 6000 (c501) migliora di molto le prestazioni dell'analita: il metodo Randox non è interferito con, indice itterico fino a 60 mentre il metodo originale è interferito a un indice itterico pari a 10.<sup>23</sup>

L'interferenza della bilirubina coniugata su Roche Cobas 6000 CE è stata studiata anche da Ali *et al.*<sup>24</sup> su 24 pa-

rametri: ALT, AST, albumina, calcio, CK, creatinina (metodo Jaffe), proteina C reattiva, colesterolo totale, GGT, glucosio, colesterolo HDL, LDH, lipasi, mioglobina, NT-proBNP, ALP, proteine totali, trigliceridi, cTnT, acido urico, urea. Gli analiti interferiti negativamente dall'ittero includono creatinina, colesterolo totale, colesterolo HDL, proteine totali e trigliceridi. L'interferenza osservata dipende dalla concentrazione dell'analita. Per creatinina, colesterolo totale, colesterolo HDL e proteine totali l'interferenza compare a basse concentrazioni ma diminuisce o addirittura scompare per alte concentrazioni. L'interferenza osservata sulla misurazione dei trigliceridi appare per un indice di ittero equivalente a 100 indipendentemente dalla concentrazione di trigliceridi testata.

Su Vista 1500 Siemens (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany), Bruneel *et al.*<sup>25</sup> hanno dimostrato moderata interferenza negativa per ALT, AST, calcio, LDH, colesterolo e positiva per ALP, cloruro, glucosio. La bilirubina totale (tBil) ha prodotto importanti interferenze negative su albumina (fino a -90% a 1,710 μmol/L), fosforo (tBil>427 μmol/L), proteine (tBil>213 μmol/L), e creatinina (metodo Jaffe) (tBil>106 μmol/L) e positiva verso Na (tBil>855 μmol/L) e urea (tBil>427 μmol/L). Per CO<sub>2</sub>, hs-CRP, K, NT-proBNP e cTnI, non è stata rilevata alcuna interferenza fino a 1,710 μmol/L di bilirubina.

Più recentemente, Nicolay *et al.*<sup>26</sup> hanno studiato, sempre su Cobas 6000 Roche, 16 analiti comuni con pool di sieri in un'ampia gamma di valori da 0 a 60 *Icterus Index* (*I-index*): ALT, AST, GGT, albumina, fosfatasi alcalina, amilasi, colesterolo totale, colesterolo HDL, creatinina (metodo enzimatico), fruttosamina, ferro totale, lipasi, fosforo inorganico, proteine totali, trigliceridi, acido urico. Sono interferiti in modo significativo, con falsi aumenti, fosforo e fruttosamina e, falsamente diminuiti, colesterolo totale, colesterolo HDL, creatinina, proteine totali, trigliceridi e acido urico. I livelli di bilirubina che danno interferenze significative (un *bias* di almeno il 10%<sup>4</sup>) sono diversi per gli analiti studiati: 5 *I-index* per fruttosamina; 15

TABELLA IV.—Interferenza dell'ittero sugli esami su plasma/siero.

Test	Aumento	Diminuzione
Test biochimici	Ammoniaca,* fosforo,* fruttosamina, magnesio,* trigliceridi,* urea*	Ammoniaca,* albumina,* acidi biliari, acido lattico, acido urico, CK, calcio, CO <sub>2</sub> , creatinina, colesterolo totale,* HDL-C, GGT, IgG, lipasi,* proteine totali, trigliceridi,* sodio*
Test ormonali	FT3, testosterone, estradiolo	βHCG, folato, (LH)
Test tossicologici	Paracetamolo, acetaminofene, fenobarbitale, teofillina	Tobramicina
Test coagulativi	PT,* aPTT,* TT,* fibrinogeno*	PT,* antitrombina,* D-dimero*

\*Dati contraddittori in dipendenza del sistema metodo-strumento (vedi testo e Tabella V).

per creatinina, colesterolo e proteine totali; 20 per HDLC e trigliceridi; 40 per acido urico.<sup>26</sup>

Viceversa, Ho *et al.*<sup>27</sup> esaminando i 35 più comuni test di chimica clinica su Alinity c Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), hanno riscontrato un'interferenza negativa sui valori di colesterolo totale e acido lattico per concentrazioni di bilirubina non coniugata >68,4 µmol/L e sui valori di proteine totali per concentrazioni di bilirubina >171 µmol/L, mentre a quest'ultima concentrazione di bilirubina era presente un'interferenza positiva sui trigliceridi. Non vi era interferenza sulla creatinina con metodo enzimatico.

La creatinina è ben conosciuta come il principale analita plasmatico interferito dall'ittero con il metodo chimico.<sup>4</sup> Nel metodo di Jaffé, la formazione del complesso picrato di creatinina è misurata alla lunghezza d'onda di circa 500 nm. L'ossidazione della bilirubina a biliverdina in soluzioni alcaline riduce l'assorbanza sia del complesso creatinina-picrato sia della bilirubina al picco di assorbanza di 510 nm e aumenta l'assorbanza della biliverdina al picco di assorbanza di 620 nm. L'effetto interferente dipende dallo specifico metodo utilizzato: assumendo come metodo di riferimento ID-LC/MS (*isotope dilution-liquid chromatography mass spectrometry*), Nah *et al.*<sup>28</sup> hanno saggiato due metodi enzimatici e quattro metodi chimici basati sul picrato alcalino e hanno dimostrato interferenze a livelli di ittero tra 53,0 e 97,2 µmol/L in tre metodi chimici. Inoltre, la calibrazione è apparsa un fattore critico anche sotto il profilo dell'interferenza. Ma la bilirubina può anche interferire negativamente con i metodi enzimatici, in particolare nei metodi basati sulla creatinina amidoidrolasi (creatininasi) per competizione tra la bilirubina e il substrato per l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta durante la reazione.<sup>29</sup>

Per quanto riguarda i marcatori miocardici, Kwon *et al.*,<sup>30</sup> su ACS 180SE, avevano dimostrato che la CK-MB e la troponina I erano influenzate da qualsiasi grado di iperbilirubinemia non coniugata e coniugata, mentre la mioglobina era influenzata solo da grave iperbilirubinemia nei campioni con concentrazione superiore all'intervallo di riferimento, con un'interferenza negativa. Tuttavia, Bénétteau-Burnat *et al.*, nella valutazione dello Stratus CS (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany), non hanno rilevato interferenze sui metodi per i marcatori cardiaci (troponina I, CK-MB e mioglobina) con bilirubina fino a 500 µmol/L.<sup>31</sup> Anche Kavsak *et al.*,<sup>32</sup> nel recente confronto del test Beckman Coulter Access hs-cTnI con il test hs-cTnI di Abbott (Abbott Laboratories) in diverse matrici e per diverse interferenze, con particolare attenzione alle concentrazioni <10 ng/L, hanno rilevato che né l'emolisi

né l'ittero hanno influenzato basse concentrazioni di hs-cTnI (<10 ng/L) poiché le differenze osservate rientravano nell'imprecisione consentita dei test hs-cTnI (±0,8 ng/L). Inoltre, Ali *et al.*<sup>24</sup> non hanno evidenziato interferenze da ittero sul dosaggio della cTnT. Infine, con immunodosaggio turbidimetrico *particle enhanced* completamente automatizzato per la misurazione della lipoproteina (a) non ci sono state interferenze significative da lipemia, ittero, emolisi, paraproteinemia, apolipoproteina B o plasminogeno.<sup>33</sup>

Per quanto riguarda gli esami ormonali, Ji *et al.*<sup>24</sup> avevano segnalato una interferenza negativa da ittero su βHCG. Su Immulite 2500 (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany)<sup>34</sup> sono stati studiati i seguenti 24 analiti: Alatop (screening per allergeni inalatori) e pannello alimentare 5 (screening per allergeni alimentari), IgE totali, a1-fetoproteina, CA 125, CA 15.3, CEA, ferritina, PSA, TSH, FT4, FT3, cortisolo, estradiolo, progesterone, testosterone, prolattina, hCG, LH, FSH, troponina I, NT-proBNP, acido folico e vitamina B12. L'interferenza da ittero testata con bilirubina altera i valori analitici di folato (interferenza negativa) e testosterone (interferenza positiva) e quella con ditauo-bilirubina i risultati di LH (interferenza negativa) e di testosterone ed estradiolo (interferenza positiva). Le interferenze clinicamente significative sono l'influenza positiva della bilirubina e della ditauo-bilirubina sul testosterone, rispettivamente a concentrazioni plasmatiche di 372 µmol/L (*I-index* 15) e 295 µmol/L (*I-index* 12) e l'influenza positiva della ditauo bilirubina sull'estradiolo alla concentrazione di 90 µmol/L (*I-index* 4). Gli autori suggeriscono che i campioni di pazienti con *I-index* superiori ai *cut-off* clinicamente significativi non devono essere refertati.

Argawal *et al.*<sup>35</sup> su campioni pediatrici e sistema Vitros 5600 (Ortho Clinical Diagnostics), hanno confermato che bassi livelli di estradiolo hanno mostrato un effetto significativo falsamente positivo in caso di ittero grave (*I-Index* >20,0). Hasanato *et al.*<sup>36</sup> hanno valutato l'interferenza di quantità progressivamente crescenti di emoglobina, bilirubina e lipidi aggiunti ai sieri in una serie di test immunologici. I seguenti test immunologici: ferritina, TSH, vitamina B12, progesterone e acido folico, hanno tutti mostrato gradi di interferenza variabili. Per l'interferenza itterica, è stata osservata una forte correlazione inversa per l'acido folico, statisticamente significativa ( $r^2=-0,94$ ;  $P=0,017$ ).

Come si vede, i risultati ottenuti da diversi ricercatori sono talora discrepanti (Tabella V).<sup>21, 24-27</sup> È importante tenere in conto che la presenza di interferenza da ittero e il tipo di interferenza, positiva o negativa, dipende dal sistema metodo-strumento. La creatinina (metodo colorimetrico)

TABELLA V.—Interferenza da ittero sugli esami biochimici: concordanze e discrepanze nelle principali fonti bibliografiche.

Autori/anno	Strumento	Analiti testati	Aumento	Diminuzione
Ji <i>et al.</i> <sup>21</sup>	Cobas 6000 Roche	48	Ammoniaca, FT3	Creatinina,* proteine totali, colesterolo HDL, urato, calcio, GGT, CK, acidi biliari, lipasi
Ali <i>et al.</i> <sup>24</sup>	Cobas 6000 Roche	24	-	Creatinina,* proteine totali, colesterolo, colesterolo HDL, trigliceridi, ALP
Nicolay <i>et al.</i> <sup>26</sup>	Cobas 6000 Roche	16	Fosforo, fruttosamina	Creatinina,* proteine totali, colesterolo, colesterolo HDL, urato, trigliceridi
Bruneel <i>et al.</i> <sup>25</sup>	Vista 1500 Siemens	37	Sodio, urea	Creatinina,* proteine totali, albumina, fosforo
Ho <i>et al.</i> <sup>27</sup>	Alinity c Abbott	35	Trigliceridi	Proteine totali, colesterolo, acido lattico (creatinina non interferita)**

\*Creatinina con metodo colorimetrico; \*\*creatinina con metodo enzimati co.

metrico) e le proteine totali sono gli analiti interferiti negativamente in tutte le ricerche qualunque sia lo strumento analitico sottoposto a indagine (Cobas 6000 Roche [Roche], Vista 1500 Siemens [Siemens Healthineers], Alinity c Abbott [Abbott Laboratories]).<sup>21, 24-27</sup> L'ammoniaca è segnalata con interferenza positiva<sup>21</sup> e negativa,<sup>26</sup> il fosforo<sup>37</sup> e il magnesio con interferenza positiva<sup>26</sup> o non significativa,<sup>21</sup> il colesterolo totale e la lipasi con interferenza negativa<sup>26</sup> o non significativa,<sup>29</sup> l'acido urico è interferito negativamente<sup>21, 26</sup> o non interferito<sup>24</sup> e così i trigliceridi (falsamente diminuiti<sup>24, 26</sup> o non interferiti<sup>21</sup>) benché saggiati sugli stessi strumenti Roche. Su strumentazione diversa le interferenze non coincidono: con strumentazione Abbott sono di segno negativo colesterolo totale e proteine totali, di segno positivo i trigliceridi e non significative per fosforo e magnesio<sup>17</sup> mentre con strumentazione Siemens<sup>24</sup> sono interferite in diminuzione albumina e fosforo ma non colesterolo totale, HDL colesterolo e trigliceridi.

Per quanto riguarda gli esami tossicologici, Ji *et al.*<sup>21</sup> hanno dimostrato interferenze da ittero in aumento per acetaminofene, gentamicina, fenobarbitale e teofillina e in diminuzione per la tobramicina. Per il dosaggio dell'acetaminofene vi sono state altre segnalazioni di false positività.<sup>38, 39</sup> È però importante valutare l'interferenza nello specifico metodo utilizzato. Recentemente su tre metodi per l'acetaminofene è stato dimostrato che l'ittero fino a un *I-index* di 40 non interferisce per due di essi (Syva EMIT e Microgenics DRI) mentre con il metodo Roche (Cobas 501 e Integra 800) vi è un effetto falsamente positivo a 20 mg/dL di bilirubina per concentrazioni >5 µg/mL, a 30 mg/dL di bilirubina per concentrazioni di 10 µg/mL e a 40 mg/dL di bilirubina per concentrazioni di 20 µg/mL.<sup>40</sup> Infine, è stata segnalata anche una falsa positività per il paracetamolo (14 mg/L vs. valori nella norma <4 mg/L) a livelli di bilirubina (307 µmol/L) appena al di sopra della soglia predeterminata dell'*I-index* di 15.<sup>41</sup> Segnalazioni più antiche di interferenza sul dosaggio dei salicilati<sup>42</sup> non hanno avuto ulteriori conferme.

In un'ampia ricerca sulle interferenze endogene ed esogene, i parametri dell'Equilibrio Acido-Base nei campioni di sangue intero hanno presentato minime o nulle alterazioni dovute all'ittero.<sup>43</sup> Anche i parametri dell'esame emocromocitometrico non appaiono interferiti dalla bilirubina.

Per quanto riguarda gli esami coagulativi, un'estesa rassegna di Lippi *et al.* del 2013,<sup>44</sup> dopo aver ricordato che a prime segnalazioni di interferenze significative con il metodo ottico su PT (abbreviazione), tempo di trombina (allungamento), fibrinogeno (incremento) e antitrombina (diminuzione)<sup>45</sup> si erano succedute numerose ricerche comparative tra metodi ottici e meccanici per la rilevazione del coagulo<sup>46-49</sup> con non significative differenze, concludeva che l'ittero non avesse interferenze significative su questi test anche con il metodo ottico con la scelta di opportune lunghezze d'onda. Tuttavia, successive ricerche hanno segnalato che la bilirubina causa interferenza nei metodi foto-ottici di misurazione degli esami della coagulazione per la sovrapposizione delle assorbanze spettrali.<sup>50</sup> In questo tipo di strumenti, a un *I-index* di 50, il PT ha un falso allungamento del 10% (5-20%) e il aPTT del 12% (5-22%). A concentrazioni molto elevate di bilirubina (*I-index* 60, bilirubina 45 mg/dL), l'allungamento di PT è del 18% (11-27%) e dell'aPTT del 22% (9-30%).<sup>51</sup> Però, ancora più recentemente, Seheult *et al.* hanno dimostrato che a 45 mg/dL di bilirubina il bias su PT, aPTT, DRVVT, tempo di trombina e l'attività cromogenica della proteina C è inferiore al 15%.<sup>52</sup> Anche Montaruli *et al.*,<sup>53</sup> esaminando PT, aPTT, fibrinogeno, antitrombina e D-dimero con metodo foto-ottico sostengono che l'ittero non interferisce significativamente su questi test. Mastella *et al.*<sup>54</sup> in risposta a questo lavoro, invece, segnalano interferenza da ittero sul D-dimero utilizzando metodi immunoturbidimetrici. Non vi è, quindi, una conclusione completamente accettata sul tema dell'interferenza da ittero sui test coagulativi.

La frequenza dell'interferenza ittero sui campioni di siero è stata recentemente valutata da Mainali *et al.*<sup>20</sup> per un



periodo di 12 mesi su 414.502 campioni di siero da 94.081 pazienti interni ed esterni. Lo 0,14% dei campioni aveva un *I-index* oltre la soglia di normalità (10) prevista dal produttore, con incidenza diversa sui singoli esami (0,06% sui test di creatinina, 2,2% su quelli per le proteine totali, 3,9% su quelli per l'ammoniaca). Le più comuni cause di ittero importante (*I-index* >40) sono state relative a malattie di fegato alcol-correlate (34 pazienti), malattie del tratto biliare (7 pazienti) e neoplasie (6 pazienti). Questi dati sono in linea con altre ricerche: Cradic *et al.*<sup>51</sup> segnalano un'incidenza dello 0,1% simile a quella riscontrata da noi. Dati coreani del 2014 sono più elevati: tra lo 0,7 e fino a 1,4% secondo lo strumento utilizzato (Modular vs. Vista)<sup>55</sup> in linea con dati europei del 2005 (0,54% in una ricerca olandese).<sup>56</sup> Quest'aspetto della discrepanza dei risultati dell'interferenza da ittero in base allo strumento utilizzato sottolinea la mancanza di armonizzazione dei metodi automatici di rilevazione delle interferenze. È importante, comunque, evidenziare che l'interferenza da ittero è molto meno frequente di quella da emolisi ma più frequente di quella da lipemia, secondo i dati più recenti.<sup>51</sup>

### Metodi di rilevazione e valutazione dell'interferenza da ittero nel plasma

I metodi per la rilevazione dell'ittero sono essenzialmente tre: visivo, misurazione della bilirubina, determinazione automatica dei cosiddetti "indici del siero" (HIL).

Il metodo visivo, usato per molti decenni, è oggi in disuso per i limiti dimostrati di bassa riproducibilità tra operatori ( $k=0,476$ ) e bassa confrontabilità con HIL ( $k=0,529$ )<sup>3</sup> e per l'impossibilità di utilizzarlo sulla mole dei campioni nei grandi laboratori (Figura 2).<sup>4</sup>

Il metodo di determinazione della bilirubina indica direttamente il valore al quale si produce interferenza. C'è un'eccellente correlazione tra l'indice itterico e la misurazione della bilirubina. Ma questo metodo non è pratico, in particolare quando i campioni sono molto numerosi. Piuttosto, è stato proposto che l'indice itterico (*I-index*) venga utilizzato per identificare i pazienti con iperbilirubinemia. Nella ricerca di Salinas *et al.*,<sup>57</sup> su 100.207 pazienti retrospettivi, l'analisi della curva ROC ha suggerito 34,2  $\mu\text{mol/L}$  (2 mg/dL) come soglia ottimale dell'indice itterico per identificare valori di bilirubina anormali. L'area sotto la curva era 0,981; l'equazione di regressione  $y=5,434+1,126x$ . Indipendentemente dalla popolazione di pazienti studiata (assistenza primaria, ospedale), la sensibilità era maggiore del 94% e la specificità era superiore al 98%. I valori del rapporto di verosimiglianza hanno fornito una forte evidenza che la bilirubina totale è inferiore

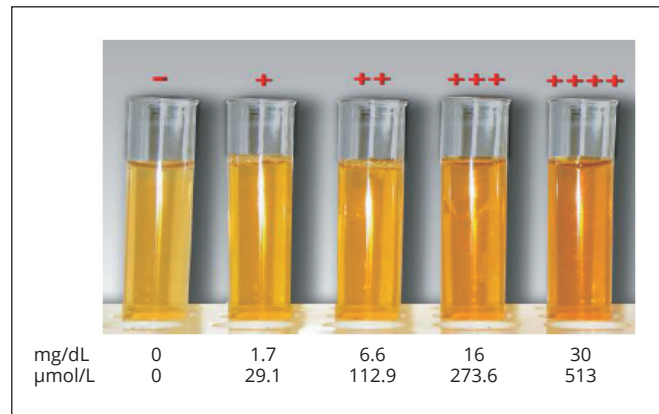


Figura 2.—Aspetto del siero itterico e corrispondenza con la quantificazione dell'interferenza itterica in scala ordinale e numerica secondo le unità convenzionali e quelle SI. Modificata da CLSI.<sup>4</sup> L'indice del siero per ittero (*I-Index*) uguale a 1 corrisponde, di solito, a 1 mg/dL e a 17,1  $\mu\text{mol/L}$ .

a 20,5  $\mu\text{mol/L}$  (<1,2 mg/dL) quando l'indice itterico è inferiore a 34,2  $\mu\text{mol/L}$  (<2 mg/dL). Numerose conferme di ciò vi sono nella successiva letteratura.<sup>58-63</sup> Recentissimamente Mondejar *et al.*<sup>64</sup> hanno analizzato 2 coorti di campioni non emolitici (43.372) ed emolitici (8507). L'analisi della curva ROC ha suggerito 21,4  $\mu\text{mol/L}$  come *cut-off* ottimale dell'indice I, ma sono state rilevate differenze di sensibilità e specificità tra le provenienze dei pazienti e quindi sono state selezionate soglie di *I-index* di 15,4  $\mu\text{mol/L}$  (ricoverati e pronto soccorso) e 17,1  $\mu\text{mol/L}$  (cure primarie e ambulatoriali) con una sensibilità del 97% e risultati falsi negativi dello 0,25%. Però, la sensibilità era molto più bassa nei campioni emolizzati: 34,2  $\mu\text{mol/L}$  di *I-index* come soglia ha rilevato l'iperbilirubinemia con una specificità del 99,7% e risultati falsi positivi dello 0,26%, indipendentemente dall'emolisi. Con i *cut-off* dell'indice itterico proposti, non si esegue il 66% delle bilirubine totali richieste e si analizza la bilirubina totale in circa il 2% di campioni dove non è richiesta, che sono dati intermedi rispetto alle ricerche nel campo (Tabella VI).<sup>57-64</sup> Ci sono alcuni limiti per questa applicazione, segnalati dagli stessi autori citati. L'*I-index* non è ancora approvato dalla Food and Drug Administration e le compagnie assicurative, in alcuni paesi, o il Servizio Sanitario, in altri, potrebbero non rimborsare un test non eseguito oppure non consentire l'aggiunta di test da parte del laboratorio. Alcuni strumenti non consentono di configurare i controlli di qualità interni per *I-index* come campioni di controllo di qualità e in questi casi queste strategie non dovrebbero essere applicate, anche se possono essere utilizzati controlli di qualità esterni. Inoltre, l'introduzione delle regole per questa strategia

TABELLA VI.—Utilizzo dell'I-index per la predizione del livello plasmatico di bilirubina totale.

Autori	Strumento	I-index cut-off	Sens. %	FN %	NPV %	n. soggetti	% Test risparmiati
Salinas <i>et al.</i> <sup>57</sup>	Roche Cobas c711	34,2 µmol/L	96,5	1,2	99,8	100.207	94
Szoke <i>et al.</i> <sup>58</sup>	Roche Cobas c501	34,2 µmol/L	99,6*	0,10	99,9	33.657	ND
	Integra 800		88,7°	2,10	97,4	44.474	
Pasqualetti <i>et al.</i> <sup>59</sup>	Abbott Architect c16000	13,7 µmol/L	99,6*	0,10	99,7	18.486	35
			98,6°	0,20	99,4	3.700	40
Zhang G-M, Hu Z-D <sup>60</sup>	Toshiba TBA 2000FR	21,0 M	99,0	0,51 M	99,5 M	8482 M	87,3 M
		17,0 F µmol/L		1,82 F	98,2 F	4496 F	87,2 F
Arbiol-Roca <i>et al.</i> <sup>61</sup>	Roche Cobas 8000	21,0 µmol/L	99,9	0,01	100	185.791	88
Lippi <i>et al.</i> <sup>62</sup>	Roche Cobas 8000	21,0 µmol/L	99,7	0,10	100	13.024	49
Roccaforte <i>et al.</i> <sup>63</sup>	Roche Cobas 8000	20,5 µmol/L	96,3	0,50	99,0	41.357	ND
Mondejar <i>et al.</i> <sup>64</sup>	Abbot Alinity c	15,4/17,1 <sup>s</sup> µmol/L	97,0	0,28	99,6	22.485	66

\*Siero; °plasma; <sup>s</sup>vedi testo.

Sens.: sensibilità; n.: numerosità; M: maschi; F: femmine; ND: non disponibile.

nel sistema informatico del laboratorio potrebbe condizionare i tempi di risposta generali del laboratorio. Infine, vi è l'importante problema della mancanza di armonizzazione per *I-index*, così come per gli HIL in generale, tra i produttori.<sup>64</sup>

Discrepanze tra il risultato di bilirubina e l'indice itterico di un paziente, inoltre, possono essere utilizzate per identificare l'interferenza nel dosaggio della bilirubina. Ad esempio, l'interferenza da paraproteina può causare falsi aumenti della bilirubina misurata con metodi diazo, ma non influire sull'indice itterico.<sup>65</sup>

La misura degli indici del siero oggi la più diffusa perché automatizzata, a basso costo, veloce, riproducibile, ben definita da standard internazionali come CLSI C 56 A.<sup>4</sup> Si eseguono con una diluizione del campione in soluzione salina, tampone o acqua e misura dello spettro di assorbimento in un ampio ambito di lunghezze d'onda; per l'ittero tra 340 e 800 nm, con preferenza per l'intervallo 478-524 nm. Tuttavia, vi è grande eterogeneità tra Produttori per le lambda utilizzate, le diluizioni e il diluente, l'espressione dei risultati e la loro interpretazione.<sup>66-68</sup> In generale, 1 unità di *I-Index* corrisponde a 1 mg/dL o a 17,1 µmol/L.

In particolare, anche per *I-Index*, non c'è una definizione universalmente accettata di interferenza significativa, con una ampia variazione di limiti decisionali suggeriti. Molti produttori applicano il criterio arbitrario del 10% suggerito da Glick *et al.* ancora 30 anni fa.<sup>69</sup> Alcuni autori suggeriscono di utilizzare l'errore totale ammissibile (CLIA) oppure l'errore totale ammissibile meno *bias*, imprecisione e variabilità fisiologica (CLSI);<sup>66</sup> altri consigliano di derivare un limite di accettabilità per l'interferenza direttamente dai dati di variazione biologica e/o analitica, per esempio utilizzando multipli di CVa (coefficiente di variazione analitico)<sup>27</sup> oppure le Specifiche Desiderabili di Imprecisione sulla base della variabilità biologica o il

RCV (*Reference Change Value*).<sup>27, 66</sup> Altri ancora usano i criteri di accettabilità delle valutazioni esterne di qualità<sup>27</sup> o hanno determinato direttamente un intervallo di riferimento per l'*I-index* su base popolazionistica.<sup>70</sup> L'intervallo di riferimento al 95% basato su 120 individui sani (età media 44,5 anni, *range* 19-65 anni; 47 donne e 73 uomini) è apparso 0-2 mmol/L, utilizzando Cobas 8000 Roche.

In questo contesto assumerebbe grande importanza l'assicurazione di qualità per gli indici HIL, articolata in un controllo di qualità interno (QCI), spesso *in house*,<sup>71, 72</sup> e in una verifica esterna di qualità (VEQ).<sup>73</sup> Tuttavia, in un sondaggio europeo,<sup>74</sup> solo un quarto degli intervistati eseguiva qualsiasi forma di controllo HIL e utilizzava un QCI. Diversamente da QCI, erano più facilmente disponibili programmi VEQ per valutare le misurazioni HIL, ma solo una piccola quantità di laboratori li utilizzava (14%). Anzi, il 29% ha dichiarato di non essere interessato alla partecipazione di VEQ per HIL! Questi dati sono sovrapponibili alla *survey* danese<sup>75</sup> su tema che ha intervistato il 100% dei dipartimenti di biochimica clinica del Paese: tutti esaminano HIL per i test biochimici ma solo il 23% per gli esami della coagulazione; solo il 25% esegue un QCI per HIL e solo il 30% una VEQ; tutti cancellano la richiesta o la risposta del test interferito ma nessuno allega alla cancellazione il risultato del test HIL.

La valutazione delle interferenze analitiche, nella fase di studio di un sistema metodo-strumento, viene di solito presentata graficamente in un cosiddetto "interferogramma": sull'asse X si pongono le concentrazioni incrementali dell'interferente e sull'asse Y i bias misurati; si definiscono così i criteri di accettabilità sulla base delle DSI (*Desirable Specification for Imprecision*).<sup>76</sup> Le interferenze sono spesso studiate con *spiked samples*: il test per l'interferenza itterica può essere eseguito con l'aggiunta di bilirubina. Tuttavia, è importante che venga testata l'inter-

ferenza delle forme di bilirubina coniugata e non coniugata.<sup>4</sup> Alcuni saggi hanno mostrato interferenze con una di queste forme, ma non con l'altra; altri saggi hanno mostrato un'interferenza positiva con una forma e un'interferenza negativa con l'altra. Gli studi d'interferenza vengono, pertanto, eseguiti comunemente con ditauro-bilirubina. Tuttavia, sono state avanzate riserve sul fatto che la ditaurobilirubina potrebbe non produrre sempre gli stessi effetti di interferenza delle forme coniugate di glucuronide.<sup>66</sup> Tuttavia, questo è il metodo usualmente seguito per valutare l'interferenza da bilirubina nei *kit* analitici da parte dei produttori e ciò può essere fonte di discrepanze tra quanto contenuto nei *data sheet* dei metodi e la pratica analitica quotidiana.

### Come gestire l'interferenza da ittero su plasma

In presenza di interferenza segnalata dagli indici di siero, il comportamento del Laboratorio si orienta a una gestione con correzione del valore, cancellazione o rilascio con commento. Recentemente JM El-Koury<sup>77</sup> ha codificato un approccio automatizzato al problema dell'interferenza da ittero.

Per gli analiti con una matrice di diluizione convalidata, si diluisce il campione per abbassare l'*I-Index* entro un intervallo accettabile, fino alla diluizione massima specificata per ciascun dosaggio. Poiché il limite inferiore di quantificazione (LoQ) del dosaggio è influenzato dalla diluizione, questo approccio non è raccomandato per gli analiti in cui il LoQ è clinicamente importanti, come la troponina. Viceversa, è indicato per la creatinina, se non supera il massimo testato dal produttore.<sup>78</sup>

Per gli analiti che hanno un *I-index* inferiore al massimo testato dal produttore e non hanno una matrice di diluizione convalidata (come T4 libera e T3), o dove la diluizione non riporta l'*I-index* all'interno dell'intervallo accettabile (creatinina, se *I-index* superiore al massimo testato), si cancella il risultato perché l'interferenza sarà probabilmente significativa. I risultati vengono annullati anche quando l'aumento del LoQ a causa della diluizione non ha senso clinicamente, come indicato precedentemente. Alcuni autori suggeriscono di applicare dei fattori di conversione invece che cancellare il risultato: secondo Plummer *et al.*<sup>79</sup> il fosforo può essere corretto, ottenendo un *bias* <10%, con dei fattori di correzione quando la bilirubina è superiore a 19 mg/dL su Dimension Vista 1500 Siemens.

Per i test in cui il produttore IVD attesta non esserci interferenze fino alle concentrazioni massime di bilirubina testate, il risultato viene corredato da un commento: "Il

campione altamente itterico può influenzare il risultato. Si raccomanda l'interpretazione all'interno del contesto clinico".

### Interferenza da ittero in altri liquidi biologici

Gli esami biochimici effettuati su matrici "rare" (fluidi biologici diversi da sangue e urina) non sono validati nelle schede tecniche dei produttori (a eccezione del glucosio o delle proteine misurate nel liquido cefalo-rachidiano) e devono essere oggetto di una verifica metodologica nei campioni specifici dato l'impatto e diversità delle matrici, in particolare in relazione alla concentrazione proteica e all'effetto del pH.

#### Liquido pleurico e peritoneale

Un lavoro francese<sup>80</sup> ha valutato la performance di 13 parametri biochimici (ACE, CA 19-9, amilasi, lipasi, sodio, potassio, cloruro, creatinina, glucosio, proteine, albumina, LDH e trigliceridi) in un pannello di fluidi corporei (ascite fluidi, peritoneale, pleurico, pancreatico e cerebrospinale). In questo contesto, sono state testate per tutti i parametri anche le interferenze di emolisi, ittero e lipemia dato l'aspetto spesso eterogeneo dei liquidi biologici (emorragico, lattescente, itterico). Per l'ittero, un intervallo di concentrazioni di bilirubina è stato preparato per corrispondere agli indici di ittero I1 ( $I \leq 2$  mg/dL), I2 ( $2 < I \leq 5$  mg/dL), I3 ( $5 < I \leq 10$  mg/dL), I5 ( $15 < I \leq 20$  mg/dL) e I6 ( $20 < I \leq 40$  mg/dL) dello strumento Vista Siemens. A eccezione di trigliceridi, creatinina e proteine, le percentuali delle differenze sono inferiori al 10%. La concentrazione di trigliceridi è sovrastimata ( $\approx 19\%$ ) da I3 ( $5 < I \leq 10$  mg/dL bilirubina). La concentrazione proteica ( $\approx 24\%$ ) è sottostimata da I5 ( $15 < I \leq 20$  mg/dL bilirubina) e quella di creatinina ( $\approx 16\%$ ) da I6 ( $20 < I \leq 40$  mg/dL bilirubina), conformemente alle interferenze che si hanno su plasma.

#### Liquido cefalo-rachidiano

Nell'esame del liquido cefalo-rachidiano (LCR) il dosaggio della bilirubina può assumere importanza nella diagnosi dell'emorragia subaracnoidea, diagnosticata correttamente con la TAC (tomografia assiale computerizzata) nel >95% dei casi se effettuata entro il primo giorno dopo l'esordio del sanguinamento. Tuttavia, la sensibilità della TAC diminuisce progressivamente al 50% dopo una settimana e arriva a zero dopo tre settimane. Nelle presentazioni tardive (dopo 1-2 settimane), l'analisi del LCR diviene la tecnica più sensibile.

Recentemente, Giavarina<sup>81</sup> ha pubblicato una preziosa rassegna sull'argomento puntualizzando come la bilirubi-

bina piuttosto che l'emoglobina sia l'analita di scelta in queste condizioni e quali siano le possibilità di dosaggio e le interferenze da temere.

La produzione di bilirubina, infatti, richiede almeno 12 ore dall'evento e, a differenza dell'emoglobina, non può derivare che in minime quantità da un'eventuale contaminazione da prelievo. Il modo tradizionale per valutare la presenza di sangue e bilirubina è l'ispezione visiva. Allo stato fisiologico il LCR appare come "acqua di roccia"; si definisce "xantocromico" nel caso di una colorazione tendente al giallo che depona per presenza di bilirubina, causa più probabile anche se non unica (proteine trasudate attraverso la barriera ematoencefalica). La presenza di sangue e le difficoltà dell'occhio umano nel cogliere i colori giallo/rosso, in particolare alla luce artificiale dei laboratori, sono limiti importanti alla rilevazione visiva della xantocromia. Molto meglio funziona la spettrometria, che però è lunga e indaginosa e richiede manualità ed esperienza d'interpretazione. In parte questi limiti possono essere superati con l'automazione dell'esame. Tuttavia, la presenza di emoglobina nel campione interferisce negativamente nel metodo di Jendrassik-Grof maggiormente diffuso per la misura della bilirubina. Altri metodi non risentono dell'interferenza ma devono comunque essere adattati per le basse concentrazioni.<sup>81</sup>

In ogni caso, un'iperbilirubinemia, con valori >20 μmol/L (1,17 mg/dL), determina il superamento della barriera ematoencefalica da parte dell'analita plasmatico, con la possibilità di causare nel LCR una falsa positività per emorragia subaracnoidea.

## Urine

Le linee guida per la fase analitica dell'esame fisico, chimico e morfologico delle urine (ECMU) del GIAU (ora Gruppo Intersocietario laboratorio e clinica Apparato Urinario)<sup>82</sup> distinguono i parametri urinari raccomandati, perché irrinunciabili da un punto di vista analitico e/o clinico (albumina/proteine, concentrazione urinaria, creatinina, emoglobina) o perché utili alla verifica analitica per il laboratorio (esterasi leucocitaria, nitriti, ascorbato), da quelli non raccomandati, se non in particolari condizioni (glucosio nelle tubulopatie e tubulo-interstizio patie; chetoni nell'emergenza nel sospetto di chetoacidosi diabetica o di intossicazione alcolica) o in ogni caso (bilirubina, urobilinogeno, urea, acido urico, ioni).

I pigmenti biliari (bilirubina e urobilinogeno) sono rilevati dai comuni *dipstick*. Per la bilirubina si evidenziano falsi negativi (FN) in presenza di vitamina C e di nitriti, mentre falsi positivi (FP) si riscontrano in presenza dei me-

taboliti della clorpromazina per la bilirubina, per quanto riguarda l'urobilinogeno con l'assunzione di alcuni farmaci (carbapenem e sulfanilamide) e in urine ipercromiche per entrambi. Falsi negativi sono frequenti per entrambi anche in condizioni di cattiva conservazione delle strisce reattive (umidità; luce solare diretta per la bilirubina).<sup>83</sup>

La bilirubina e l'urobilinogeno rilevati nelle urine hanno perso da tempo il loro significato di previsione del danno epatico.<sup>84</sup> Recentemente Foley e Wasserman<sup>85</sup> hanno confermato queste conclusioni con l'esame retrospettivo di 241.929 test di bilirubina urinaria: 831 (0,3%) hanno dato risultato positivo alla bilirubinuria. Di questi, il 60% proveniva da pazienti che avevano risultati anormali dei test sierici per patologie epatiche (AST, ALT, GGT) nelle 2 settimane precedenti; il resto (40%) erano positivi inaspettati e, tra questi, l'85% ha avuto test epatici anormali nelle 2 settimane seguenti. Questi positivi inaspettati, però, ammontano solo allo 0,13% di tutti i test esaminati. Tuttavia, nel 2019 Poloni *et al.*<sup>86</sup> hanno rilevato che nei pazienti con livelli di bilirubina urinaria elevati, il sedimento urinario presentava un numero maggiore di cilindri granulari (GC) e di cellule epiteliali tubulari renali (RTEC), suggerendo un'associazione tra iperbilirubinemia/iperbilirubinuria e danno tubulare, indipendentemente dalla presenza di AKI (*Acute Kidney Injury*). In questi pazienti, spesso con sindromi epato-renali, l'individuazione di ATN (*Acute Tubular Necrosis*) sulla base della quantità di GC e RTEC, proposta da Perazella *et al.*,<sup>87</sup> è messa in discussione.

D'altra parte, la disponibilità immediata del dato della bilirubina urinaria ottenuta dal *dipstick* automatizzato può aiutare nell'interpretazione del colore del sedimento urinario e nell'individuazione di sedimenti d'importanza clinica quali i cilindri bilirubinici e i cristalli di bilirubina.<sup>82</sup> Per quanto riguarda i dati chimico-fisici ottenuti dai *dipstick*, la conoscenza della bilirubinuria e dell'urobilinogeno può mettere in allarme rispetto a FP dei *pad* dei chetoni, dell'esterasi leucocitaria e del glucosio (quest'ultimo in particolare per interferenza da urobilinogeno) e dai FN dei *pad* del pH e nitriti (quest'ultimo in particolare per interferenza da urobilinogeno) oltre che nella determinazione della creatinuria. Urine ipercromiche possono dare anche FN o FP nella rilevazione delle proteine dei diversi *dipstick* commerciali.<sup>83</sup>

## Conclusioni e raccomandazioni

L'interferenza da ittero non è tenuta in debito conto dai laboratori. In ambito europeo, l'indagine del Working Group for the Preanalytical Phase di European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WG-PRE

EFLM) mostra che, tra i 1416 rispondenti di 45 nazioni, solo il 4% blocca i risultati per ittero (vs. l'8% per emolisi e il 2% per lipemia), il 3% li rilascia senza interventi (vs. 7% per lipemia e 1% per emolisi), il 20% li rilascia con avvertenze generiche (vs. il 25% per lipemia e il 10% per emolisi), il 70% li rilascia con interventi solo per specifici test (vs. il 60% per lipemia e il 75% per emolisi).<sup>73</sup> Le ragioni di questa sottostima del problema non sono chiare ma potrebbero dipendere dalla percezione di una bassa frequenza dell'interferenza nei campioni plasmatici e nell'ancor più limitato numero di pazienti coinvolti.<sup>20</sup> Tuttavia, l'interferenza da ittero rappresenta una sfida all'accuratezza del dato analitico e dell'interpretazione clinica. Pertanto, si raccomanda che:

- i laboratori siano consapevoli dell'importanza di questa interferenza, nonostante la relativamente bassa frequenza della stessa (da 0,14% a 1,4%);<sup>20, 55</sup>
- provvedano alla sua rilevazione attraverso metodi HIL automatizzati, con adeguati controlli di qualità per questi metodi;<sup>75</sup>
- confermino, attraverso la letteratura scientifica o prove di laboratorio, il livello di bilirubina effettivamente interferente sui singoli test, tenuto conto della specificità del sistema metodo-strumento nel determinare la presenza e la tipologia (positiva/negativa) dell'interferenza ittero;
- trattino la refertazione degli esami plasmatici possibilmente interferiti dall'ittero secondo le recenti indicazioni della letteratura,<sup>77</sup> come sopra riportato;
- tengano presente che un'iperbilirubinemia oltre 20 μmol/L determina falsa positività nel liquido cefalo-rachidiano per la diagnosi di pregressa emorragia subaracnoidea;<sup>81</sup>
- utilizzino le informazioni del *dipstick* su bilirubinuria e urobilinogeno per la verifica di falsi positivi dei chetoni, dell'esterasi leucocitaria e del glucosio (quest'ultimo in particolare per interferenza da urobilinogeno) e di falsi negativi del pH e nitriti (quest'ultimo in particolare per interferenza da urobilinogeno) oltre che della creatinuria.

## Bibliografia

1. Miller JJ, Levinson SS, Elin RJ. Interferences in laboratory tests. In: Ward-Cook KM, Lehmann CA, Schoeff LE, Williams RM, editors. Clinical diagnostic technology. The total testing process. Volume 2: The Analytical Phase. Washington (DC), WA: AACC Press; 2005. p.37-76.
2. Van Der Linden WE. Definition and classification of interferences in analytical procedures. *Pure Appl Chem* 1989;61:91-5.
3. Simundic AM, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenc-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M, et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1361-5.
4. CLSI. Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis; approved guideline. CLSI document C56-A [Internet]. Disponibile alla pagina: [https://clsi.org/media/2531/c56ae\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2531/c56ae_sample.pdf) [citato 24 marzo 2022].
5. Cazzola M, Mondelli MU. Ittero. In: Ascari E, Balduini C, editors. *Medicina interna per problemi diagnostici*. Torino: UTET; 1997.
6. Priyadarshani AM. Insights of hypercarotenemia: A brief review. *Clin Nutr ESPEN* 2018;23:19-24.
7. Fico AA, Petrela E, Zajmi E, Sinani N, Dobi D, Dobi F. Secondary carotenemia: case report. *Med Res Chron* 2016;3:203-5.
8. Kiuchi S, Ihara H, Koyasu M, Tani A, Hashizume N. A Case of β-Carotenemia Misdiagnosed as Jaundice by the Bilirubin Oxidase Method. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2019;65:451-4.
9. Kaplan LM, Isselbacher KJ. Jaundice. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. New York, NY: McGraw-Hill; 1998.
10. van den Bergh AA, Muller P. Ueber eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin [On a direct and indirect diazo reaction to bilirubin]. *Biochem Z* 1916;77:90-103. [Tedesco]
11. Doumas BT, Wu TW. The measurement of bilirubin fractions in serum. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991;28:415-45.
12. Westwood A. The analysis of bilirubin in serum. *Ann Clin Biochem* 1991;28:119-30.
13. Hulzebos CV, Vitek L, Coda Zabetta CD, Dvořák A, Schenk P, van der Hagen EA, et al. Screening methods for neonatal hyperbilirubinemia: benefits, limitations, requirements, and novel developments. *Pediatr Res* 2021;90:272-6.
14. Doumas BT, Perry B, Jendrzyszczak B, Davis L. Measurement of direct bilirubin by use of bilirubin oxidase. *Clin Chem* 1987;33:1349-53.
15. Nakayama K. Differences between enzymatic and diazo methods for measuring direct bilirubin. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:513-7.
16. Pincus MR, Schaffner JA. Valutazione della funzionalità epatica. In: Henry JB, editor. *Diagnosi clinica e metodi di laboratorio*. Roma: Antonio Delfino Editore; 2001.
17. Henry JB, Lauzon RB, Schumann GB. Esami di routine delle urine. In: Henry JB, editor. *Diagnosi clinica e metodi di laboratorio*. Roma: Antonio Delfino Editore; 2001.
18. Isselbacher KJ. Bilirubin metabolism and hyperbilirubinemia. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. New York, NY: McGraw-Hill; 1998.
19. Untereiner V, Garnotel R, Thiéfin G, Sockalingum GD. Interference of hemolysis, hyperlipidemia, and icterus on plasma infrared spectral profile. *Anal Bioanal Chem* 2020;412:805-10.
20. Mainali S, Merrill AE, Krasowski MD. Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus. *Pract Lab Med* 2021;27:e00259.
21. Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta* 2011;412:1550-3.
22. Tests affected by hemolyzed, lipemic and icteric samples and their mechanism [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://laboratoryinfo.com/tests-affected-hemolyzed-lipemic-icteric-samples-mechanism/> [citato 24 marzo 2022].
23. Seiden-Long I, Schnabl K, Skoropadyk W, Lennon N, McKeage A. Evaluation of a third party enzymatic ammonia method for use on the Roche Cobas 6000 (c501) automated platform. *Clin Biochem* 2014;47:1116-20.
24. Ali D, Sacchetto É, Reigner A, Le Carrer D, Orsonneau JL, Delaroché O, et al. Lipemia and bilirubin influences for twenty-four biochemical parameters measurement. *Ann Biol Clin (Paris)* 2015;73:671-89. [Francese]
25. Bruneel A, Dehoux M, Barnier A, Boutten A. External evaluation

of the Dimension Vista 1500® intelligent lab system. *J Clin Lab Anal* 2012;26:384–97.

26. Nicolay A, Lorec AM, Gomez G, Portugal H. Icteric human samples: icterus index and method of estimating an interference-free value for 16 biochemical analyses. *J Clin Lab Anal* 2018;32:22229.

27. Ho CK, Chen C, Setoh JW, Yap WW, Hawkins RC. Optimization of hemolysis, icterus and lipemia interference thresholds for 35 clinical chemistry assays. *Pract Lab Med* 2021;25:e00232.

28. Nah H, Lee SG, Lee KS, Won JH, Kim HO, Kim JH. Evaluation of bilirubin interference and accuracy of six creatinine assays compared with isotope dilution-liquid chromatography mass spectrometry. *Clin Biochem* 2016;49:274–81.

29. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, Wright EC, Dalton RN, Zakowski JJ, *et al.* Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012;58:391–401.

30. Kwon HJ, Seo EJ, Min KO. The influence of hemolysis, turbidity and icterus on the measurements of CK-MB, troponin I and myoglobin. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:360–4.

31. Bénétteau-Burnat B, Baudin B, Vaubourdoles M. Evaluation of Stratus CS stat fluorimetric analyser for measurement of cardiac markers Troponin I (cTnI), creatine kinase MB (CK-MB), and myoglobin. *J Clin Lab Anal* 2001;15:314–8.

32. Kavsak PA, Malinowski P, Roy C, Clark L, Lamers S. Assessing matrix, interferences and comparability between the Abbott Diagnostics and the Beckman Coulter high-sensitivity cardiac troponin I assays. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1176–81.

33. Simó JM, Camps J, Gómez F, Ferré N, Joven J. Evaluation of a fully-automated particle-enhanced turbidimetric immunoassay for the measurement of plasma lipoprotein(a). population-based reference values in an area with low incidence of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2003;36:129–34.

34. Steen G, Klerk A, Laan K, Eppens EF. Evaluation of the interference due to haemoglobin, bilirubin and lipids on Immulite 2500 assays: a practical approach. *Ann Clin Biochem* 2011;48:170–5.

35. Agarwal S, Vargas G, Nordstrom C, Tam E, Buffone GJ, Devaraj S. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. *Clin Chim Acta* 2015;438:241–5.

36. Hasanato R, Brearton S, Alshebani M, Bailey L, Aldugashim S, Alothaim A, *et al.* Effects of serum indices interference on hormonal results from the Abbott Architect i2000 immunoassay analyser. *Br J Biomed Sci* 2015;72:151–5.

37. Duncanson GO, Worth HG. Pseudohypophosphataemia as a result of bilirubin interference. *Ann Clin Biochem* 1990;27:253–7.

38. Beuhler MC, Curry SC. False positive acetaminophen levels associated with hyperbilirubinemia. *Clin Toxicol (Phila)* 2005;43:167–70.

39. Polson J, Wians FH Jr, Orsulak P, Fuller D, Murray NG, Koff JM, *et al.*; Acute Liver Failure Study Group. False positive acetaminophen concentrations in patients with liver injury. *Clin Chim Acta* 2008;391:24–30.

40. Zhang YV, Fan SL, Kellogg MD. Effect of hemolysis, icterus, and lipemia on three acetaminophen assays: potential medical consequences of false positive results. *Clin Chim Acta* 2018;487:287–92.

41. James J, Stauss M, Ponnusamy A, Myers M. False-positive paracetamol levels in a patient with hyperbilirubinaemia: clinical perspectives. *BMJ Case Rep* 2020;13:234702.

42. Savory DJ, Souster AH. Interference by bilirubin in salicylate measurement. *Ann Clin Biochem* 2001;38:153–5.

43. Grieme CV, Voss DR, Davis SR, Krasowski MD. Impact of endogenous and exogenous interferences on Clinical Chemistry parameters measured on Blood Gas Analyzers. *Clin Lab* 2017;63:561–8.

44. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:258–66.

45. Roß RS, Paar D. Analytisch und klinisch relevante Interferenzen in

der Gerinnungsanalytik am Beispiel des MDA 180. *Laboratoriumsmedizin (Berl)* 1998;22:90–4.

46. Quehenberger P, Kapiotis S, HandLer S, Ruzicka K, Speiser W. Evaluation of the automated coagulation analyzer SYSMEX CA 6000. *Thromb Res* 1999;96:65–71.

47. Appert-Flory A, Fischer F, Jambou D, Toulon P. Evaluation and performance characteristics of the automated coagulation analyzer ACL TOP. *Thromb Res* 2007;120:733–43.

48. Fischer F, Appert-Flory A, Jambou D, Toulon P. Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex CA-7000. *Thromb Res* 2006;117:721–9.

49. Dorn-Beineke A, Dempfle CE, Bertsch T, Wisser H. Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex CA-7000. *Thromb Res* 2005;116:171–9.

50. Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol* 2016;38:375–88.

51. Cradic K, Rosemark C, Black D, Bannon N. Managing spectral interferences using optical coagulation methods. *Am J Clin Pathol* 2018;150:150–1.

52. Seheult JN, Dalenberg D, Sridharan MR, Stuart M, Moericke K, Cardel L, *et al.* Revisiting the effects of spectral interfering substances in optical end-point coagulation assays. *Int J Lab Hematol* 2021;43:1181–90.

53. Montaruli B, Guiotto C, Cosseddu D. Influence of hemolysis, icterus and lipemia on coagulation tests as performed on Cobas t511 new analyzer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2020;31:48–54.

54. Mastella AK, de Carvalho JA, Stein CS, Bochi GV, Moresco RN. Interference of icterus on plasma D-dimer levels measured using immunoturbidimetric assays. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2021;32:162–3.

55. Shin DH, Kim J, Uh Y, Lee SI, Seo DM, Kim KS, *et al.* Development of an integrated reporting system for verifying hemolysis, icterus, and lipemia in clinical chemistry results. *Ann Lab Med* 2014;34:307–12.

56. Vermeer HJ, Thomassen E, de Jonge N. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system. *Clin Chem* 2005;51:244–7.

57. Salinas M, López-Garrigós M, Lugo J, Gutiérrez M, Flors L, Leiva-Salinas C. Diagnostic accuracy of icteric index to detect abnormal total bilirubin values. *J Clin Pathol* 2012;65:928–33.

58. Szoke D, Braga F, Valente C, Panteghini M. Measurement of icteric index as approach to detect abnormal total bilirubin values. *J Clin Pathol* 2013;66:1095–7.

59. Pasqualetti S, Szóke D, Panteghini M. Suitability of icteric index (II) as front-line test for the identification of blood samples with abnormal total bilirubin (TB) concentrations. *Biochim Clin* 2015;39:270–4.

60. Zhang GM, Hu ZD. Conjugated bilirubin as a reflex test for increased total bilirubin in apparently healthy population. *J Clin Lab Anal* 2018;32:22233.

61. Arbiol-Roca A, Navarro-Badal MR, Allende-Monclús B. Utility of the icteric index for the management of bilirubin test requesting. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:e318–20.

62. Lippi G, Bovo C, Salvagno GL. Are icteric and lipaemic indices reliable to screen for Hyperbilirubinaemia and hypertriglyceridemia? *Clin Chem Lab Med* 2019;58:1–4.

63. Roccaforte V, Daves M, Inglese E, Proserpio V, Sciarini F, Perno CF, *et al.* Safe use of the icteric index as possible diagnostic algorithm in the determination of bilirubin. *Riv Ital Med Lab* 2020;16:182–6.

64. Mondejar R, Mayor Reyes M, Melguizo Madrid E, Cañavate Solano C, Pérez Ramos S. Utility of icteric index in clinical laboratories: more than a preanalytical indicator. *Biochem Med (Zagreb)* 2021;31:020703.

65. Pantanowitz L, Horowitz GL, Upalakalin JN, Beckwith BA. Artificial hyperbilirubinemia due to paraprotein interference. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:55–9.

66. Farrell CJ, Carter AC. Serum indices: managing assay interference. *Ann Clin Biochem* 2016;53:527–38.

67. von Meyer A, Cadamuro J, Lippi G, Simundic AM. Call for more transparency in manufacturers' declarations on serum indices: On behalf of the Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clin Chim Acta* 2018;484:328–32.
68. Nikolac Gabaj N, Miler M, Vrtarić A, Hemar M, Filipi P, Kocijančić M, *et al.* Precision, accuracy, cross reactivity and comparability of serum indices measurement on Abbott Architect c8000, Beckman Coulter AU5800 and Roche Cobas 6000 c501 clinical chemistry analyzers. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:776–88.
69. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem* 1989;35:837–9.
70. Gils C, Nybo M. A Reference Interval for Icteric Index for possible clinical use of the analysis. *J Appl Lab Med* 2020;5:599–601.
71. Lippi G, Cadamuro J, Danese E, Gelati M, Montagnana M, von Meyer A, *et al.* Internal quality assurance of HIL indices on Roche Cobas c702. *PLoS One* 2018;13:e0200088.
72. Aloisio E, Carnevale A, Pasqualetti S, Birindelli S, Dolci A, Panteghini M. Implementation of an internal quality control programme for the photometric determination of icteric index. *J Clin Pathol* 2018;71:851–2.
73. Cadamuro J, Lippi G, von Meyer A, Ibarz M, van Dongen E, Cornes M, *et al.*; Lases5. European survey on preanalytical sample handling - Part 2: Practices of European laboratories on monitoring and processing haemolytic, icteric and lipemic samples. On behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Biochem Med (Zagreb)* 2019;29:020705.
74. Cadamuro J, Lippi G, von Meyer A, Ibarz M, van Dongen E, Cornes M, *et al.*; Lases5. European survey on preanalytical sample handling - Part 1: How do European laboratories monitor the preanalytical phase? On behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Biochem Med (Zagreb)* 2019;29:020704.
75. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470–5.
76. Fleming JJ, Swaminathan S. Interference in autoanalyzer analysis. *Indian J Clin Biochem* 2001;16:22–30.
77. El-Koury JM. Result, dilute, comment, or cancel: how to handle icteric samples [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.aacc.org/cln/articles/2021/april/result-dilute-comment-or-cancel-how-to-handle-icteric-samples> [citato 24 marzo 2022].
78. Charifa A, Bunch DR, El-Khoury JM. Practical Approach to Eliminate Bilirubin Interference in Icteric Samples for Creatinine Measurement. *J Appl Lab Med* 2019;4:477–9.
79. Plummer R, Li D, Karger AB, Johnson L. The Effect of Icterus on Plasma Samples and Corrective Factors for Estimating an Interference Free Phosphorus Result. *Am J Clin Pathol* 2018;150:156.
80. Oris C, Landrieaux L, Brailova M, Roszyk L, Rozand I, Sapin V, *et al.* Analytical validation of 13 biochemistry parameters (CEA, CA 19-9, amylase, lipase, sodium, potassium, chloride, creatinine, glucose, protein, albumin, LDH, triglycerides) in body fluids. *Ann Biol Clin (Paris)* 2020;78:93–107. [Francese]
81. Giavarina D. L'esame liquorale nella diagnosi di emorragia subaracnoidea [The liquor test in the diagnosis of subarachnoid hemorrhage]. *Biochim Clin* 2014;38:191–7. [Italiano]
82. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, Alessio MG, Caleffi A, Gambaro G, *et al.* Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: proposta di linee guida per la fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU) [Physical, chemical and morphological examination of urine: proposal of guidelines for the analytical phase of the Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU)]. *Riv Ital Med Lab* 2016;12:134–64. [Italiano]
83. Mundt LA, Shanahan K. Graff's textbook of routine urinalysis and body fluids. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
84. Cappelletti P. Gli esami su urine. È il tempo per cambiare? [Urine tests. Is it time for a change?] *Riv Med Lab* 2002;3:93–103. [Italiano]
85. Foley KF, Wasserman J. Are unexpected positive dipstick urine bilirubin results clinically significant? A retrospective review. *Lab Med* 2014;45:59–61.
86. Poloni JA, Perazella MA, Keitel E, Marroni CA, Leite SB, Rotta LN. Utility of a urine sediment score in hyperbilirubinemia/hyperbilirubinuria. *Clin Nephrol* 2019;92:141–50.
87. Perazella MA, Coca SG, Kanbay M, Brewster UC, Parikh CR. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1615–9.

*Conflitti di interesse.*—L'autore dichiara di non aver alcun conflitto di interesse.

*Studi condotti su esseri umani e animali.*—L'articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte degli autori.

*Consenso informato.*—Per questo tipo di studio non è richiesto il consenso informato.

Publicato online: 24 marzo 2022. - Accettato: 21 marzo 2022. - Ricevuto: 7 febbraio 2022.