

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

¹U.O. Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

²Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera, Bussolengo (VR)

³Istituto Galeazzi, Università di Milano,

⁴Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

⁵Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milano

⁶Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona

⁷Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Arzignano (VI)

⁸Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Desenzano del Garda (BS)

⁹Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli, Pordenone

¹⁰Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

¹¹U.O. Patologia Clinica 1, Policlinico di Bari

¹²Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale S. Bortolo, Vicenza

ABSTRACT

SIBioC-SIMeL consensus recommendations for the identification and management of hemolysed specimens and the implementation of hemolysis index. The presence of hemolysis in a biological blood sample is mainly caused by hemolytic anemia or hemolysis *in vitro*. The latter is caused by inappropriate collection and processing of biological samples, which may affect the reliability of test results. Hemolysis is assessed by free hemoglobin quantification, whose limit is 0.02 g/L in plasma and 0.05 g/L in serum, and visually observed when the concentration of free hemoglobin exceeds 0.30 g/L. Since hemolysis is the most frequent cause of unsuitable biological samples in clinical laboratories, with a prevalence approaching 3% of all received samples, these recommendations have been drafted specifically to assist laboratory professionals in detection and management of hemolysed specimens. In summary, 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 results affected by the presence and/or degree of hemolysis; and (iv) timely request of a second sample, on which the previously deleted tests can be performed.

GENERALITÀ

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 circolo 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 di 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).

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, U.O. Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Via Gramsci 14, 43126 Parma. Tel. 0521703050, Fax 0521703197, E-mail glippi@ao.pr.it, ulippi@tin.it

Ricevuto: 06.09.2011

Accettato: 06.09.2011

I GR sono continuamente prodotti nel midollo osseo rosso delle ossa lunghe a una velocità di circa 2 milioni/sec. Il processo che porta alla produzione e immissione in circolo di GR è denominato eritropoiesi e dura ~7 giorni. L'eritropoiesi è regolata finemente mediante un processo a due fasi da parte dell'ormone eritropoietina, 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 rappresentano ~1% dei GR circolanti (1).

Le dimensioni dei GR variano considerevolmente nelle diverse specie di vertebrati. Un GR umano tipico ha un diametro di 6-8 μm e uno spessore di 2 μm . Le cellule hanno quindi un volume di circa 90 fL e una superficie di circa 136 μm^2 , ma possono "rigonfiarsi" fino ad assumere forma sferica di 150 fL, senza distorsione della membrana. 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 dei GR 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 $2\text{-}3 \times 10^{13}$ ($4,2\text{-}6,2 \times 10^{12}/\text{L}$ nei maschi e $3,8\text{-}5,5 \times 10^{12}/\text{L}$ nelle femmine), che è considerevolmente superiore a quello delle altre cellule del sangue (ad es., 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. Ogni GR umano contiene circa 270 milioni di molecole di emoglobina, ciascuna con quattro gruppi eme, cossiché l'emoglobina rappresenta circa un terzo del volume totale dei GR (1).

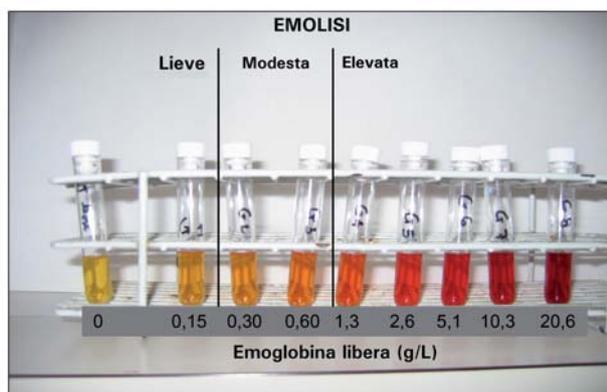


Figura 1
Scala di emolisi nei campioni biologici.

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 e conseguente liberazione di emoglobina e altri componenti intracellulari nel liquido che li contiene (in genere il sangue).

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 di raccolta e 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 di riferimento dell'emoglobina plasmatica e sierica è rispettivamente 0,02 e 0,05 g/L (è più alta nel siero a seguito del processo fisiologico 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 0,30 g/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 (Figura 1) (3).

PREVALENZA DEI CAMPIONI EMOLISATI

I campioni emolisiati sono piuttosto frequenti, con una prevalenza che approssima il 3% di tutti i campioni di routine ricevuti e rappresenta il 40%-70% di tutte le non conformità dei campioni (quasi 5 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, siano essi in routine o in urgenza (3).

Molti studi nel corso degli ultimi anni hanno valutato retrospettivamente la prevalenza di campioni emolisiati 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 fenomeno (al quale, peraltro, queste raccomandazioni si prefiggono, almeno parzialmente, di ovviare) è la difficoltà – se non l'impossibilità – di produrre stime reali sulla frequenza dei campioni emolisiati nei laboratori clinici a causa di 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. (4) hanno esaminato la prevalenza dei campioni emolisati ricevuti nel settore urgenze di un grande Policlinico Universitario italiano (Padova). Su un totale di 27.540 campioni biologici inviati per esami di chimica clinica, coagulazione e tossicologici, 505 risultavano emolizzati (3,3%). Il 64% di essi erano gravati da un grado di emolisi modesto (<0,05 g/L di emoglobina libera), il 31% da un grado intermedio e il 5% da un grado (>0,30 g/L di emoglobina libera) oltre il quale alcuni esami potevano risultare inattendibili. La percentuale di campioni emolisati stratificata per i diversi reparti era 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 emolisati 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, uno a pancreatite acuta necrotico-emorragica, uno a rhabdomiolisi da "overdose" di stupefacenti e 2 a eziologia ignota. In 5 dei 16 casi (31%) l'emolisi *in vivo* non era 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. (5) hanno descritto la percentuale di campioni emolisati nel settore urgenze di un ospedale spagnolo (Malaga), identificandone un numero significativamente maggiore nei campioni provenienti dal reparto di medicina d'urgenza (1,6%) rispetto a quelli inviati da altri reparti ospedalieri (1,0%) e dalla terapia intensiva (0,2%). In analogia, Burns et al. hanno descritto una frequenza di campioni emolisati nel laboratorio di un ospedale universitario americano (New York) significativamente maggiore per il pronto soccorso rispetto a quelli raccolti dall'ambulatorio prelievi operante sotto la giurisdizione del laboratorio (12,4% vs. 1,6%) (6).

Un ampio studio effettuato nel laboratorio di chimica clinica di un altro Policlinico Universitario italiano (Verona), basato sull'analisi retrospettiva di 150.516 provette primarie per esami di routine e urgenza ricevuti nella sezione di chimica clinica (16.960 provenienti dal reparto di medicina d'emergenza, 2652 dalla dialisi, 10.116 dall'unità operativa di terapia intensiva, 62.068 da reparti di medicina interna, 38.084 da reparti chirurgici, 11.756 dai reparti pediatrici e 8880 dagli ambulatori per prelievo di pazienti esterni afferenti al laboratorio), ha consentito di stimare una frequenza di campioni emolisati pari al 5,6% (7). Classificando i campioni emolisati in base alla loro provenienza, la maggiore frequenza era osservata nei campioni del reparto di medicina d'urgenza (8,8%), seguito da reparti pediatrici (8,5%), medicina interna (6,2%), terapia intensiva (5,4%) e chirurgia (4,0%). La frequenza minore era registrata nei campioni

provenienti dall'emodialisi (1,5%) e dagli ambulatori per pazienti esterni (0,1%) (7).

In un recente sondaggio collaborativo promosso dall' "European Preanalytical Scientific Committee" (EPSC) e dall'IFCC Working Group "Laboratory errors and patient safety" (WG-LEPS) monitorando 388 laboratori in tutto il mondo (179 negli Stati Uniti, 188 in Italia, 20 in Australia, 15 in Turchia e 10 nella Repubblica Ceca; 80% pubblici e 20% privati), la frequenza osservata di campioni emolisati era, in ordine decrescente, da 1% a 3% dei campioni nel 39% dei centri, <1% dei campioni nel 28%, da 3% a 5% dei campioni nel 21%, da 5% a 10% dei campioni nel 8% e >10% dei campioni nel 4% dei centri partecipanti. Si confermano in questo sondaggio la netta prevalenza relativa di campioni emolisati inviati da reparti di medicina d'urgenza (53%), seguiti dai reparti pediatrici (16%) e di terapia intensiva (7%). Infine, in un recentissimo studio prospettico volto a valutare la prevalenza di emolisi nei campioni inviati per emogasanalisi arteriosa, questa è risultata pari a 1,5% di tutti i campioni (8). E' tuttavia importante sottolineare che l'implementazione di programmi di "training" specifici per la corretta esecuzione del prelievo venoso è in grado di ridurre in modo significativo l'incidenza di campioni emolitici (9).

L'ANEMIA EMOLITICA (EMOLISI *IN VIVO*)

Le anemie 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 nella Tabella 1. L'anemia può essere più o meno grave, in relazione alla capacità midollare di compensare adeguatamente la prematura distruzione in circolo dei GR. In genere, le patologie che possono causare anemia emolitica sono imputabili a una aumentata (accelerata) distruzione dei GR (ad es., 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) (10, 11).

La presentazione clinica dell'anemia emolitica dipende da vari fattori, tra i quali l'entità e la velocità di distruzione dei GR in circolo. Malgrado i sintomi siano simili ad altre forme di anemia (ad es., 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 splenomegalia, calcolosi biliare, ipertensione polmonare (anche associata a episodi sincopali, dolore toracico e dispnea progressiva) ed edema. Sebbene la mortalità per anemia emolitica sia generalmente bassa, pazienti

Tabella 1*Patologie responsabili di o associate ad anemia emolitica**Patologie ereditarie*

- Difetti nella sintesi emoglobinica
 - Talassemia
 - Anemia falciforme
- Difetti della membrane eritrocitaria
 - Sferocitosi e ellittocitosi ereditarie
 - Emoglobinuria parossistica notturna (PNH)
- Difetti del metabolismo eritrocitario
- Deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e piruvato chinasi

Patologie acquisite

- Patologie immuno-mediate
 - Mycoplasma pneumoniae*
 - Anemia emolitica autoimmune
 - Patologie autoimmunitarie (ad es., lupus eritematoso sistemico, leucemia linfatica cronica)
- Ipsersplenismo
- Ustioni e traumi
- Infezioni
 - Malaria
 - Clostridi
- Danneggiamento "meccanico" in circolo
 - Coagulazione intravascolare disseminata (CID)
 - Sindrome emolitico-uremica
 - Porpora trombotica trombocitopenica (TTP)
 - Valvole cardiache
 - Sindrome HELLP ("hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets")
- Trasfusione incongrua
- Farmaci, tossine e altre cause meno frequenti

Tabella 2*Cause principali di emolisi in vitro*

- Dipendenti dal paziente
 - Vene fragili
 - Vene di difficile localizzazione
 - Prelievo in sede di ematoma
- Dipendenti dall'operatore
 - Esperienza
 - Tentativi di prelievo non riusciti
 - Trapassamento della vena
 - Perdita della vena durante il prelievo
- Dispositivo utilizzato per il prelievo
 - Uso di cateteri venosi o aghi a farfalla
 - Utilizzo di aghi di calibro ridotto (ad es., <23 Gauge)
 - Imperfezione rimozione della soluzione antisettica dalla cute
 - Utilizzo prolungato del laccio emostatico
 - Raccolta del sangue in contenitori inadeguati
 - Inappropriato riempimento (insufficiente o eccessivo) della provetta
 - Trasferimento del sangue da siringa a provetta
- Trattamento del campione immediatamente dopo il prelievo
 - Agitazione eccessiva o inadeguata
 - Miscelazione inadeguata con l'anticoagulante
- Trasporto del campione
 - Sistema di trasporto (sistemi pneumatici, corrieri)
 - Condizioni di trasporto (traumi meccanici, durata, temperatura e umidità)
- 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
- Conservazione del campione
 - Ricentrifugazione
 - Condizioni di conservazione (temperatura e durata)

anziani o con patologie cardiovascolari hanno un rischio sostanzialmente aumentato (10, 11).

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 della 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 (12). Nell'approccio diagnostico all'anemia emolitica è importante la valutazione dei reticolociti, che aumentano caratteristicamente 24-48 ore dopo l'episodio emolitico, come pure il dosaggio della bilirubina non coniugata e dell'urobilinogeno. La valutazione dell'anemia emolitica deve essere guidata dall'esame morfologico dello striscio periferico, che diventa cruciale nella distinzione tra emolisi immune e non-immune. Sferociti e microsferociti rappresentano

segni caratteristici di anemia emolitica immune, mentre GR frammentati e/o schistociti rappresentano segni distintivi di anemia emolitica non-immune, generalmente da causa meccanica (11). 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) (10). In presenza di emolisi intravascolare di grado elevato (ad es., anemia emolitiche da incompatibilità trasfusionale, protesi valvolari cardiache) l'emoglobina libera nel plasma può anche influenzare gli indici eritrocitari (ad es., concentrazione media di emoglobina corpuscolare falsamente elevata) (13).

L'emolisi in circolo determina la fuoriuscita dei GR di emoglobina che si dissocia in dimeri, che con elevata affinità si legano simmetricamente a una molecola di aptoglobina, inibendone l'attività ossidativa. L'apoptoglobina ha una emivita di 5 giorni, mentre i complessi aptoglobina-emoglobina hanno una emivita di 10-30 min. 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 invariata 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) (10, 11).

EMOLISI IN VITRO

Nonostante i recenti progressi tecnologici e informatici abbiano contribuito ad abbattere considerevolmente gli errori nella 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% (14, 15). 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 es., 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 (Tabella 2) (15-17).

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 emolisati 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 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 emolisati (18). 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. Appare altresì ragionevole la necessità di una segnalazione tempestiva della presenza di emolisi nel campione al reparto richiedente, secondo modalità definite localmente con la direzione e i reparti stessi.

L'emolisi *in vivo* si accompagna frequentemente a 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 regime ordinario che in urgenza, rappresentando uno strumento potenzialmente utile allorché 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 della sintesi, sempre possibile se coesiste una situazione flogistica in atto (aptoglobina è proteina di fase acuta). Inoltre, considerando che l'emivita dei complessi aptoglobina-emoglobina 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 del dosaggio della emopessina. Infine, i complessi aptoglobina-emoglobina si generano anche *in vitro*. Pertanto, qualora si debba misurare l'aptoglobina in un campione emolisato, 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 utilizzando anticorpi anti-emoglobina. Le prestazioni analitiche di questo esame sono ottimali per l'uso clinico, ma l'introduzione nella prassi quotidiana di laboratorio per lo screening dei campioni emolisati è tuttavia ostacolata da ovvie ragioni tecniche, economiche e pratiche (19).

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 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" (20). 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" (21). 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" (22).

In linea generale, la presenza di emolisi nel campione può inficiare l'attendibilità delle determinazioni mediante i seguenti meccanismi: (i) rilascio di elementi a elevata concentrazione intracellulare, che aumentano falsamente la concentrazione dei medesimi nel siero o nel plasma (ad es., potassio, transaminasi e 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 (ad es., sodio), (iii) interferenza spettrofotometrica nella determinazione a causa di un aumento dell'estinzione ("assorbimento") e modificazione del "valore di bianco" ("blank value"), soprattutto per i test basati su lettura spettrofotometrica a 415, 540 e 570 nm, cioè le lunghezze d'onda in grado di misurare l'emoglobina libera (ad es., γ -glutamilttransferasi, GGT), (iv) miscelanea di altre interferenze analitiche (ad es., diminuzione spuria della bilirubina nella reazione di Jendrassik-Gróf a causa dell'attività pseudoperossidasi dell'emoglobina, aumentata attività della creatininchinasi a seguito del rilascio di adenilato chinasi intraeritrocitaria) e (v) rilascio di sostanze ad azione tromboplastinica (Tabella 3) (3, 23-26). Peculiare è 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 sovracompensato 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 dimostrato che l'emolisi può alterare significativamente la determinazione della troponina, per lo più in maniera metodo-dipendenti. Nel primo studio è stato osservato un calo fino al 50% della concentrazione di troponina T determinata con metodo di ultima generazione (alta sensibilità) e contestualmente un aumento fino al 576% di troponina I per valori di emolisi elevati, superiori a 0,60 g/L (27). Nel secondo

studio, i risultati sono sovrapponibili, con variazioni significative della determinazione delle troponine per valori di emolisi >1,9 g/L (28). Un ultimo studio eseguito da uno degli Autori (MD) non ancora pubblicato dimostra che per valori di emolisi modesti o lievi (<0,60 g/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 sugli esami 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 essere compito specifico dei produttori definire con accuratezza gli effetti dell'emolisi sulla determinazione dei vari analiti e il personale di laboratorio dovrebbe successivamente verificare contro quale "target" è stata valutata l'accettabilità dell'interferenza. Nella Tabella 3 sono sintetizzate le più importanti evidenze clinico/analitiche. 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 dell'esame 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 interindividuale o della differenza critica (29).

IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI EMOLISATI

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 es., 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 emolisi appare essenziale, poiché l'emolisi potrebbe sottendere o riflettere patologie gravi responsabili o associate ad anemia emolitica che

Tabella 3

Interferenza dell'emolisi sugli esami di laboratorio

	Grado di emolisi ^a		
	Lieve	Modesto	Elevato ^b
Aumento spurio nel siero o plasma a causa di rilascio di analiti ad elevata concentrazione intraeritrocitaria:			
Emoglobina	-	-	↑ o ↓
Potassio	↑	↑↑	↑↑↑
Lattato deidrogenasi	↑	↑↑	↑↑↑
Aspartato aminotransferasi	↑	↑↑	↑↑↑
Alanina aminotransferasi	-/↑	↑	↑↑
Creatinina	-	-	↑
Effetti di diluizione per analiti a bassa concentrazione intraeritrocitaria:			
Albumina	-	-	↓
Cloruri	-	-	↓↓
Glucosio	-	↓	↓↓↓
Sodio	-	-	↓
Interferenza chimica o spettrofotometrica:			
Fosfatasi alcalina	-	-	↓
Bilirubina	-	↑ o ↓	↑↑ o ↓↓
Creatinichinasi	-	↑	↑↑
Ferro	-	-	↑↑
γ-glutamilttransferasi	-	-	↓
Lipasi	-	-	↓
Magnesio	-	-	↓
Fosfato	-	-	↓
Urea	-	-	↓
Determinazioni immunochimiche (ad es., troponina)			
	-	↑ o ↓	↑↑ o ↓↓
Rilascio di sostanze ad attività trombolitica:			
Tempo di protrombina	-	↑	↑↑
D-dimero	-	↑	↑↑
Tempo di tromboplastina parziale attivata	-	↓	↓↓
Antitrombina	-	-	↓

^aLieve: <0,30 g/L; Modesto: 0,30-0,60 g/L; Elevato: >0,60 g/L.^bPer interferenza "↑↑↑" o, se calcolata localmente, eccedente i limiti delle specifiche di qualità desiderabili definite sulla base della variabilità biologica intra- e interindividuale o della differenza critica, i risultati devono essere soppressi.

richiedono una urgente notifica ai clinici, oppure alcuni esami su campioni emolisati *in vitro* potrebbero determinare 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 emolisati sono stati identificati arbitrariamente, mediante ispezione visiva del campione da parte del personale del laboratorio. Nonostante la quantificazione dell'emoglobina libera nel siero o nel plasma sia teoricamente possibile utilizzando saggi immunonefelometrici, l'utilizzo di questo approccio di routine su tutti i campioni è poco pratico (per aumento del "turnaround time" (TAT) e 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 e nuove metodiche 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 HI prestabilite dal produttore o adattarle localmente per generare un avviso strumentale qualora l'indice ecceda i limiti, trasmettere il risultato dello stesso HI 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. E' palese che questo approccio (valutazione del HI 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 emolisi tra i vari laboratori, in accordo con quanto definito dal WG-LEPS 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 emolisi prima che siano analizzati e velocizza le azioni da intraprendere sui medesimi. Per gli strumenti che forniscono risultati quantitativi, HI può essere utilizzato come misura attendibile del grado d'interferenza, qualora si decidesse - prassi peraltro consigliata da queste raccomandazioni - di correggere matematicamente alcuni parametri sulla base della concentrazione di emoglobina libera presente nel campione. Infine, la valutazione sistematica del HI può essere vantaggiosamente utilizzata per definire le qualità dei prelievi e del trasporto dei campioni, soprattutto come indice delle prestazioni 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 del HI.

Il primo studio multicentrico, basato sull'invio di campioni di siero a concentrazione nota di emoglobina libera a diversi laboratori per la valutazione del HI 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), un'impresione (CV) compresa tra 0,1% e 2,7% e un'omogeneità di rilevazione dell'interferenza, espressa in termini quantitativi o semiquantitativi (32). A dispetto della sostanziale confrontabilità dei risultati grezzi, è stata però evidenziata una discreta disomogeneità nei limiti decisionali stabiliti dal produttore, cosicché campioni caratterizzati da emolisi modesta (~0,50 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 del HI sul TAT dei risultati.

GESTIONE DEI RISULTATI OTTENUTI SU CAMPIONI EMOLISATI

La procedura più idonea per la gestione dei risultati ottenuti su campioni emolisi 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 allorché su quelli ricevuti in precedenza sia stato rilevato un grado di emolisi elevato. Nel sondaggio collaborativo EPSC/IFCC WG-LEPS, al quesito "come sono gestiti i campioni emolisi nella tua realtà", il 44%

degli intervistati ha espresso la risposta "si eseguono tutte le analisi richieste con soppressione dei risultati degli esami 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 es., "si eseguono tutte le analisi richieste con soppressione dei risultati degli esami inattendibili per la presenza di emolisi e viene richiesto un altro campione", "correzione dei risultati per l'HI e produzione nel referto del commento «esami eseguiti su campione emoliso»" o "refertazione del risultato e aggiunta di un commento, del tipo «sovrastima della concentrazione di potassio: escludere emolisi *in vivo* o ripetere il prelievo»). Alla luce di quanto espresso in precedenza e riportato nelle raccomandazioni per l'identificazione e gestione dei campioni non idonei precedentemente redatte dal nostro Gruppo di Studio (33), 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 risultati 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, 34).

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 nella Tabella 3. In linea generale, vale però il principio che un'emolisi lieve (emoglobina libera <0,05 g/L) appena visibile a occhio nudo non altera sostanzialmente gli esami di laboratorio, un'emolisi modesta (emoglobina libera tra 0,05 g/L e 0,60 g/L) altera significativamente pochi parametri, mentre nei campioni con emolisi elevata (emoglobina libera >0,60 g/L) molti parametri possono essere alterati. Infine, nei campioni con grado elevato d'emolisi (ad es., emoglobina libera >2,00 g/L), tutti i parametri di chimica clinica e coagulazione sono potenzialmente alterati, per cui sarebbe consigliabile non procedere con alcun esame e richiedere sempre un secondo campione. L'identificazione di campioni emolisi 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).

RINGRAZIAMENTI

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

APPENDICE

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)^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 (ad 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 a 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 (ad es., strumenti in catena con connessione seriale tra strumentazione preanalitica e 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 automatizzata dell'indice di emolisi 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 emolisi deve essere sempre registrata, secondo le modalità espresse dalle raccomandazioni per l'identificazione e gestione dei campioni non idonei redatte dal Gruppo di Studio (33) (raccomandazione di grado A).

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 e i reparti clinici (raccomandazione di grado A).
- La determinazione dell'aptoglobina su campioni francamente emolisi (ad es., emoglobina libera >0,60 g/L) non si esegue di routine, ma può essere eseguita nel sospetto di anemia emolitica, allorché altri parametri (ad es., anemia, più frequentemente normocromica e normocitica, presenza di reticolocitosi ed emoglobinuria) e la situazione clinica lo consigliano (da valutare volta per volta, mediante consultazione con i clinici) (raccomandazione di grado A).

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 dell'esame 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 specifiche di qualità desiderabili definite sulla base della variabilità biologica intra- e interindividuale 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, utilizzare la Tabella 3 come riferimento (raccomandazione di grado A).

Gestione dei risultati ottenuti su campioni emolisi

- 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 specifiche di qualità desiderabili definite sulla base della variabilità biologica intra- e interindividuale 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 specifiche di qualità desiderabili definite sulla base della variabilità biologica intra- e interindividuale o della differenza critica, va richiesto un secondo campione sul quale eseguire gli esami precedentemente soppressi (raccomandazione di grado A).

^aDefinizione della forza delle raccomandazioni, in accordo con le indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità

- A *L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità*
- B *Si nutrono 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*

BIBLIOGRAFIA

1. Franco RS. The measurement and importance of red cell survival. *Am J Hematol* 2009;84:109-14.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed. 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. *Lab Medicine* 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. Lippi G, Ippolito L, Fontana R. Prevalence of hemolytic specimens referred for arterial blood gas analysis. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:931-2.
9. Ong ME, Chan YH, Lim CS. Reducing blood sample hemolysis at a tertiary hospital emergency department. *Am J Med* 2009;122:1054.e1-6.
10. Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM Jr. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician* 2004;69:2599-606.
11. Hoffman R, Furie B, Benz EJ, eds. Hematology: basic principles and practice. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2009.
12. 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.
13. 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.
14. Lippi G, Simundic AM. Total quality in laboratory diagnostics. It's time to think outside the box. *Biochem Med* 2010;20:5-8.
15. 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.
16. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. *Clin Lab* 2006;52:217-30.
17. 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.
18. Ismail A, Shingler W, Seneviratne J, et al. In vitro and in vivo haemolysis and potassium measurement. *Br Med J* 2005;330:949.
19. 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.
20. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4. <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol13no4/130401002.htm>.
21. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999;36:704-21.
22. CLSI document EP7-A2. Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline – 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
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. 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.
34. Simundic AM, Topic E, Nikolac N, et al. Hemolysis detection and management of hemolysed specimens. *Biochem Med* 2010;20:154-9.